



HAL
open science

Ingénierie de la transcétolase de *Geobacillus stearothermophilus* : nouvelles stratégies pour la synthèse enzymatique de cetoses rares

Marion Lorillière

► To cite this version:

Marion Lorillière. Ingénierie de la transcétolase de *Geobacillus stearothermophilus* : nouvelles stratégies pour la synthèse enzymatique de cetoses rares. Chimie organique. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAC080 . tel-01818066

HAL Id: tel-01818066

<https://theses.hal.science/tel-01818066>

Submitted on 18 Jun 2018

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.

N° d'ordre : 931

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE
U.F.R. de Chimie

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

THÈSE

présentée en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Chimie organique, minérale, industrielle

Par

Marion LORILLIERE

Master Sciences du Médicament - Université Clermont Auvergne

Ingénierie de la transcétolase de *Geobacillus stearothermophilus* : nouvelles stratégies pour la synthèse enzymatique de cétooses rares

Soutenue publiquement le 11 Décembre 2017, devant la commission d'examen :

Présidente :	Mme Christine MOUSTY, Directeur de Recherche CNRS, Université Clermont Auvergne
Rapporteurs :	Mr Sébastien FORT, Directeur de Recherche CNRS, CERMAV, Université Joseph Fourier Grenoble Mme Anne ZAPARUCHA, Professeur, Genoscope CEA, Université Evry Val d'Essonne
Examineurs :	Mr Wolf-Dieter FESSNER, Professeur, Université Technique de Darmstadt, Allemagne Mr Sébastien ROY, Chef de département, Sanofi Mme Valérie THIERY, Professeur, LIENSs, Université de La Rochelle
Co-encadrant :	Mr Franck CHARMANTRAY, Chargé de Recherche CNRS, ICCF, Université Clermont Auvergne
Directrice de thèse :	Mme Laurence HECQUET, Professeur, ICCF, Université Clermont Auvergne

Cette thèse a été préparée à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF, UMR CNRS 6296)

N° d'ordre : 931

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE
U.F.R. de Chimie

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

THÈSE

présentée en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Chimie organique, minérale, industrielle

Par

Marion LORILLIERE

Master Sciences du Médicament - Université Clermont Auvergne

Ingénierie de la transcétolase de *Geobacillus stearothermophilus* : nouvelles stratégies pour la synthèse enzymatique de cétooses rares

Soutenue publiquement le 11 Décembre 2017, devant la commission d'examen :

Présidente :	Mme Christine MOUSTY, Directeur de Recherche CNRS, Université Clermont Auvergne
Rapporteurs :	Mr Sébastien FORT, Directeur de Recherche CNRS, CERMAV, Université Joseph Fourier Grenoble Mme Anne ZAPARUCHA, Professeur, Genoscope CEA, Université Evry Val d'Essonne
Examineurs :	Mr Wolf-Dieter FESSNER, Professeur, Université Technique de Darmstadt, Allemagne Mr Sébastien ROY, Chef de département, Sanofi Mme Valérie THIERY, Professeur, LIENSs, Université de La Rochelle
Co-encadrant :	Mr Franck CHARMANTRAY, Chargé de Recherche CNRS, ICCF, Université Clermont Auvergne
Directrice de thèse :	Mme Laurence HECQUET, Professeur, ICCF, Université Clermont Auvergne

Cette thèse a été préparée à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF, UMR CNRS 6296)

Remerciements

Ce travail de recherche a été réalisé au sein de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF, UMR CNRS 6296) de l'Université Clermont Auvergne, dirigé par le Pr. Anne-Marie Delort, puis par le Dr. Fabrice Leroux, que je remercie pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Le projet « ThermoTK » (ANR-13-IS07-0003) dans lequel s'inscrivent ces travaux a été financé par l'Agence Nationale pour la Recherche, qui trouvera ici le témoignage de ma gratitude.

Je suis très sensible à l'honneur que m'ont fait les membres du jury, le Pr. Christine Mousty, le Pr. Anne Zaparucha, le Pr. Sébastien Fort, le Pr. W.-D. Fessner, le Pr. Valérie Thiéry et le Dr. Sébastien Roy, d'avoir accepté de juger mon travail et à l'intérêt qu'ils ont témoigné pour ce projet lors de ma soutenance.

Mes plus vifs remerciements sont adressés à mes encadrants, le Pr. Laurence Hecquet et le Dr. Franck Charmantray, qui ont su trouver l'équilibre entre l'encadrement et mon besoin d'indépendance. Un grand merci au Pr. Laurence Hecquet, ma directrice de thèse, pour m'avoir fait confiance en me confiant ce projet à l'interface entre de nombreuses disciplines. J'ai énormément appris grâce à cette thèse et je lui en suis profondément reconnaissante. Je la remercie pour sa disponibilité, son implication et son soutien inébranlable tout au long de ces trois années de thèse. Mes remerciements vont également à mon co-encadrant, le Dr. Franck Charmantray, pour son soutien, ses conseils au quotidien, sa patience, son dynamisme et nos nombreuses discussions scientifiques.

Je tiens également à remercier nos partenaires et collaborateurs sur ce projet. Je remercie tout d'abord très chaleureusement le Pr. W.-D. Fessner de l'Université Technique de Darmstadt, en Allemagne et les membres de son équipe, le Dr. Dong Yi, le Dr. Saravanan Thangavelu, Marie-Luise Reif et Inés Fúster Fernández, pour leur collaboration de qualité et nos réunions ANR, qui, au delà des échanges scientifiques, ont toujours été des moments de convivialité. A special thank-you to Saravanan, Marie-Luise and Inés, for sharing their knowledge with me during my mission in Darmstadt and their mission in Aubière and for our many scientific and friendly exchanges since then.

Je remercie ensuite le Pr. Thierry Gefflaut (ICCF, Equipe BioMéta) et son ancien doctorant, le Dr. Egon Heuson, mais également le Dr. Véronique de Berardinis, membre du Genoscope, CEA, Evry, pour leur collaboration concernant le développement des cascades bienzymatiques TA_{tca}/TK_{gst} . Un grand merci à eux pour leur disponibilité et leurs précieux conseils concernant le criblage de la banque de transaminases et l'obtention de la TA_{tca} purifiée.

Un grand merci également au Pr. Loredano Pollegioni et son équipe, de l'Università degli Studi dell'Insubria, en Lombardie, en Italie, grâce à qui nous avons pu développer au laboratoire la cascade bienzymatique $D-AAO_{rgr}/TK_{gst}$. Je n'oublie par le Dr. Laura Caldinelli, qui n'a pas hésité à faire de nombreux kilomètres pour m'apporter la $D-AAO_{rgr}$ en mains propres, lors de l'Ecole d'Eté « Enzyme Discovery, Lake Como School of Advanced Studies », en Juin 2015.

Un immense merci au Pr. Pere Clapés, de l'Institut de Chimie Avancée de Catalogne (CSIC, IQAC), à Barcelone, en Espagne, qui m'a accueillie au sein de son laboratoire durant un mois et grâce à qui nous avons développé la cascade bienzymatique FSA_{eco}/TK_{gst} . Un grand merci au Dr. Karel Hernandez, chercheur post-doctoral, pour sa patience et son aide précieuse à la paillasse durant ma mission. Une pensée particulière enfin va à Elisabet et Jùlia, mes deux collocataires à Barcelone, qui ont contribué à rendre ma mission en Espagne inoubliable. Merci à vous pour votre accueil, votre aide et votre gentillesse ! Many thanks for your welcome, your kindness and hope to see you soon in Barcelona !

Un grand merci enfin au Dr. Romain Dumoulin, qui a consacré son post-doc, réalisé à l'ICCF, au sein de l'équipe BioMéta, à la construction des banques de TK_{gst} mutées décrites dans ce manuscrit, et sans qui ce travail de thèse n'aurait pas été possible.

Merci à toute l'équipe « Biocatalyse en synthèse organique » pour la vie au laboratoire, mais aussi pour les échanges scientifiques et conseils que chacun a su me prodiguer tout au long de ma thèse. Je remercie les trois étudiants en stage qui ont contribué à ce projet, Maxime De Sousa Lopes Moreira ou « Bobby » (stage de Master 2), Julen Ariztia (stage de Master 1) et Nadia Ioualalen (stage de Master 1). Un grand merci à Maxime et Julen pour leur bonne humeur au quotidien ; je leur souhaite toute la réussite qu'ils méritent dans leur thèse respective.

Un grand merci au Dr. Juliane Abdoul Zabar, ma prédécesseur, qui m'a formée à la purification des enzymes, à l'utilisation des tests enzymatiques sur le spectrophotomètre et au test au rouge de phénol sur le TECAN® et grâce à qui j'ai pu être autonome dès le début de ma thèse. Je te remercie pour tes précieux conseils, ton amitié sincère et je te souhaite tout le meilleur dans ta nouvelle vie espagnole, entourée d'Israël et d'Ariane.

Je tiens à remercier chaleureusement Agnès Rambourdin-Desiront, technicienne au laboratoire, grâce à qui je n'ai jamais manqué de rien et pour sa bonne humeur au quotidien et ses touchantes attentions, qui me manqueront, Martine Sancelme, responsable du service microbiologie, et Magalie Abrantes, pour la préparation des cultures bactériennes et enfin Lionel Nauton et le Dr. Vincent Théry, pour les travaux de modélisation moléculaire.

Je remercie Anne-Sophie Biesse-Martin et Régis Egrot, pour les analyses par RMN, Martin Lereboure et Marie Lagrée, pour les analyses par Spectrophotométrie de Masse et enfin Aurélie Job pour les analyses HPLC, qui s'est démenée pour mettre en place la méthode et me permettre de réaliser les analyses durant les derniers mois de manipulations. Enfin, un grand merci à Carole Turpin et Stéphanie Bonnefoy, pour leur gentillesse, leur disponibilité, leur grande réactivité et leur aide précieuse au niveau administratif.

J'adresse un grand merci à toutes les autres personnes que j'ai côtoyées de près ou de loin au cours de ces trois années et qui ont participé à les rendre inoubliables : Felipe B., Matilte H.-B., Victor L., Mélanie L., Maxime D., Angéline A., Romain D., Audrey L., Abdel B., Hélène P., Miao W., Ayoub N., Boris E., Nolwenn W., Rima M., Alexandre M., Alexandre U. et Lilian B. Un clin d'oeil spécial à Mélanie pour sa bonne humeur au quotidien, qui a égaillé mes derniers mois passés au labo. Mon seul regret est que notre cohabitation n'ait pas duré plus longtemps. Une mention spéciale va enfin à ceux qui m'ont soutenue durant ma thèse, que je n'oublierai pas : Stéphane F., Felipe B., Florent C. et Hélène B.

Un immense merci enfin à ma merveilleuse famille, pour son soutien depuis le début de mes études, tout au long de ces trois années de thèse et plus particulièrement durant la période de rédaction. Une pensée particulièrement va à mes parents et ma grande sœur, qui m'ont soutenue et m'ont redonné confiance en moi, même éloignés de centaines, voire de milliers de kilomètres ; je n'y serais pas arrivée sans vous.

Sommaire

Abréviations.....	1
INTRODUCTION GENERALE.....	5
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	10
1. LES ENZYMES THIAMINE DIPHOSPHATE-DEPENDANTES.....	10
2. LA TRANSCETOLASE (TK).....	12
2.1. Rôle de la TK <i>in vivo</i>.....	12
2.1.1. Réaction catalysée <i>in vivo</i> par la TK	12
2.1.2. Rôle de la TK dans la voie des pentoses phosphate.....	13
2.2. Identification et production des TKs microbiennes.....	14
2.2.1. Identification des TKs microbiennes	14
2.2.2. Production des TKs microbiennes utilisées en biocatalyse.....	14
2.2.2.1. TK de <i>S. cerevisiae</i>	15
2.2.2.2. TK d' <i>E. coli</i>	15
2.2.2.3. TK de <i>G. stearothermophilus</i>	16
2.3. Etudes cristallographiques des TKs microbiennes.....	17
2.3.1. Structures tridimensionnelles	17
2.3.2. Etude du site actif des TKs	19
2.3.2.1. Interactions des résidus du site actif de la TK de <i>S. cerevisiae</i> avec les cofacteurs	19
2.3.2.2. Interactions des résidus du site actif des TKs de <i>S. cerevisiae</i> et d' <i>E. coli</i> avec les substrats physiologiques.....	20
2.3.3. Comparaison des résidus clés des sites actifs des TKs de <i>S. cerevisiae</i> et d' <i>E. coli</i>	23
2.4. Mécanisme de la réaction catalysée par la TK	24
2.5. Etude de la spécificité de substrat de la TK.....	27
2.5.1. Substrats donneurs	27
2.5.1.1. Spectre d'activité.....	27
2.5.1.2. Paramètres cinétiques	30
2.5.2. Substrats accepteurs	30
2.5.2.1. Spectre d'activité.....	30
2.5.2.2. Paramètres cinétiques	33
2.5.3. Conclusions	34
3. MODIFICATION OU AMELIORATION DES PROPRIETES DE LA TK PAR EVOLUTION DIRIGEE....	35
3.1. L'Evolution dirigée.....	35
3.2. Construction des banques d'enzymes mutées	37
3.2.1. Création de la diversité au niveau des gènes.....	37
3.2.1.1. Approche rationnelle	38

3.2.1.2. Approche semi-rationnelle.....	39
3.2.2. Construction des banques de TKs mutées	41
3.3. Test de sélection et de criblage	43
3.3.1. Généralités.....	43
3.3.2. Tests de criblage en présence des substrats d'intérêt.....	45
3.3.3. Conclusions	49
3.4. Amélioration et modification des propriétés des TKs mutées les plus performantes.....	49
3.4.1. Amélioration de l'activité de la TK vis-à-vis d'aldéhydes aliphatiques linéaires et cycliques	49
3.4.2. Amélioration de l'activité de la TK vis-à-vis d'aldéhydes aromatiques et hétéroaromatiques.....	51
3.4.3. Modification de la stéréosélectivité de la TK	52
3.4.4. Amélioration de l'activité de la TK vis-à-vis d'aldéhydes à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6)....	52
3.4.5. Amélioration de la thermostabilité de la TK	54
3.4.6. Conclusions	54
4. STRATEGIES DE SYNTHÈSE IMPLIQUANT LA TK	55
4.1. Synthèse de cétooses en une étape catalysée par la TK.....	55
4.2. Synthèse multi-enzymatique de cétooses et analogues impliquant la TK	58
4.2.1. Transformation enzymatique du produit de la réaction catalysée par la TK	58
4.2.2. Génération enzymatique du substrat accepteur de la TK.....	60
4.2.3. Génération enzymatique du substrat donneur de la TK.....	62
4.3. Immobilisation de la TK et utilisation en milieu non conventionnel	65
4.3.1. Immobilisation de la TK.....	65
4.3.2. Utilisation de la TK en milieu non conventionnel	66
OBJECTIFS ET STRATEGIES	67
RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	70
1. PRODUCTION ET CARACTERISATION DE LA TK DE <i>GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS</i>	
(TK_{GST})	70
1.1. Introduction	70
1.2. Production de la TK_{gst}	71
1.2.1. Expression	71
1.2.2. Purification par IMAC.....	72
1.3. Etude cinétique de la réaction catalysée par la TK_{gst}.....	74
1.3.1. Détermination des paramètres cinétiques apparents vis-à-vis des cofacteurs ThDP et Mg ²⁺	75
1.3.2. Etude de la spécificité vis-à-vis des substrats donneurs	75
1.3.2.1. Activités vis-à-vis d'un panel d' α -cétoacides	75
1.3.2.2. Détermination des paramètres cinétiques apparents vis-à-vis du Li-HPA.....	76
1.3.3. Etude de la spécificité vis-à-vis des substrats accepteurs.....	77
1.3.3.1. Activité vis-à-vis d'un panel d'aldéhydes	78
1.3.3.2. Déterminations des paramètres cinétiques apparents.....	82

1.4. Conclusions	84
2. MODIFICATION DE LA SPECIFICITE DE SUBSTRAT DE LA TK_{gst} PAR EVOLUTION DIRIGEE.....	86
2.1. Objectifs	86
2.2. Méthodologie.....	88
2.2.1. Construction d'un modèle structural de la TK _{gst} par homologie	89
2.2.2. Obtention des banques de TK _{gst} mutées.....	91
2.2.3. Criblage des banques de TK _{gst} mutées	92
2.2.3.1. Obtention des lysats cellulaires	92
2.2.3.2. Principe du test de criblage.....	93
2.2.3.3. Conditions utilisées pour le criblage des banques de TK _{gst} mutées	93
2.3. Augmentation de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes α-hydroxylés (2S)	96
2.3.1. Première approche	97
2.3.1.1. Choix des positions clés au niveau du site actif par modélisation moléculaire	97
2.3.1.2. Obtention et criblage des banques L382X, D470X et L382X/D470X.....	99
2.3.1.3. Etude des TK _{gst} mutées purifiées les plus performantes : L382D/D470S, L382D/D470T, L382G/D470S et L382N/D470S	101
2.3.1.4. Conclusions	106
2.3.2. Seconde approche.....	106
2.3.2.1. Choix des positions clés au niveau du site actif par modélisation moléculaire	106
2.3.2.2. Obtention et criblage des banques L191X/F435X, L191X/L382X et L382X/F435X.....	108
2.3.2.3. Etude des TK _{gst} mutées purifiées les plus performantes : L191I, F435L et L382F/F435Y	114
2.3.3. Conclusions	118
2.4. Augmentation de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes α-hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6)	119
2.4.1. Introduction	119
2.4.2. Choix des positions clés du site actif par modélisation moléculaire.....	119
2.4.3. Obtention et criblage des banques R521X, S385X, H462X et R358X	121
2.4.3.1. Obtention des banques.....	121
2.4.3.2. Criblage des banques	122
2.4.4. Obtention et caractérisation des doubles mutants R521V/S385T, R521V/S385V, R521T/S385T et R521T/S385V	126
2.4.5. Obtention et criblage de la banque R521X/S385X/H462X.....	128
2.4.5.1. Obtention de la banque	128
2.4.5.2. Premier cycle de criblage	128
2.4.5.3. Second cycle de criblage	130
2.4.5.4. Etude des TK _{gst} mutées purifiées les plus performantes : R521C/S385D/H462G, R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S.....	133
2.4.6. Conclusions	138
2.5. Augmentation de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes aliphatiques linéaires et aromatiques 138	
2.5.1. Augmentation de l'activité de la TK _{gst} vis-à-vis des aldéhydes aliphatiques linéaires.....	138
2.5.2. Augmentation de l'activité de la TK _{gst} vis-à-vis des aldéhydes aromatiques.....	139
2.6. Augmentation de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis d'un substrat donneur « modèle » : l'acide pyruvique	

2.7. Conclusions	140
3. APPLICATIONS DE LA TK_{GST} SAUVAGE ET DES TK_{GST} MUTEES A LA SYNTHESE DE CETOSES RARES D'INTERET BIOLOGIQUE	143
3.1. Influence des conditions réactionnelles sur la stabilité des substrats à haute température	143
3.1.1. Stabilité du Li-HPA.....	143
3.1.1.1. Etudes antérieures	144
3.1.1.2. Etude de la stabilité du Li-HPA dans l'eau pure	145
3.1.2. Stabilité des aldéhydes accepteurs	148
3.2. Synthèse de cétooses rares catalysée par la TK_{gst} sauvage et les TK_{gst} mutées	148
3.2.1. Introduction	148
3.2.2. Synthèse de cétooses (3S) et D-thréo (3S, 4R) catalysée par la TK _{gst} sauvage et les TK _{gst} mutées.....	149
3.2.3. Synthèse de cétooses L-érythro (3S, 4S) catalysée par la TK _{gst} sauvage et les TK _{gst} mutées.....	153
3.2.4. Conclusions	157
3.3. Cascades bi-enzymatiques pour la génération <i>in situ</i> du HPA	158
3.3.1. Stratégies de génération <i>in situ</i> du HPA par voie enzymatique	158
3.3.2. Couplage TA _{tca} /TK _{gst}	160
3.3.2.1. Recherche d'une transaminase appropriée	160
3.3.2.2. Identification d'une α-TA thermostable issue de la biodiversité	162
3.3.2.3. Production de la TA de <i>Thermosinus carboxydvorans</i> (TA _{tca})	167
3.3.2.4. Caractérisation de la TA _{tca}	168
3.3.2.5. Synthèse de cétooses L-érythro (3S, 4S) à 60°C.....	172
3.3.3. Conclusions	177
3.3.4. Couplage D-AAO _{rgr} /TK _{gst}	178
3.3.4.1. Recherche d'une D-aminoacide oxydase.....	178
3.3.4.2. Production de la D-AAO de <i>Rhodotorula gracilis</i> (D-AAO _{rgr})	182
3.3.4.3. Caractérisation de la D-AAO _{rgr}	185
3.3.4.4. Synthèse de cétooses (3S) et D-thréo (3S, 4R) à 25°C.....	189
3.3.5. Conclusions	193
3.4. Cascades bi-enzymatiques pour la génération des aldéhydes α-hydroxylés (2S)	194
3.4.1. Les aldolases	194
3.4.2. Production de la FSA d' <i>E. coli</i> (FSA _{eco}) et des mutants A129G et A165G/S166P	198
3.4.3. Couplage FSA _{eco} (sauvage ou mutée)/TK _{gst}	199
3.4.3.1. Synthèse du L-ribulose 3.....	201
3.4.3.2. Synthèse du D-tagatose 5	202
3.4.3.3. Synthèse du L-psicose 6.....	204
3.4.4. Conclusions	205
3.5. Cascade multi-enzymatique FSA_{eco} mutée A129G/TA_{tca}/TK_{gst} pour la synthèse du D-tagatose 5	206
3.6. Conclusions	208
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	210
PARTIE EXPERIMENTALE	215

1. MATERIEL.....	215
1.1. Microbiologie	215
1.1.1. Généralités	215
1.1.2. Milieux de culture	215
1.1.3. Souches bactériennes hôtes et vecteurs.....	216
1.1.4. Amorces nucléotidiques.....	217
1.2. Réactifs et enzymes.....	218
1.3. Synthèses	218
1.4. Analyses	219
2. METHODES.....	220
2.1. Production et purification des enzymes.....	220
2.1.1. Protocole général d'expression et d'extraction des enzymes	220
2.1.2. Protocole général de purification des enzymes par IMAC.....	221
2.1.3. Production et purification de la TK _{gst} et des TK _{gst} mutées	221
2.1.3.1. Production de la TK _{gst}	221
2.1.3.2. Production des TK _{gst} mutées	222
2.1.3.3. Purification de la TK _{gst} et des TK _{gst} mutées par IMAC	226
2.1.4. Production et purification de la TA _{tca}	226
2.1.5. Production et purification de la D-AAO _{rgr}	228
2.1.6. Production et purification de la FSA _{eco} et des FSA _{eco} mutées	229
2.1.7. Stockage des enzymes	230
2.1.8. Dosage des protéines par le test de Bradford.....	230
2.1.9. Electrophorèse en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE) .	231
2.2. Tests enzymatiques	233
2.2.1. Détermination de l'activité de la TK _{gst} et des TK _{gst} mutées	233
2.2.1.1. Détermination de l'activité en présence d'une enzyme auxiliaire (« test TK _{ADH} »).....	233
2.2.1.2. Détermination de l'activité en présence du rouge de phénol (« test TK _{ROUGE DE PHENOL} »)	235
2.2.2. Détermination de l'activité des transaminases (« test TA _{WST-1} »).....	238
2.2.3. Détermination de l'activité de la D-AAO _{rgr} (« test D-AAO _{rgr-LDH} »).....	240
2.2.4. Dosage du Li-HPA	241
2.2.4.1. Test en macrocuve	241
2.2.4.2. Test en microplaque 96-puits.....	242
2.2.5. Etude de la stabilité du Li-HPA	242
2.2.6. Dosage du D-lactaldéhyde et du L-lactaldéhyde	243
2.3. Caractérisation de la TK_{gst} et des TK_{gst} mutées les plus performantes	243
2.3.1. Etude de la thermostabilité de la TK _{gst} et des mutants L382D/D470S, L191I, L382F/F435Y, R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S	243
2.3.2. Détermination de la température optimale du mutant L382D/D470S.....	244
2.3.3. Détermination des paramètres cinétiques apparents de la TK _{gst} et des TK _{gst} mutées les plus performantes.....	245
2.3.3.1. Généralités	245
2.3.3.2. Paramètres cinétiques apparents de la TK _{gst} vis-à-vis des cofacteurs ThDP et Mg ²⁺	245

2.3.3.3.	Paramètres cinétiques apparents de la TK _{gst} et des TK _{gst} mutées les plus performantes vis-à-vis d'un panel d'aldéhydes accepteurs.....	245
2.3.3.4.	Paramètres cinétiques apparents de la TK _{gst} vis-à-vis du Li-HPA	246
2.4.	Caractérisation de la TA_{tca}.....	247
2.4.1.	Criblage de la banque des L-α-TAs issues de la biodiversité	247
2.4.2.	Détermination de l'activité spécifique	247
2.4.3.	Détermination de la température optimale et du pH optimal	247
2.4.4.	Etude de la thermostabilité.....	248
2.4.5.	Détermination des paramètres cinétiques apparents vis-à-vis de la L-sérine et de l'acide pyruvique	248
2.5.	Caractérisation de la D-AAO_{rgr}.....	249
2.5.1.	Détermination de la température optimale	249
2.5.2.	Etude de la thermostabilité.....	249
2.5.3.	Détermination des paramètres cinétiques apparents vis-à-vis de la D-sérine.....	249
2.6.	Synthèses chimiques, enzymatiques et cascades bi- et multi-enzymatiques	250
2.6.1.	Généralités	250
2.6.2.	Synthèses chimiques	250
2.6.2.1.	Synthèse de l'hydroxypyruvate de lithium (Li-HPA).....	250
2.6.2.2.	Synthèse du D-lactaldéhyde	251
2.6.2.3.	Synthèse du L-lactaldéhyde.....	252
2.6.3.	Synthèses enzymatiques catalysées par la TK _{gst}	252
2.6.4.	Cascades bi-enzymatiques	253
2.6.4.1.	Cascades bi-enzymatiques TA _{tca} /TK _{gst}	253
2.6.4.2.	Cascades bi-enzymatiques D-AAO _{rgr} /TK _{gst}	254
2.6.4.3.	Cascades bi-enzymatiques FSA _{eco} (sauvage ou mutée)/TK _{gst}	255
2.6.4.4.	Cascade multi-enzymatique FSA _{eco} mutée A129G/TA _{tca} /TK _{gst}	256
2.6.5.	Caractérisation des produits	257
ANNEXES.....		271
Annexe 1 : Monosaccharides phosphorylés.....		271
Annexe 2 : Code génétique.....		272
Annexe 3 : Les vingt acides aminés naturels		273
Annexe 4 : Acides aminés clés des TK_{sce}, TK_{eco}, TK_{ban} et TK_{gst}		274
Annexe 5 : Analyse de la qualité des mutants ponctuels de la TK_{gst} et des banques de TK_{gst} mutées		275
Annexe 6 : Spectres de RMN et chromatogrammes HPLC.....		276
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		288
PUBLICATIONS.....		310

Abréviations

A	Absorbance
AAO	Aminoacide oxydase
ACS	Acide cystéine sulfinique
ADH	Alcool déshydrogénase
ADN	Acide désoxyribonucléique
APS	Ammonium persulfate
A_{rel}	Absorbance relative
BMIM	1-Butyl-3-méthylimidazolium
BSA	Albumine de sérum bovin
CAST	Mutagenèse combinatoire par saturation de site
D-AAO	D-aminoacide oxydase
D-AAO _{gr}	D-aminoacide oxydase de <i>Rhodotorula gracilis</i>
D-AspO	D-aspartate oxydase
D-A5P	D-arabinose-5-phosphate
D-E4P	D-érythrose-4-phosphate
D-F-1,6P	D-fructose-1,6-bisphosphate
D-F6P	D-fructose-6-phosphate
D-G3P	D-glycéraldéhyde-3-phosphate
DHA	Dihydroxyacétone
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
DHE	Dihydroxyéthyle
D,L-G3P	D,L-glycéraldéhyde-3-phosphate
DO	Densité optique
DP	Diphosphate
D-R5P	D-ribose-5-phosphate
D-Ru-1,5P	D-ribulose-1,5-bisphosphate
D-Ru5P	D-ribulose-5-phosphate

D-S-1,7P	D-sédoheptulose-1,7-bisphosphate
D-S7P	D-sédoheptulose-7-phosphate
D-T4P	D-thréose-4-phosphate
D-X5P	D-xylulose-5-phosphate
DXS _{eco}	1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase d' <i>Escherichia coli</i>
ed	excès diastéréoisomérique
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
ee	excès énantiomérique
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FruA	D-fructose-1,6-bisphosphate aldolase
FSA	D-fructose-6-phosphate aldolase
FSA _{eco}	D-fructose-6-phosphate aldolase d' <i>Escherichia coli</i>
GC	Chromatographie en phase gazeuse
Gly-gly	Glycylglycine
HCl	Acide chlorhydrique
HDL	Hydroxyde double lamellaire
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HOBA	3-hydroxy-2-oxobutanoate de potassium
HPA	Acide hydroxypyruvique
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HRMS	Spectrométrie de masse à haute résolution
IMAC	Chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés
INT	Chlorure d'iodonitrotétrazolium
IPA	L-isopropylamine
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside
ISM	Mutagenèse par saturation de site itérative
K _M ^{app}	Constante de Michaelis-Menten apparente
ℓ	largeur de cuve ou hauteur de puits

L-AAO	L-aminoacide oxydase
L-G3P	L-glycéraldéhyde-3-phosphate
L-LDH	L-lactate déshydrogénase
LB	Luria-Bertani
Li-HPA	Hydroxypyruvate de lithium
Liaison C-C	Liaison carbone-carbone
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
MBA	L- α -méthylbenzylamine
MS	Spectrométrie de masse
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
NTA	Acide nitriloacétique
OEC	Oligonucléotide <i>Escherichia coli</i>
« one-pot »	Au sein d'un même réacteur
<i>p</i> -anisaldéhyde	<i>para</i> -anisaldéhyde
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PLP	Phosphate de pyridoxal
rcf	Force relative de centrifugation
R _f	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SSM	Mutagenèse par saturation de site
TA	Transaminase
Taq polymérase	ADN polymérase de <i>Thermus aquaticus</i>
TA _{tca}	Transaminase de <i>Thermosinus carboxydivorans</i>
TEA	Triéthanolamine
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthyléthyldiamine

ThDP	Thiamine diphosphate
TK	Transcétolase
TK _{ban}	Transcétolase de <i>Bacillus anthracis</i>
TK _{eco}	Transcétolase d' <i>Escherichia coli</i>
TK _{gst}	Transcétolase de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
TK _{sce}	Transcétolase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TK _{spi}	Transcétolase de feuilles d'épinards
TPI	Triose-phosphate isomérase
t _R	Temps de rétention
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TSP-d ₄	3-triméthylsilyl-2,2,3,3-tétradeutéropropanoate de sodium
TTC	Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium
UA	Unité d'absorbance
V	Vitesse
V _{max} ^{app}	Vitesse maximale apparente
V _{rel}	Vitesse relative
VT	Violet de tétrazolium
v/v	Volume/volume
WST-1	Sel de tétrazolium-1 soluble dans l'eau
wt	Type sauvage
w/v	Masse/volume
α-KG	Acide α-cétoglutarique
λ	Longueur d'onde
σ	Ecart-type
ε	Coefficient d'absorption molaire
5-HMF	5-Hydroxyméthylfurfural
7-ACA	Acide 7-amino-céphalosporanique

Introduction Générale

Des milliers de réactions enzymatiques ont lieu au sein des organismes vivants, permettant la formation de composés essentiels à leur fonctionnement. Aujourd'hui, les biocatalyseurs (enzyme isolée, système multi-enzymatique, voire même microorganisme entier) séduisent de plus en plus les chimistes organiciens, car ils sont capables de catalyser un très large éventail de réactions avec d'excellentes chimio-, régio- et/ou stéréosélectivités. Ces propriétés permettent ainsi de simplifier les procédés de synthèse chimique classique et d'en réduire le coût, en évitant des étapes de protection/déprotection et l'obtention de produits secondaires non-désirés parfois toxiques. L'utilisation de catalyseurs biologiques en synthèse organique permet par ailleurs de répondre aux contraintes environnementales actuelles. En effet, ils catalysent des réactions complexes dans des conditions douces : milieu aqueux, pH non extrême, pression atmosphérique, ce qui limite l'utilisation de solvants organiques toxiques et polluants. Les stratégies de synthèse impliquant des biocatalyseurs respectent ainsi les douze principes de la Chimie Verte [1].

De nombreuses avancées ont été réalisées dans le domaine de la biocatalyse depuis le début du XX^{ème} siècle, au travers de trois « vagues » successives de recherche et d'innovation, décrites par le Pr. U. T. Bornscheuer et *al.*, dans une revue récente, publiée en 2012 dans le journal *Nature* [2]. Après la première vague, qui a commencé il y a plus d'un siècle, montrant que les enzymes pouvaient être utilisées pour la synthèse de divers composés, la deuxième vague (1980-1990), a conduit à l'émergence des technologies d'ingénierie des protéines (clonage, surexpression, mutagenèse). Celles-ci ont permis d'étendre le spectre de substrats des enzymes et d'élargir ainsi leurs champs d'applications à de nouvelles molécules, utilisées notamment en pharmacie et en chimie fine. La troisième et actuelle vague a débuté dans les années 1990 avec les travaux des Pr. W. P. C. Stemmer [3] et F. Arnold [4], qui ont développé des méthodes efficaces permettant de modifier les biocatalyseurs, *via* une version *in vitro* de l'Evolution Darwinienne, appelée Evolution *in vitro* ou dirigée. De nombreuses propriétés de diverses enzymes ont ainsi été améliorées ou modifiées par cette technique, telles que la spécificité de substrat, la stéréosélectivité, l'énantiosélectivité, la résistance à haute température, à des pH non physiologiques ou en présence de solvants organiques. Les avancées se poursuivent aujourd'hui avec l'optimisation des voies métaboliques, mais également le développement de voies de synthèse multi-enzymatiques biomimétiques ou non, *in vitro* ou *in vivo* (cascades enzymatiques). Ces stratégies sont aujourd'hui en plein essor dans les secteurs pharmaceutiques, agroalimentaires et cosmétiques mais également dans l'industrie du textile, des détergents, des biocarburants, des polymères ou encore du papier [5], [6], [7].

Ces travaux de thèse s'appuient sur ces avancées récentes en biocatalyse et visent à développer un procédé enzymatique innovant, appliqué à la synthèse de monosaccharides rares hautement valorisables [8]. Les monosaccharides (et analogues) interviennent dans de nombreux processus biochimiques : croissance et reconnaissance cellulaire, réponse immunitaire, développement de métastases. Ces composés sont retrouvés dans diverses familles d'agents thérapeutiques tels que des antiviraux, des antibiotiques/antibactériens, des antithrombotiques, des inhibiteurs de glycosidases, des phéromones ou des vitamines. Ils sont également employés en tant qu'arômes et édulcorants dans la filière agroalimentaire.

L'emploi de biocatalyseurs est particulièrement adapté à la chimie des glucides car leur obtention est un défi de taille pour les chimistes organiciens. Le caractère multifonctionnel des sucres requiert en effet l'utilisation de différents groupements protecteurs, afin d'éviter les réactions secondaires sur les groupements hydroxyle, carbonyle ou phosphate. De plus, la présence de plusieurs centres chiraux au sein de la molécule nécessite un contrôle de leur configuration absolue tout au long du procédé de synthèse. Leur obtention par fractionnement enzymatique de la biomasse lignocellulosique est une stratégie efficace, mais conduit uniquement à l'obtention de monosaccharides abondants dans la nature [9]. Une autre stratégie consiste à les obtenir *via* l'utilisation d'isomérases. Toutefois, les substrats de ces enzymes se limitent à des composés dont les structures sont proches des substrats physiologiques [8], [10]. D'autres approches offrent une plus grande flexibilité vis-à-vis de substrats non-naturels et conduisent ainsi à une plus grande variété de monosaccharides et analogues. La réaction de carboligation est particulièrement étudiée, notamment selon des réactions d'aldolisation. Dans ce domaine, l'organocatalyse permet d'accéder à certaines structures mais souvent en présence de co-solvants et nécessite l'utilisation de groupements protecteurs [11], [12]. L'utilisation des aldolases, appartenant à la classe des lyases, est une alternative efficace très exploitée pour catalyser les réactions d'aldolisation, dans le respect des critères de la chimie verte. Cependant, ces réactions sont réversibles et ne permettent pas toujours un haut contrôle de la stéréosélectivité [13], [14].

D'autres enzymes, de la classe des transférases, permettent d'accéder aux monosaccharides en une étape, par formation stéréospécifique d'une liaison C-C. L'une de ces enzymes, la transcétolase (TK), permet la formation de composés de type cétooses D-*thréo* (3*S*, 4*R*), *via* le transfert d'un groupement « cétole » d'un cétoose donneur sur un aldéhyde accepteur α -hydroxylé de configuration (2*R*). La formation de la liaison C-C s'accompagne de la création d'un nouveau centre asymétrique de configuration (3*S*) (Figure 1 a)).

Fait rare pour une réaction enzymatique, l'emploi de l'acide hydroxypyruvique ou HPA comme substrat donneur de la TK permet de rendre la réaction irréversible, un avantage certain par rapport aux réactions catalysées par les aldolases. Par conséquent, le laboratoire, ainsi que d'autres groupes, s'intéressent depuis de nombreuses années au potentiel synthétique de cette enzyme issue de microorganismes mésophiles, abondamment exploité pour la préparation de nombreux composés d'intérêt biologique présentant une grande diversité structurale, tels que des sucres phosphorylés ou non, des azasucres et des thiosucres ou encore des aminoalcools.

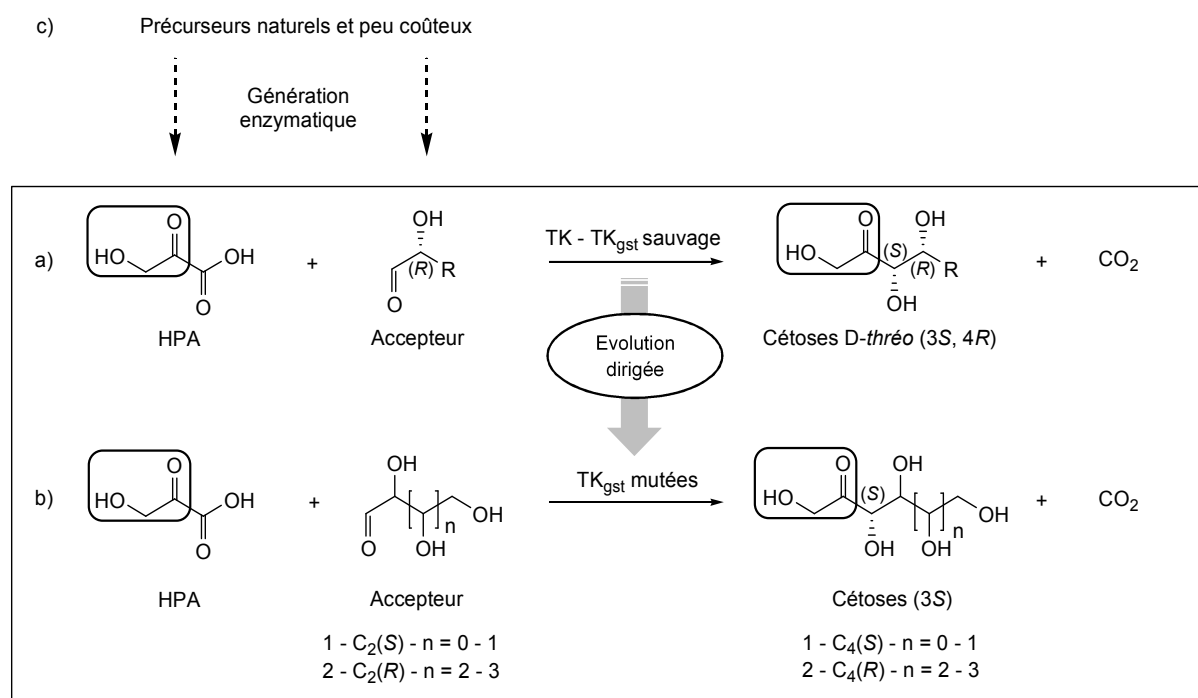


Figure 1 : Réactions catalysées par la transcétolase de *Geobacillus stearothermophilus* (TK_{gst})
 a) Réaction catalysée par la TK_{gst} sauvage. b) Réactions envisagées afin d'améliorer son activité vis-à-vis des aldéhydes α-hydroxylés (2S) et des aldéhydes α-hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6). c) Génération du HPA et des aldéhydes α-hydroxylés (2S) par voie enzymatique à partir de précurseurs naturels et peu coûteux

De nombreux procédés enzymatiques développés aujourd'hui à l'échelle industrielle sont catalysés par des enzymes thermostables, très convoitées pour leur stabilité accrue dans le temps, leur tolérance particulière en présence de co-solvants organiques et leur efficacité catalytique à haute température, permettant d'accroître les cinétiques réactionnelles. Par ailleurs, ces enzymes sont capables d'accepter des mutations bénéfiques tout en gardant la capacité de se replier dans l'espace dans leur structure d'origine, ce qui en fait d'excellentes candidates pour des travaux d'ingénierie, visant à modifier ou améliorer leur activité et/ou leur sélectivité. Ainsi, la première TK thermostable, issue de la bactérie thermophile *Geobacillus stearothermophilus*, a été identifiée par notre groupe en 2013, en collaboration

avec le Genoscope, CEA à Evry. Cette nouvelle enzyme, la TK_{gst}, est au centre de ces travaux, qui visent à optimiser son procédé biocatalytique pour la synthèse efficace à haute température de monosaccharides rares d'intérêt biologique.

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans un programme franco-allemand financé par l'Agence Nationale pour la Recherche (Projet ANR ThermoTK - code : ANR-13-IS07-0003-01) et ont été réalisés au sein de l'équipe Biocatalyse et Métabolisme (BioMéta) appartenant à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF-UMR 6296 CNRS), en partenariat avec l'équipe du Pr. W.-D. Fessner (Université Technique de Darmstadt, Allemagne).

Un des objectifs de ces travaux est d'élargir le champ d'application de la TK_{gst} à de nouveaux monosaccharides rares valorisables, en raison de leurs nombreuses propriétés biologiques. La TK_{gst} acceptant préférentiellement les aldéhydes α -hydroxylés (2R) à courte chaîne, le potentiel synthétique de cette enzyme est en effet limité aux cétooses de configuration D-*thréo* (3S, 4R) à 4, 5 et 6 atomes de carbone. Nous envisageons d'une part, l'amélioration de l'activité de cette enzyme vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2S). L'emploi de ces nouveaux substrats conduirait à l'obtention de cétooses de configuration L-*érythro* (3S, 4S), des composés utilisés seuls ou comme précurseurs de molécules à activité thérapeutique ou présentant des propriétés édulcorantes, tels que le L-ribulose [15], [16], le D-tagatose [17], [18], [19] ou le L-psicose [8], [20]. D'autre part, nous envisageons d'augmenter l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6), conduisant à des cétooses de configuration D-*thréo* (3S, 4R) à 7 à 8 atomes de carbone, des monosaccharides rares d'intérêt biologique, comme le D-sédoheptulose [21], [22], [23], [24], le D-*ido*-heptulose [23], [24] ou le D-*glycéro*-D-*ido*-octulose [25], [26] (Figure 1 b)). L'équipe du Pr. W.-D. Fessner, notre partenaire sur ce projet, s'est orientée vers l'amélioration de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis d'aldéhydes aliphatiques et aromatiques et de nouveaux substrats donneurs comme l'acide pyruvique, deux projets auxquels j'ai participé dans le cadre d'échanges entre les deux laboratoires.

L'autre objectif est de synthétiser à l'échelle préparative les cétooses d'intérêt en présence de la TK_{gst} sauvage ou des TK_{gst} les plus performantes à haute température, afin d'augmenter l'efficacité de la réaction. Le procédé enzymatique catalysé par la TK_{gst} sera optimisé *via* le développement d'une stratégie multi-enzymatique originale, dans laquelle les substrats donneurs et accepteurs de cette enzyme sont générés par voie enzymatique, à partir de précurseurs naturels et peu coûteux (Figure 1 c)). La génération *in situ* du substrat donneur de la TK_{gst}, le HPA, sera envisagée par voie enzymatique à partir de la D- ou L-sérine, afin de s'affranchir de la synthèse chimique peu efficace de ce substrat, mais également pour limiter

sa dégradation à haute température. Ces travaux ont été menés en collaboration avec le Pr T. Gefflaut, (Equipe BioMéta, ICCF), le Dr. V. De Berardinis (Genoscope, CEA, Evry) et le Pr L. Pollegioni (Université de l'Insubrie de Lombardie, Italie). De plus, compte tenu du coût élevé des aldéhydes α -hydroxylés (2S) à 3 et 4 atomes de carbone, un nouveau procédé biocatalytique permettant leur génération à partir d'aldéhydes commerciaux achiraux à très courte chaîne carbonée plus accessibles sera exploré, en collaboration avec le Pr. P. Clapés (Institut de Chimie Avancée de Catalogne de Barcelone, Espagne).

Dans ce manuscrit, un premier chapitre consacré à l'étude bibliographique décrira tout d'abord le transcétolase (TK), ainsi que ses propriétés catalytiques. Puis seront recensées les principales stratégies d'ingénierie utilisées pour modifier et/ou améliorer les propriétés de cette enzyme. Enfin, les exemples d'utilisation de la TK sauvage ou mutée en biocatalyse, employée seule au sein de procédés chimio-enzymatiques ou multi-enzymatiques pour la synthèse de composés d'intérêt, seront présentés. A l'issue de cette étude bibliographique, nos objectifs et les stratégies envisagées seront exposés. Dans le chapitre suivant, les résultats de nos travaux seront décrits et discutés. Ils concerneront tout d'abord la caractérisation biochimique de la transcétolase de *Geobacillus stearothermophilus* (TK_{gst}), puis l'élargissement de son spectre biocatalytique par ingénierie et enfin, l'utilisation de la TK_{gst} sauvage et des TK_{gst} mutées les plus performantes pour la synthèse à haute température des cétooses d'intérêt à l'échelle préparative. Le développement de systèmes bi- et multi-enzymatiques, au sein desquels les substrats donneurs et accepteurs de la TK_{gst} sont générés *in situ* ou non par voie enzymatique, sera ensuite exposé. Une conclusion, dressant le bilan des résultats ainsi que les perspectives envisagées, termineront ce travail, puis une partie expérimentale, en fin de document, détaillera l'ensemble des protocoles mis en œuvre.

Etude Bibliographique

1. Les enzymes thiamine diphosphate-dépendantes

La thiamine diphosphate (ThDP) est la forme biologiquement active de la vitamine B₁ ou thiamine (Figure 2). Les enzymes ThDP-dépendantes sont une large famille d'enzymes ubiquitaires, présentes dans de très nombreuses voies métaboliques. Elles utilisent le ThDP comme cofacteur essentiel dans le mécanisme catalytique de réactions telles que la coupure ou la formation de liaisons carbone-soufre, carbone-oxygène, carbone-azote et surtout carbone-carbone. Elles appartiennent aux classes des lyases, des transférases et des oxydoréductases [27]. La molécule de ThDP est constituée de trois éléments structuraux principaux : le cycle 2'-méthyl-4'-aminopyrimidine (Pyr), lié par un pont méthylène au cycle 4-méthyl-thiazolium (MT), lui-même relié à un groupement diphosphate (DP) par une fonction hydroxyéthyle (Figure 2) [28].

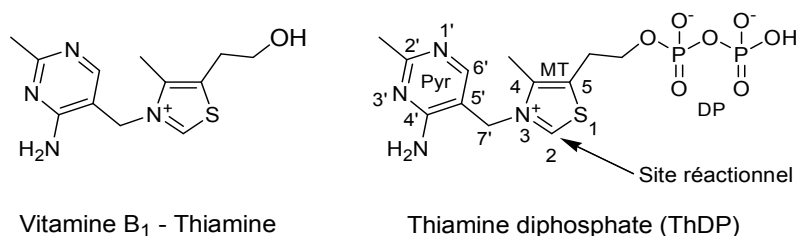


Figure 2 : Structures développées de la vitamine B₁ (ou thiamine) et du ThDP

Le rôle catalytique du ThDP est décrit dans de nombreuses revues [29], [30]. Toutes les réactions catalysées par les enzymes dépendantes du ThDP ont en commun une première étape, qui consiste en l'arrachement du proton du carbone 2 du cycle thiazolium, pour conduire à la formation d'un carbanion et à la forme « activée » du ThDP (ylure) [31]. Lors de ces réactions, un motif comportant un groupement carbonyle est transféré depuis un substrat « donneur » vers un substrat « accepteur ». La séquence réactionnelle suivante a lieu : 1) attaque nucléophile du carbanion du ThDP « activé » sur le groupement carbonyle du substrat donneur, 2) formation d'un intermédiaire réactif, 3) transfert vers les différents substrats accepteurs (Figure 3) [32].

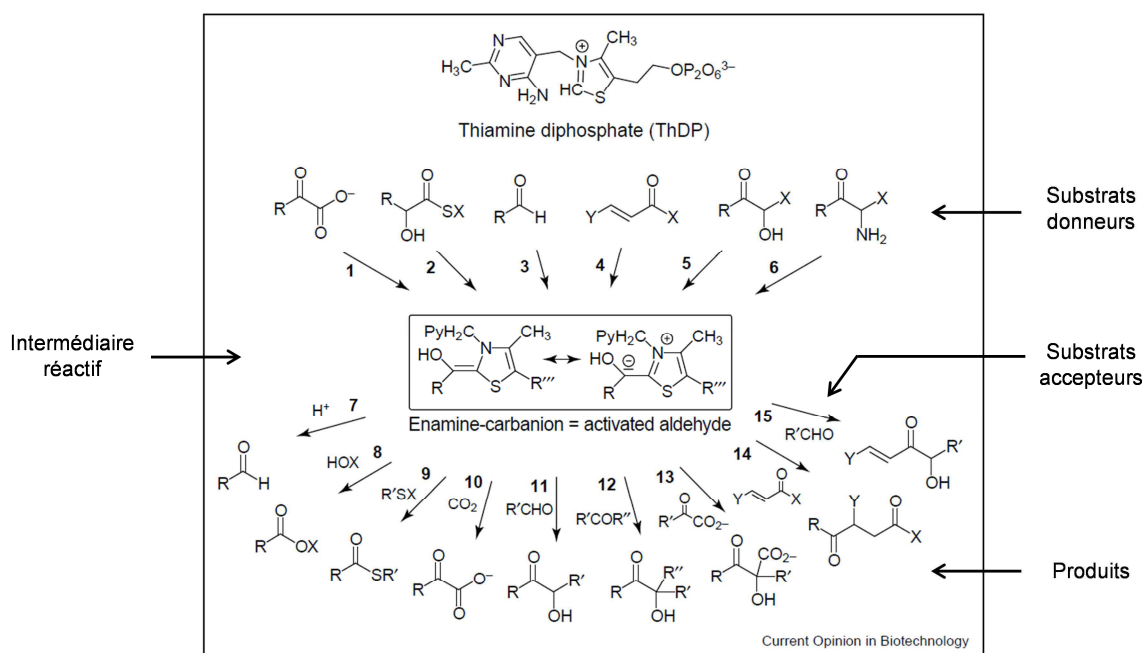


Figure 3 : Réactions catalysées par les enzymes ThDP-dépendantes
Schéma extrait de la littérature [32]

De part le large éventail de réactions qu'elles catalysent, les enzymes à ThDP présentent une grande diversité au niveau de leur séquence et de leur organisation structurale. Néanmoins, elles partagent deux domaines protéiques semblables : le domaine de liaison au cycle pyrimidine (Pyr) et le domaine de liaison au groupement diphosphate (DP) [33], témoignant de l'existence d'un ancêtre commun [34]. Le domaine DP présente une séquence commune « GDG-X₃₀-NN », composée d'environ 35 acides aminés, débutant par le motif hautement conservé « Gly-Asp-Gly », suivi de 30 résidus plus variables et se terminant par deux asparagines, elles aussi particulièrement conservées [35]. Afin d'établir une comparaison exhaustive des séquences protéiques et des structures des enzymes ThDP-dépendantes, l'équipe du Pr. J. Pleiss (Allemagne) a établi une base de donnée : la « Thiamine diphosphate dependent Enzyme Engineering Database » (TEED). Ainsi, les enzymes à ThDP ont pu être classées en 8 superfamilles, selon leur arrangement structural et leurs domaines [36].

Parmi les enzymes ThDP-dépendantes, certaines sont employées en biocatalyse dans des réactions de carboligation asymétrique, en raison de leur fort potentiel synthétique, de leur large gamme de substrats et de leurs différentes stéréospécificités [26], [38]. L'une d'entre elles est particulièrement utilisée pour la synthèse de polyols chiraux par formation stéréospécifique d'une liaison carbone-carbone (C-C) : la transcétolase.

2. La transcétolase (TK)

La transcétolase (TK, EC 2.2.1.1) appartient à la classe des transférases et catalyse la formation ou la coupure d'une liaison C-C. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle de cette enzyme *in vivo* et son implication au sein de différentes voies métaboliques. De plus, l'identification, la production, la purification et la cristallisation de nombreuses TKs, issues d'organismes variés, ont permis l'analyse de son site actif et de sa structure tridimensionnelle (structure 3D) pour proposer un mécanisme catalytique.

2.1. Rôle de la TK *in vivo*

Le rôle physiologique de la TK consiste en la biosynthèse de monosaccharides phosphorylés (C5 à C7) indispensables au métabolisme cellulaire. Elle intervient dans la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphate chez les microorganismes et les organismes supérieurs. Chez l'Homme, une déficience de l'activité de la TK génère de sévères pathologies, telles que des maladies neurologiques, comme le syndrome de Wernicke-Korsakoff [39] ou la maladie d'Alzheimer [35], [36], du diabète [42] et certains cancers [43]. Cette enzyme est utilisée comme marqueur de certaines de ces maladies et a récemment été utilisée comme cible thérapeutique [44]. Chez les végétaux, elle intervient dans le cycle de Calvin [45] et le métabolisme du D-glycéro-D-ido-octulose-8-phosphate ou D-octulose-8-phosphate (D-O8P) [25]. Dans la suite de cette étude bibliographique, seules les TKs d'origine microbienne seront présentées, compte-tenu de leur utilisation en biocatalyse.

N.B. : Les structures des aldoses et cétooses mentionnés dans ce paragraphe sont rappelées en *Annexe 1*.

2.1.1. Réaction catalysée *in vivo* par la TK

La TK permet d'accéder à des cétooses phosphorylés de configuration D-*thréo* (3S, 4R) par formation stéréospécifique d'une liaison C-C. Cette enzyme, en présence de ses deux cofacteurs, le ThDP [46] et un cation métallique divalent comme Ca^{2+} ou Mg^{2+} [27], catalyse le transfert réversible d'une unité à deux atomes de carbone, appelée groupement hydroxyacétyle ou « cétole », d'un cétoose phosphate donneur sur un aldose phosphate accepteur (Figure 4).

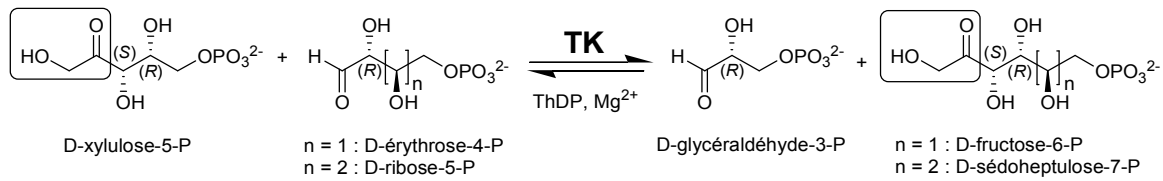


Figure 4 : Réaction catalysée par la TK *in vivo*

Ce transfert réversible a lieu du D-xylulose-5-phosphate (D-X5P, cétose à 5 atomes de carbone) vers le D-érythrose-4-phosphate (D-E4P, aldose à 4 atomes de carbone) pour donner le D-fructose-6-phosphate (D-F6P, cétose à 6 atomes de carbone) ou vers le D-ribose-5-phosphate (D-R5P, aldose à 5 atomes de carbone) pour donner le D-sédoheptulose-7-phosphate (D-S7P, cétose à 7 atomes de carbone) [47]. Dans les deux cas, le D-glycéraldéhyde-3-phosphate (D-G3P) est généré. La réaction est stéréospécifique : le carbone asymétrique formé est toujours de configuration (S) [48].

2.1.2. Rôle de la TK dans la voie des pentoses phosphate

La TK est une enzyme présente chez tous les organismes qui utilisent la voie des pentoses phosphate. Elle est impliquée dans le segment non oxydatif de cette voie métabolique (Figure 5) [49], [50], [51].

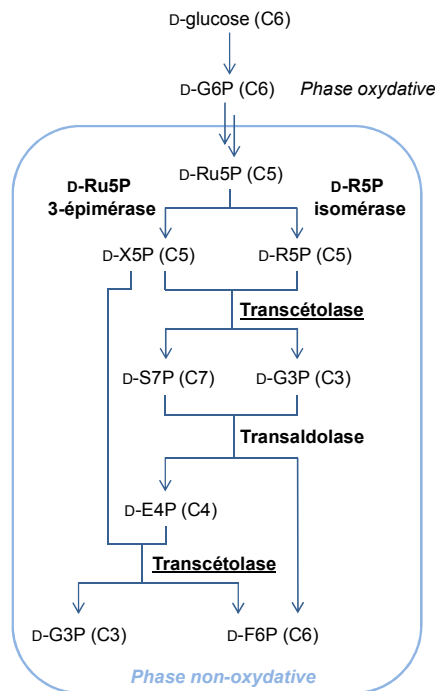


Figure 5 : Segment non oxydatif de la voie des pentoses phosphate

La voie des pentoses phosphate est une voie du métabolisme énergétique et commence par une phase oxydative, durant laquelle le D-glucose-6-phosphate (D-G6P), provenant de la phosphorylation du D-glucose, est transformé en D-ribulose-5-phosphate (D-Ru5P) [50]. Elle est suivie par une phase non-oxydative, débutant par une épimérisation et une isomérisation du D-Ru5P. Le segment non-oxydatif se poursuit par une série de trois réactions conduisant au D-G3P et au D-F6P. La première et la troisième réaction sont catalysées par la TK et la deuxième, par une transaldolase (EC 2.2.1.2).

Les monosaccharides phosphorylés intervenant dans cette voie permettent la synthèse de biomolécules essentielles [50] : nucléotides, acides nucléiques, acides aminés aromatiques, vitamines, acétyl coenzyme A, etc.).

2.2. Identification et production des TKs microbiennes

2.2.1. Identification des TKs microbiennes

Des TKs ont été identifiées dans de très nombreux microorganismes et les gènes correspondants ont été séquencés. Les structures primaires des TKs présentent une forte homologie, bien que provenant d'organismes variés tels que des levures (Ex. : *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseluna polymorpha*, etc.) ou des bactéries (Ex. : *Escherichia coli*, *Bacillus anthracis*, *G. stearothermophilus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus methanolicus*, etc.). En effet, l'alignement de 22 séquences protéiques de TKs issues de microorganismes (bactéries, levures) mais aussi de végétaux et de mammifères, a permis de mettre en évidence 50 résidus absolument invariants, auxquels s'ajoutent 24 résidus qui diffèrent seulement entre les mammifères et les autres organismes [52]. Certains de ces résidus sont impliqués dans la structure du site actif et dans le mécanisme catalytique de l'enzyme et seront décrits par la suite.

2.2.2. Production des TKs microbiennes utilisées en biocatalyse

Historiquement, les premières TKs employées en biocatalyse furent celles issues de feuilles d'épinards [53], [66]. Puis dans le but de produire la TK en grande quantité et d'améliorer sa stabilité, grâce à l'optimisation des systèmes de surexpression, des sources microbiennes ont été envisagées dans les années 1990, telles que *S. cerevisiae* [55] et *E. coli* [56], [57], [58], [59]. Très récemment, la première transcétolase

thermostable, issue de la bactérie thermophile *G. stearothermophilus*, a été identifiée, produite et purifiée par le groupe du Pr. L. Hecquet [60].

2.2.2.1. TK de *S. cerevisiae*

Deux gènes *tkl1* et *tkl2*, codant pour deux isoenzymes de la TK, ont été identifiés chez la levure *S. cerevisiae* [61], [62]. Les deux enzymes correspondantes TKL1 et TKL2, présentent 71% d'homologie de séquence mais semblent jouer des rôles différents au sein de la cellule. En effet, le gène *tkl2* est peu exprimé et ne semble pas indispensable au métabolisme de *S. cerevisiae* [62], contrairement à la TK codée par le gène *tkl1*. Tous les travaux décrits dans la littérature concernent la TK codée par le gène *tkl1*.

La TK de *S. cerevisiae* est la première à avoir été surexprimée. L'équipe du Pr. G. Schneider (Suède) a isolé le plasmide pTKL1, résultant du clonage du gène *tkl1* dans le vecteur pHR81 [61]. Le vecteur navette pTKL1 a la particularité de se répliquer dans *E. coli* et dans *S. cerevisiae*. Son utilisation permet l'obtention d'un taux de surexpression de la TK qui représente 15% de la quantité totale de protéines cellulaires [63], après transformation dans la souche d'expression de *S. cerevisiae* H402. Une méthode de purification de la TK a ensuite été mise au point par le même groupe. Elle fait intervenir successivement une précipitation au sulfate d'ammonium, trois chromatographies d'exclusion moléculaire et une chromatographie sur résine anionique. Cette méthode permet d'obtenir la TK avec un rendement de 32% et une activité spécifique de 37 U.mg⁻¹ [63].

2.2.2.2. TK d'*E. coli*

Deux gènes *tktA* et *tktB*, codant pour des enzymes ayant une activité TK, ont été identifiés chez la bactérie *E. coli*. Ces deux protéines TKTA et TKTB possèdent 74% d'acides aminés communs dans leur structure primaire. Le gène *tktA* est le plus exprimé dans *E. coli*. La protéine correspondante TKTA est responsable de 70 à 90% de l'activité enzymatique totale en conditions physiologiques, même si les deux gènes sont indispensables à la survie cellulaire. Elle est également la plus étudiée dans la littérature [64].

Des systèmes de production de la TK d'*E. coli*, impliquant différentes souches bactériennes hôtes et différents plasmides, ont été développés par plusieurs groupes à

petite et moyenne échelle et optimisés pour maximiser le rendement de la culture ainsi que l'activité et la stabilité de la TK [56], [57], [58]. Par la suite, le Pr. J. M. Woodley (Danemark) et ses collaborateurs ont décrit un protocole pour la production à grande échelle de la TK d'*E. coli*. Le gène *tktA* a été cloné dans un plasmide à haut nombre de copies de type pBGS18. Après transformation dans la souche d'*E. coli* JM107/pQR700, des cultures à grande échelle ont été réalisées en réacteurs de 20 et 1000 litres. La lyse des bactéries par un homogénéisateur haute-pression a permis d'obtenir un extrait cellulaire clarifié avec une activité de 230 U.mL⁻¹. Dans cet extrait, la TK représente 40% de la quantité totale de protéines [59].

Un protocole de purification, impliquant une précipitation au sulfate d'ammonium et deux chromatographies sur résines anioniques, a permis l'obtention de la TK d'*E. coli* avec un rendement de 45% et une activité spécifique de 50,4 U.mg⁻¹ [58]. Ce protocole a par la suite été simplifié grâce à l'ajout d'une étiquette six histidines (6-His), placée en position C-terminale [65], [66], permettant de purifier la TK par chromatographie d'affinité sur une résine Ni-NTA (nickel-acide nitriloacétique) [67].

2.2.2.3. TK de *G. stearothermophilus*

Les enzymes thermostables sont présentes dans les organismes thermophiles, c'est-à-dire capables de se développer à des températures élevées, comprises en 50°C et 70°C. Celles-ci présentent une grande capacité d'évolution (concept d'« *evolvability* » démontré par le Pr. F. Arnold et son équipe [68]). En effet, leur robustesse leur permet d'accepter des mutations bénéfiques, tout en conservant leurs propriétés catalytiques. De plus, elles présentent un grand nombre d'avantages pour leur utilisation en biocatalyse : leur thermostabilité permet de profiter de cinétiques réactionnelles plus rapides à haute température, d'augmenter leur stabilité en milieu non-conventionnel et peut faciliter leur purification par traitement thermique. Les TKs de *S. cerevisiae* et d'*E. coli*, communément utilisées en biocatalyse, ne sont pas considérées comme thermostables.

Ainsi, le groupe du Pr. L. Hecquet, en collaboration avec l'équipe du Dr. V. De Berardinis (Genoscope, CEA, Evry), a récemment identifié, produit et purifié la première TK thermostable microbienne, issue de la bactérie thermophile à Gram positif *G. stearothermophilus* [60] (Annotation A0A0I9QGZ2 - TKT_GEOSE dans la base de données UniProtKB). Ce microorganisme est largement répandu dans les sols, les sources chaudes et les sédiments océaniques, où la température est comprise entre 30°C

et 75°C [69] et est utilisé pour la production d'autres enzymes thermostables [70], [71]. Comme dans le cas de la TK de *S. cerevisiae* ou d'*E. coli*, la bactérie *B. anthracis* possède deux gènes *tkt1* et *tkt2*, codant pour deux isoenzymes de la TK : TKT1 et TKT2, respectivement, récemment cristallisées (3HYL.pdb et 3M49.pdb). Les gènes *tktA* chez *E. coli* et *tkl1* chez *S. cerevisiae* sont les plus exprimés et les isoenzymes correspondantes TKTA et TKL1, les plus actives. Le(s) gène(s) de la TK de *G. stearothermophilus* n'étant pas décrit(s) dans les bases de données publiques, il(s) a(ont) été identifié(s) par homologie de séquence, *via* la recherche, à partir de la séquence de la souche 10 de *G. stearothermophilus* disponible sur le serveur BLAST de l'Université d'Oklahoma, d'un gène orthologue au gène *tkt1* connu de *B. anthracis*, un microorganisme de la même famille *Bacillaceae*, comportant des microorganismes thermophiles. L'analyse du génôme de la TK de *G. stearothermophilus* a révélé la présence d'un seul gène *tkt*, possédant un pourcentage d'identité respectif de 55% et 72% avec les gènes *tkt1* et *tkt2* de *B. anthracis*, de 51% avec le gène *tktA* d'*E. coli* et de 48% avec le gène *tkl1* de *S. cerevisiae* [60].

Le gène codant pour la TK de *G. stearothermophilus* a ensuite été amplifié par PCR puis cloné dans le plasmide pGEN452. Après insertion du plasmide résultant pGEN717 dans la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS, une culture a été réalisée, puis la protéine a été purifiée par chromatographie d'affinité sur une résine Ni-NTA (grâce à l'ajout d'une étiquette 6-His à l'extrémité N-terminale de la protéine) et par choc thermique, avec un rendement de 77% et 73%, respectivement. L'activité spécifique de l'enzyme purifiée est de 1 U.mg⁻¹ à 20°C, 7,6 U.mg⁻¹ à 50°C et 11 U.mg⁻¹ à 70°C, son activité maximale ayant été mesurée à cette dernière température [60].

2.3. Etudes cristallographiques des TKs microbiennes

2.3.1. Structures tridimensionnelles

Des TKs issues de sources microbiennes ont été cristallisées et leur étude par diffraction des rayons X a permis de déterminer leur structure 3D. Quarante-sept structures de TKs sont, à ce jour, disponibles sur la base de données protéiques « Protein Data Bank » (PDB), provenant de dix-sept sources différentes, incluant des TKs issues de végétaux et d'organismes supérieurs. Elles sont cristallisées seules ou co-cristallisées en présence des cofacteurs uniquement, le ThDP et analogues et le Ca²⁺ ou Mg²⁺, mais aussi avec différents substrats donneurs ou accepteurs. Malgré la diversité des sources de TKs microbiennes dont les structures 3D sont connues, comme *S. cerevisiae* (1994) [72], [73],

E. coli (2007) [65], *Thermus thermophilus* (2007) (2E6K.pdb), *B. anthracis* (2009) (3HYL.pdb et 3M49.pdb), *Francisella tularensis* (2009) (3KOM.pdb), *Campylobacter jejuni* (2010) (3L84.pdb), *Burkholderia thailandensis* et *Burkholderia pseudomallei* (2011) (3UK1.pdb et 3UPT.pdb), *M. tuberculosis* (2012) [74], *Lactobacillus salivarius* (2015) [75], *Pseudomonase aeruginosa* (2015) (4XEU.pdb), *Pichia stipitis* (2017) (5HJE.pdb, 5HYV.pdb et 5I4I.pdb), *Neisseria gonorrhoeae* (2017) (5VRB.pdb) ou *Chlamydomonas reinhardtii* (2017) [76], toutes les TKs sont dimériques et constituées de deux sous-unités identiques, chacune ayant un poids moléculaire d'environ 74 kDa [77] et possédant un site actif situé à l'interface entre les deux sous-unités [95], [96] (Figure 6 a)).

Chaque sous-unité comporte environ 680 acides aminés et est composée de 3 domaines distincts [79] (Figure 6 b)) :

- le domaine N-terminal (domaine diphosphate, DP)
- le domaine intermédiaire (domaine pyrimidine, Pyr)
- le domaine C-terminal

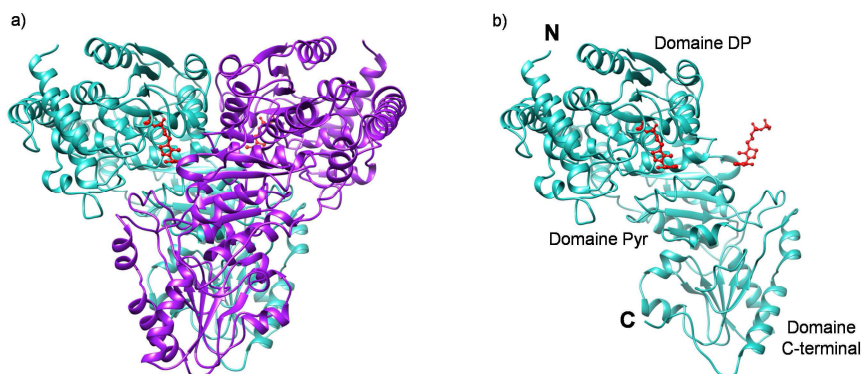


Figure 6 : Structure de la TK de *S. cerevisiae* (1TRK.pdb)

- a) Structure de l'homodimère (ThDP représenté en rouge)
 b) Les trois domaines d'un monomère (ThDP représenté en rouge)

Le domaine N-terminal et le domaine intermédiaire englobent les deux sites actifs et sont impliqués dans la reconnaissance et la liaison aux cofacteurs. En effet, deux sites de fixation pour le ThDP et le cation divalent Ca^{2+} ou Mg^{2+} sont localisés à proximité des deux sites actifs [78]. De plus, les interactions existant entre ces deux domaines favorisent la formation et la stabilisation du dimère, grâce notamment au réseau de liaisons hydrogènes entre le résidu E162 de la première sous-unité et les acides aminés E418 et E167 de la seconde sous-unité, dans la TK de *S. cerevisiae* [80]. Le domaine C-terminal, plus éloigné du site actif, n'intervient pas dans la liaison aux cofacteurs. Seuls quelques résidus qui le composent participent aux interactions entre les deux monomères [88], [95].

Sa présence ne semble pas essentielle à l'activité de la TK puisque des études réalisées sur la TK d'*E. coli* ont montré une conservation de son activité après suppression de ce domaine [34].

2.3.2. Etude du site actif des TKs

Depuis la détermination de sa structure cristallographique en 1994, réalisée en présence de ses cofacteurs et avec une résolution de 2 Å [72], [77], la TK de *S. cerevisiae* est la TK dont la structure et le mécanisme ont été les plus largement étudiés jusqu'à ce jour, notamment par les groupes du Pr. G. Schneider et du Pr. G. A. Kochetov (Russie). Les résidus clés du site actif ont été identifiés ainsi que leur rôle dans la catalyse et dans la reconnaissance des substrats, *via* l'analyse des interactions avec les cofacteurs et les substrats physiologiques, réalisée par des études cristallographiques couplées à des expériences de mutagenèse dirigée. Des études plus récentes de la structure cristallographique de la TK d'*E. coli* [65] ou de la TK humaine [81] montrent une forte homologie avec la TK de *S. cerevisiae*.

2.3.2.1. Interactions des résidus du site actif de la TK de *S. cerevisiae* avec les cofacteurs

Les cofacteurs ThDP et Ca^{2+} sont liés à l'interface des deux sous-unités de l'enzyme. Le ThDP est situé dans une cavité profonde au niveau de cette interface et interagit avec des résidus appartenant aux deux monomères *via* des interactions non covalentes [77] (Figure 7).

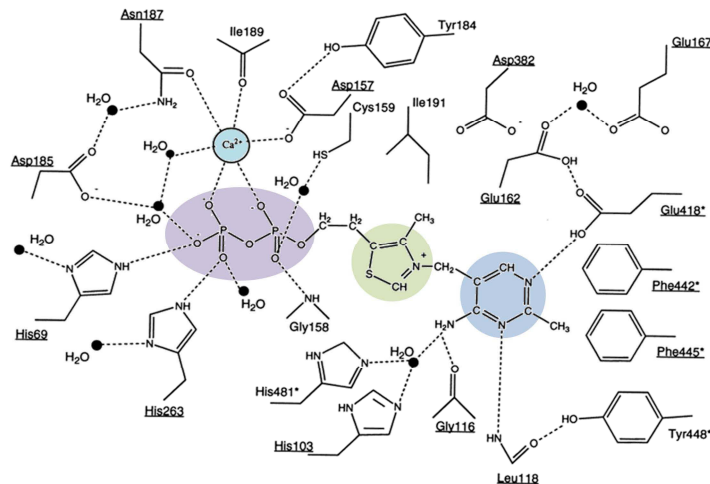


Figure 7 : Interactions entre les résidus du site actif de la TK de *S. cerevisiae* et les cofacteurs. Schéma adapté de la littérature [78]. Les résidus conservés sont soulignés et les résidus appartenant au second monomère sont désignés par un astérisque.

Son groupement diphosphate est lié au cation Ca^{2+} et à 3 molécules d'eau. Le cycle thiazolium du ThDP forme des liaisons de type Van Der Waals avec certains résidus du site actif. Le résidu D382 intervient dans la stabilisation de la charge du cycle thiazolium et est indispensable à la liaison du ThDP à l'enzyme. Le cycle pyrimidine, enfin, est stabilisé dans une zone hydrophobe par les résidus conservés F442, F445 et Y448 de la seconde sous-unité. Il est à noter la liaison hydrogène reliant l'azote N1' du cycle pyrimidine et le résidu invariant E418 protoné, présente chez toutes les enzymes ThDP-dépendantes [102], [103]. Celle-ci est essentielle à l'activité catalytique de l'enzyme [84] et intervient dans le mécanisme réactionnel décrit par la suite.

Les données cristallographiques montrent que le cation Ca^{2+} est essentiel pour que le ThDP se lie à l'apoenzyme. Le résidu D157 est particulièrement conservé puisqu'il appartient à la séquence consensus « GDG-X₃₀-NN » (Voir paragraphe 1., page 11 de ce manuscrit).

La présence des cofacteurs confère à l'enzyme une meilleure stabilité, grâce aux interactions entre le ThDP et le Ca^{2+} et deux feuillets β (correspondant aux séquences 187-198 du domaine N-terminal et 383-394 du domaine intermédiaire) de la TK, présents respectivement sur chacun des monomères. L'enzyme adopte alors une conformation plus compacte [85].

2.3.2.2. Interactions des résidus du site actif des TKs de *S. cerevisiae* et d'*E. coli* avec les substrats physiologiques

L'étude du site actif de la TK en présence de ses substrats physiologiques a fait l'objet de nombreux travaux. La TK de *S. cerevisiae* a en effet été co-cristallisée avec l'un de ses substrats accepteurs naturels, le D-E4P [86], tandis que la TK d'*E. coli* a été co-cristallisée avec deux de ses substrats donneurs naturels, le D-X5P et le D-F6P [65]. L'étroitesse de la cavité du site actif formée par les sous-unités de l'enzyme et le ThDP, implique que les deux substrats (donneur et accepteur) ne peuvent pas se fixer simultanément dans le site actif mais plutôt l'un après l'autre, en utilisant les mêmes sites de fixation [87].

Interactions des résidus du site actif de la TK de S. cerevisiae avec le substrat accepteur : le D-E4P

Les études cristallographiques, complétées par des expériences de mutagenèse dirigée, ont permis de proposer un modèle des interactions entre les résidus du site actif de la TK de *S. cerevisiae* et le D-E4P [86] (Figure 8).

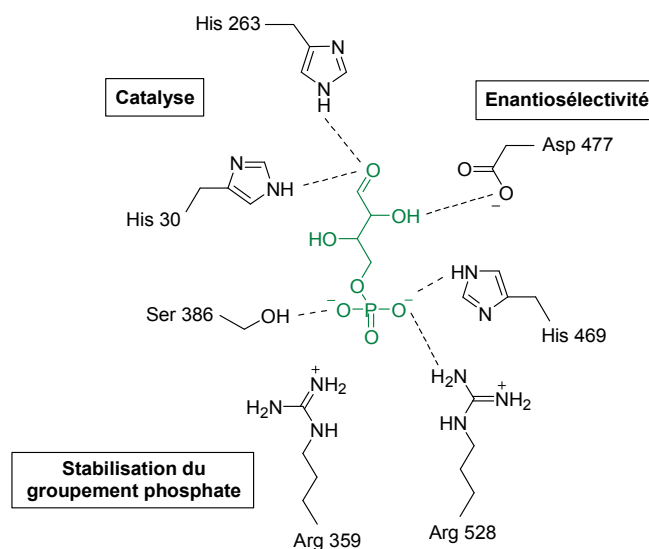


Figure 8 : Rôle et interactions des acides aminés du site actif de la TK de *S. cerevisiae* en présence du substrat accepteur naturel (D-E4P, en vert)

Quatre acides aminés conservés R528, S386, H469 et R359 prennent en charge le groupement phosphate de l'accepteur et permettent de fixer ce dernier dans la cavité profonde du site actif de l'enzyme. Si la TK possède la remarquable capacité à accepter des aldéhydes de taille variable (de 3 à 7 atomes de carbone), c'est grâce à la flexibilité apportée par ces quatre résidus, qui interagissent avec le groupement phosphate des substrats par des liaisons de faible énergie (liaisons hydrogènes et une liaison électrostatique) [86].

Une fois le substrat accepteur stabilisé dans le site actif, son groupement carbonyle est alors pris en charge par les deux histidines H30 et H263 du site actif, avec qui il établit des liaisons hydrogènes. Le rôle de l'histidine H263 dans l'activité catalytique de l'enzyme est prédominant [88].

Enfin, la fonction hydroxyle en alpha du carbonyle de l'accepteur interagit avec le groupement carboxylate du résidu D477. Cette interaction joue un rôle crucial dans le contrôle de

l'énantiosélectivité de la réaction catalysée par la TK. En effet, l'étude de la spécificité vis-à-vis du substrat accepteur a montré que la réaction catalysée par la TK est énantiosélective vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés de configuration (*R*). L'implication de cet acide aminé dans la reconnaissance de la fonction hydroxyle portée par le carbone 2 de l'accepteur et dans l'énantiosélectivité de la TK a été confirmée par des expériences de mutagenèse dirigée et par des études cinétiques [89].

Interactions des résidus du site actif de la TK d'E. coli avec les substrats donneurs : le D-X5P et le D-F6P

La TK d'*E. coli* a été co-cristallisée en 2007 en présence de deux cétooses donneurs physiologiques : le D-X5P et le D-F6P. Cette étude montre des interactions semblables à celles envisagées ou modélisées à partir de la TK de *S. cerevisiae* [65]. La Figure 9 indique les interactions avec le D-X5P, lié au ThDP.

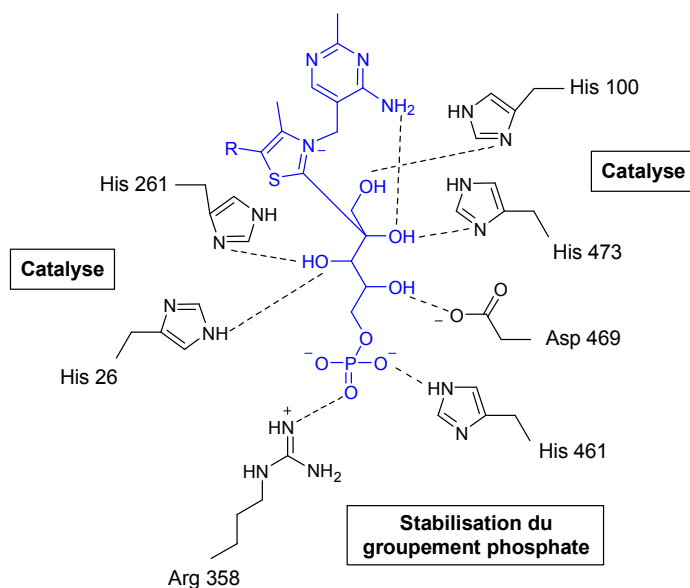


Figure 9 : Rôle et interactions des acides aminés du site actif de la TK d'*E. coli* en présence du substrat donneur naturel (D-X5P lié au ThDP, en bleu). R représente le groupement diphosphate du ThDP relié au cycle thiazolium par une fonction hydroxyéthyle.

Les groupements hydroxyles des atomes de carbone 1 et 2 interagissent respectivement avec les résidus H100 et H473 (H103 et H481 chez la TK de *S. cerevisiae*) et l'amine du cycle pyrimidine du ThDP. La liaison avec l'H100 permet de maintenir le D-X5P et l'intermédiaire « DHE-ThDP », décrit par la suite (Voir paragraphe 2.4.), dans une orientation optimale au sein du site de l'enzyme, afin de faciliter la réaction catalytique. Les résidus H261 et H26 (H263 et H30 chez la TK de *S. cerevisiae*) interagissent avec la

fonction hydroxyle du carbone 3 du substrat. L'acide aminé D469, correspondant au résidu D477 chez la TK de *S. cerevisiae*, est impliqué dans le contrôle de l'énantiosélectivité de la TK d'*E. coli*. Enfin, le groupement phosphate du D-X5P interagit avec les résidus H461 et R358 (H469 et R359 chez la TK de *S. cerevisiae*). La seule différence notable avec le mode de fixation du D-F6P, substrat donneur présentant un carbone de plus par rapport au D-X5P, est l'interaction de la S385 avec le groupement hydroxyle du carbone 5 du D-F6P [65].

2.3.3. Comparaison des résidus clés des sites actifs des TKs de *S. cerevisiae* et d'*E. coli*

Les études cristallographiques des TKs de *S. cerevisiae* et d'*E. coli*, couplées à des expériences de mutagenèse dirigée, ont démontré qu'au sein du site actif de ces deux enzymes, les mêmes acides aminés jouent un rôle clé dans la catalyse enzymatique, la stabilisation des substrats et le contrôle de l'énantiosélectivité (Tableau 1).

Rôle du résidu	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>
Catalyse	H30	H26
	H263	H261
	H481	H473
	H103	H100
Enantiosélectivité	D477	D469
Stabilisation du groupement phosphate du substrat	H469	H461
	R359	R358
	S386	S385
	R528	R520

Tableau 1 : Résidus clés du site actif de la TK de *S. cerevisiae* et d'*E. coli*

De plus, la superposition des structures cristallines de la TK de *S. cerevisiae* (1TRK.pdb) et d'*E. coli* (2R8O.pdb) montre que ces deux TKs microbiennes présentent un site actif très similaire. Les résidus clés intervenant dans le mécanisme catalytique et la reconnaissance des substrats physiologiques sont identiques et leurs positions presque superposables (Figure 10).

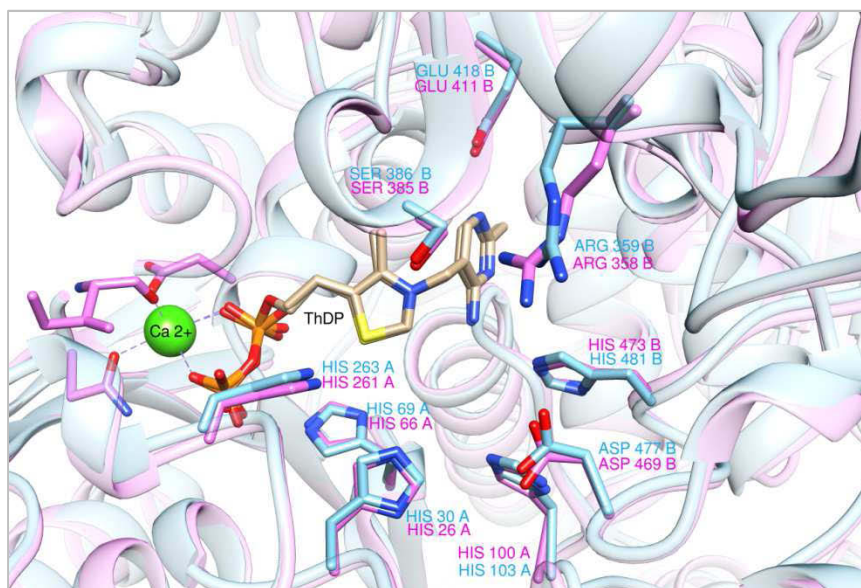


Figure 10 : Superposition des sites actifs de la TK de *S. cerevisiae* (1TRK.pdb, en bleu) et d'*E. coli* (1GQD.pdb, en rose) et en présence des cofacteurs (ThDP et Ca^{2+}). Notation : exemples : HIS 263 A : résidu His appartenant à la sous-unité A ; ASP 477 B : résidu Asp appartenant à la sous-unité B.

2.4. Mécanisme de la réaction catalysée par la TK

Le mécanisme de la réaction catalysée par la TK en présence du ThDP a tout d'abord été élucidé avec la TK de *S. cerevisiae* [77], [87], [90], puis des études réalisées avec la TK d'*E. coli* [65] ont montré que les mêmes résidus sont impliqués, seule la numérotation des positions des acides aminés change.

La réaction catalytique débute par la déprotonation du C2 du cycle thiazolium du ThDP, ce qui conduit à la formation d'un carbanion et à la forme « activée » du ThDP (appelée aussi forme ylure) [77], [90] (Figure 11). Au sein du site actif de l'enzyme, le ThDP adopte une conformation en V, dans laquelle le C2 du cycle thiazolium se situe à 3,1 Å de la fonction amine portée par le C4' du cycle pyrimidine [78].

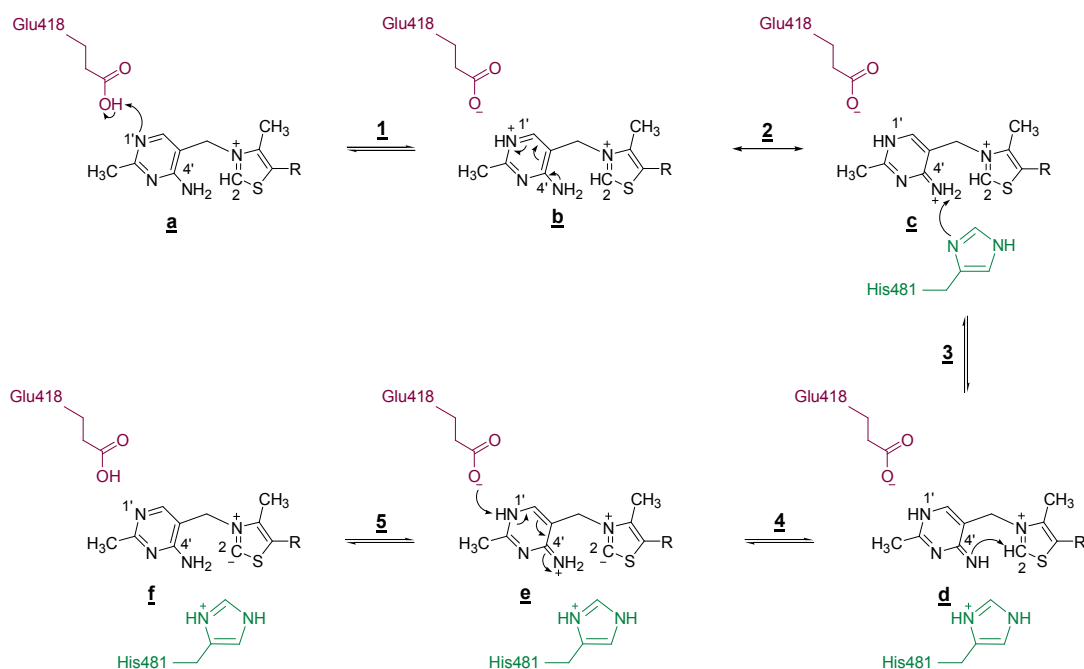


Figure 11 : Mécanisme d'activation du ThDP. R représente le groupement diphosphate du ThDP relié au cycle thiazolium par une fonction hydroxyéthyle.

Cette étape débute par le transfert d'un proton du résidu E418 vers l'amine N1' du cycle pyrimidine (étape **1**) du ThDP **a**, conduisant à la formation de l'intermédiaire **b**. La fonction amine portée par le C4' est ensuite convertie en groupement iminium (intermédiaire **c**) par effet mésomère (étape **2**). La déprotonation du groupement iminium par le résidu H481 (étape **3**) mène ensuite à la formation de la fonction imine (intermédiaire **d**). L'arrachement intramoléculaire du proton du C2 du cycle thiazolium (étape **4**) est réalisé par la fonction imine portée par le C4', conduisant à la formation d'un carbanion (intermédiaire **e**). La forme ylure du ThDP **f** se forme après déprotonation de la fonction amine N1'H par le résidu E418 et en raison de l'effet mésomère (étape **5**). Bien que la conformation en V du ThDP ne soit pas favorisée thermodynamiquement, elle permet la stabilisation du carbanion du C2 du cycle thiazolium par le groupement iminium du cycle pyrimidine [91], [92], [93].

Le mécanisme d'activation du ThDP, tel qu'il est décrit ci-dessus, est le plus communément admis mais il est toutefois controversé [78], [90], [94]. Notamment, le groupe du Pr. L. Hecquet a récemment proposé un nouveau mécanisme d'activation du ThDP concerté [94]. Cette étude montre que la déprotonation du C2 du cycle thiazolium du ThDP n'est pas réalisée par la fonction amine portée par le C4' du ThDP, mais par les résidus H481 et H103, impliquant un pont moléculaire avec la molécule d'eau HOH688A.

La présence d'une molécule d'eau cristallographique est nécessaire pour effectuer cette déprotonation, les résidus H481 et H103 n'étant pas assez proches des cycles thiazolium et pyrimidine du ThDP au sein du site actif de l'enzyme [77]. L'activation du ThDP passe ainsi par un processus intermoléculaire et non intramoléculaire, tel que décrit dans la littérature [94]. La fonction amine portée par le C4' du ThDP est convertie en un groupement iminium, assurant la stabilisation du carbanion ou carbène.

La réaction catalytique se poursuit par la fixation des substrats au sein du site actif de l'enzyme. Les substrats donneurs et accepteurs se fixent alternativement dans le site actif, selon un mécanisme de type « Bi-Bi, ping-pong » [87], [95], [96] (Figure 12).

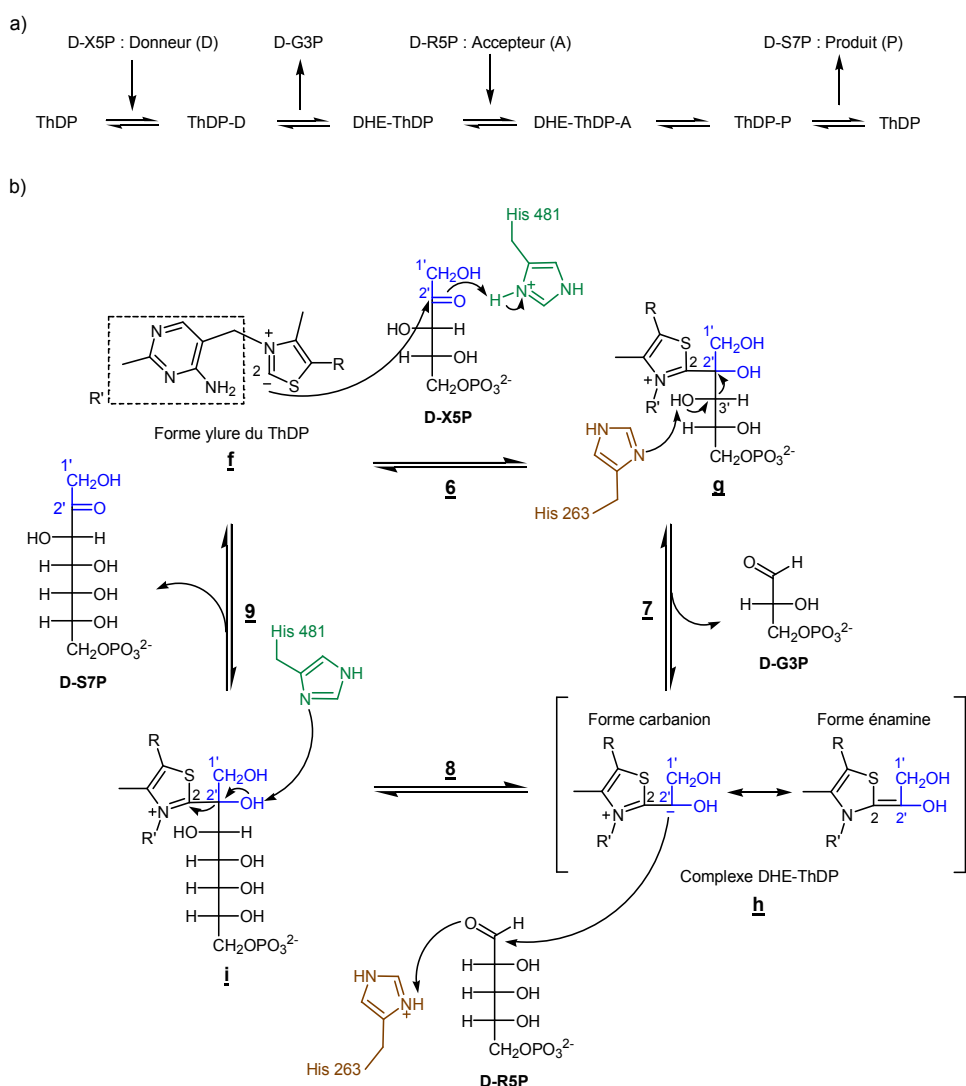


Figure 12 : Mécanisme de la réaction catalysée par la TK

a) Mécanisme de type « Bi-Bi, ping-pong ». b) Mécanisme détaillé du transfert du groupement « céto ». R représente le groupement diphosphate du ThDP relié au cycle thiazolium par une fonction hydroxyéthyle.

L'attaque nucléophile du carbanion de la forme ylure du ThDP (**f**) sur le groupement carbonyle du substrat donneur (Ex. : D-X5P) conduit à la formation de la liaison C2-C2' (étape **6**). Le groupement carbonyle du cétose phosphate peut être protoné, soit par le groupement iminium chargé positivement du cycle pyrimidine [78], soit par le résidu H481 [88] (cette dernière hypothèse est retenue dans le mécanisme décrit dans la Figure 12). Ensuite, les résidus H103 et H30 maintiennent le substrat donneur dans une conformation optimale [88], [97]. Le résidu H263 est alors parfaitement positionné pour arracher le proton du groupement hydroxyle du C3' du substrat donneur lié au ThDP (**g**) conduisant à la rupture de la liaison C2'-C3' du donneur [88], [98]. Il en résulte la formation du complexe α,β -dihydroxyéthyl-ThDP (DHE-ThDP) (**h**) appelé « donneur cétole activé », dont la charge négative est stabilisée par effet mésomère (étape **7**). Le D-G3P est alors libéré.

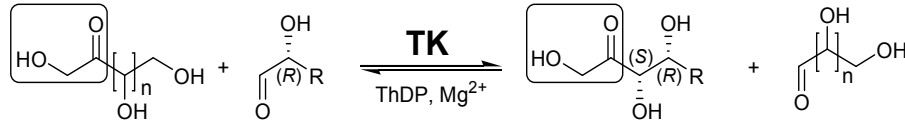
Lorsqu'un substrat accepteur entre dans le site actif (Ex. : le D-R5P), le C2' du complexe DHE-ThDP attaque alors la face *ré* de la fonction aldéhyde de ce substrat, l'oxygène étant protoné par l'H263 (étape **8**). Le nouveau carbone asymétrique formé est ainsi de configuration (S) (**i**). La rupture de la liaison C2-C2', *via* la déprotonation du groupement hydroxyle porté par le C2' par la fonction amine de l'H481, conduit à la libération du produit final (Ex. : D-S7P) de configuration (3S, 4R) et du ThDP (**f**) (étape **9**). Le produit final étant un cétose, il peut alors devenir lui-même substrat donneur et rendre la réaction réversible (Figure 12).

2.5. Etude de la spécificité de substrat de la TK

2.5.1. Substrats donneurs

2.5.1.1. Spectre d'activité

La réaction catalysée *in vivo* par la TK est une réaction réversible. Les cétoles phosphorylés : le D-X5P, le D-S7P et le D-F6P, substrats donneurs naturels de groupement « cétole » de la TK, sont très coûteux et peuvent être remplacés par des cétoles non phosphorylés plus accessibles, tels que la dihydroxyacétone (DHA) (C3), le L-érythrulose, le 4-désoxy-D,L-érythrulose et le 4-désoxy-L-érythrulose (C4), ou encore le L-sorbose, le D-fructose et le D-*altro*-heptulose (C6), ce dernier étant noté D-sédoheptulose dans la suite du manuscrit (C7) (Tableau 2). Toutefois, une stratégie de déplacement d'équilibre est requise afin d'utiliser ces substrats donneurs à des fins synthétiques.



Cétose donneur non phosphorylé			Aldéhyde généré		
n	Configuration	Nom	n	Configuration	Nom
0	-	DHA ^[47]	0	-	Formaldéhyde
1	(3S)	L-érythrose ^[99]	0	-	Glycolaldéhyde
1	(3R,S)	4-désoxy-D,L-érythrose ^[99]	0	-	Acétaldéhyde
1	(3S)	4-désoxy-L-érythrose ^[99]	0	-	Acétaldéhyde
3	(3S, 4R, 5S)	L-sorbose ^[100]	2	(2R, 3S)	L-thréose
3	(3S, 4R, 5R)	D-fructose ^[100]	2	(2R, 3R)	D-érythrose
4	(3S, 4R, 5R, 6R)	D-sédoheptulose ^[100]	3	(2R, 3R, 4R)	D-ribose

Tableau 2 : Réaction réversible catalysée par la TK en présence de cétooses non phosphorylés utilisés comme substrats donneurs

Les cétooses, phosphorylés ou non, peuvent être remplacés par l'acide hydroxypyruvique (HPA), un α -cétoacide donneur de groupement « céto », dont la décarboxylation au cours de la réaction permet de rendre celle-ci irréversible. L'hydroxypyruvate de lithium ou Li-HPA est très souvent utilisé en remplacement de la forme acide de ce composé, très coûteuse. La synthèse communément utilisée fournit également le HPA sous forme de sel de lithium [101], [102]. Cette découverte a permis d'exploiter le potentiel synthétique de la TK pour la synthèse de cétooses et analogues [48] (Figure 13).

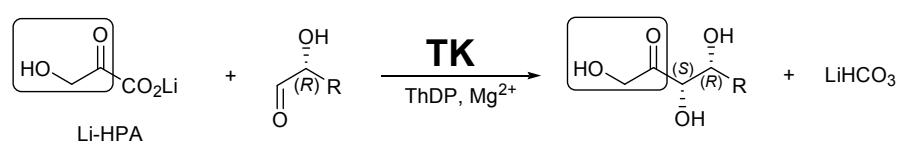
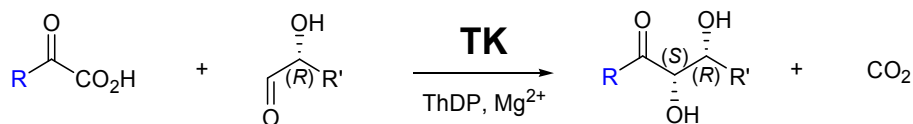


Figure 13 : Réaction irréversible catalysée par la TK en présence du Li-HPA

Un large éventail d' α -cétoacides, analogues du HPA, a été envisagé comme substrats donneurs de la TK de *S. cerevisiae*, en présence desquels la réaction devient également irréversible (Tableau 3).



Groupement R	α-Cétoacide	Ref.	Groupement R	α-Cétoacide	Ref.
-CH ₂ Cl	Acide chloropyruvique	[103] [104] [105]	-CH ₃	Acide pyruvique	[106] [103] [105]
-CHCl ₂	Acide dichloropyruvique	[104]	-H	Acide glyoxylique	[103] [105]
-CH ₂ Br	Acide bromopyruvique	[104]	-CH ₂ SH	Acide mercaptopyruvique	[103] [105]
-CHBr ₂	Acide dibromopyruvique	[104]	-CH ₂ COOH	Acide oxaloacétique	[106]
-CH ₂ F	Acide fluoropyruvique	[104]	-CH(S)OH-CH(R)OH- CH(R)OH-CH ₂ OH	Acide 2-cétogluconique	[106]
-CHF ₂	Acide difluoropyruvique	[104]	-	-	[107]

Tableau 3 : α-Cétoacides testés comme substrats donneurs potentiels de la TK

L'acide pyruvique, l'acide chloropyruvique, l'acide mercaptopyruvique et l'acide glycolique ont été testés comme substrats donneurs potentiels par l'équipe du Pr. L. Hecquet. Une activité TK a été détectée en présence de l'acide glyoxylique à l'échelle analytique. Ce résultat a par la suite été confirmé par l'obtention du D-thréose, du D-altrose et du L-glucose à l'échelle préparative, obtenus respectivement à partir du D-glycéraldéhyde, du D-ribose et du L-arabinose et en présence de l'acide glyoxylique comme substrat donneur de groupement « formyle ». Cependant, les cinétiques réactionnelles sont extrêmement lentes et les rendements obtenus sont inférieurs à 10% [103], [105]. Toutefois, ce résultat est particulièrement intéressant puisqu'il permettrait l'accès à une large variété d'aldoses. D'autres études analytiques, réalisées par le groupe du Pr. G. A. Kochetov, ont montré que des analogues halogénés de l'acide pyruvique sont des substrats donneurs de la TK [104]. Néanmoins, ces composés n'ont pas été utilisés en présence de substrats accepteurs à des fins synthétiques pour accéder aux analogues de cétooses correspondants. Enfin, le Pr. U. Hanefeld et son équipe (Pays-Bas) ont utilisé d'autres α-cétoacides comme substrats donneurs potentiels de la TK : l'acide oxaloacétique et l'acide 2-cétogluconique. Cependant, aucune activité n'a été détectée à l'échelle analytique, en présence du glycolaldéhyde comme substrat accepteur [106].

2.5.1.2. Paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques (constante de Michaelis-Menten, notée K_M et vitesse maximale notée V_{max}) des principaux substrats donneurs physiologiques ou non de la TK de *S. cerevisiae* et d'*E. coli* ont été mesurés, en présence de différents aldéhydes accepteurs naturels ou non naturels (Tableau 4). Bien que le HPA ait un K_M supérieur à celui des substrats physiologiques, c'est le donneur le plus couramment utilisé en synthèse car, comme indiqué précédemment, il rend la réaction irréversible.

	TK <i>S. cerevisiae</i>			TK d' <i>E. coli</i>		
	K_M [mM]	V_{max} [U.mg ⁻¹]	V_{max}/K_M [U.mg ⁻¹ .mM ⁻¹]	K_M [mM]	V_{max} [U.mg ⁻¹]	V_{max}/K_M [U.mg ⁻¹ .mM ⁻¹]
D-X5P	0,21 ^[108]	20 ^[99]	95,2	0,16 ^[58]	≥ 110 ^[58]	≥ 687
D-F6P	1,8 ^[108]	-	-	1,1 ^[58]	62 ^[58]	56
D-S7P	-	-	-	4 ^[58]	6 ^[58]	1,5
HPA	7 ^[109] - 33 ^[110]	9 ^[37]	1,28-0,27	18 ^[58]	60 ^[58]	3,3
L-érythrose	4,9 ^[108]	2,6 ^[99]	0,5	18 ^[60]	12 ^[60]	0,7
Acide glyoxylique	-	0,54-0,65 ^{[103], [105]}	-	-	-	-

Tableau 4 : Paramètres cinétiques de la TK de *S. cerevisiae* et d'*E. coli* vis-à-vis de quelques substrats donneurs physiologiques ou non

2.5.2. Substrats accepteurs

2.5.2.1. Spectre d'activité

Les substrats accepteurs non naturels de la TK conduisant aux meilleures activités, dérivent des substrats physiologiques, c'est-à-dire les substrats polyhydroxylés et phosphorylés. Toutefois, une large variété d'aldéhydes non-phosphorylés a été décrite comme substrats accepteurs des TKs de *S. cerevisiae*, d'*E. coli* et de feuilles d'épinards par différents groupes, en utilisant le HPA comme substrat donneur [37], [105], [111]. Les représentants les plus significatifs des différentes familles d'aldéhydes testés sont indiqués dans le Tableau 5. Le substrat non phosphorylé en présence duquel la TK est la plus active est le glycolaldéhyde [112], [113], [114]. Le Tableau 5 regroupe les vitesses relatives (V_{rel}) de la TK de *S. cerevisiae* vis-à-vis d'un large panel d'aldéhydes accepteurs [109], [112], [114]. Le glycolaldéhyde est utilisé comme substrat de référence pour le calcul des V_{rel} .

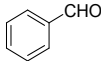
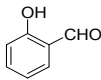
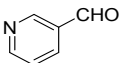
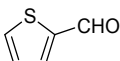
	Substrat accepteur	Vitesse relative V_{rel} [%]	
Substrat de référence	glycolaldéhyde : CH ₂ OH-CHO	100	
Aldéhydes « naturels » non phosphorylés	D-érythrose	84	
	D-ribose	30	
Aldéhydes polyhydroxylés	D-glycéraldéhyde : CH ₂ OH-CHOH-CHO (<i>R</i>)	78	
	L-glycéraldéhyde : CH ₂ OH-CHOH-CHO (<i>S</i>)	<1	
	D,L-glycéraldéhyde : CH ₂ OH-CHOH-CHO (<i>R,S</i>)	55	
	L-thréose	39	
	D-glucose	4	
Aldéhydes non hydroxylés en α	CH ₃ -CHOH-CH ₂ -CHO (<i>R, S</i>)	29	
	CH ₂ OH-CHOH-CH ₂ -CHO (<i>R, S</i>)	43	
	CH ₂ OH-CHOH-CH ₂ -CHO (<i>R</i>)	45	
Aldéhydes hydroxylés en α et non hydroxylés en β	CH ₃ -S-CH ₂ -CHOH-CHO (<i>R, S</i>)	33	
	CH ₃ -O-CH ₂ -CHOH-CHO (<i>R, S</i>)	20-27	
	D,L-lactaldéhyde : CH ₃ -CHOH-CHO (<i>R, S</i>)	44	
	CH ₂ F-CHOH-CHO (<i>R, S</i>)	47	
	CH ₃ -CH ₂ -CHOH-CHO (<i>R, S</i>)	33	
	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -CHOH-CHO (<i>R, S</i>)	22	
	(CH ₃) ₃ C-CHOH-CHO (<i>R, S</i>)	11	
	CH ₂ OH-CH ₂ -CHOH-CHO (<i>R, S</i>)	< 10	
Aldéhydes non hydroxylés	Acétaldéhyde : CH ₃ -CHO	25	
	Butanal : CH ₃ -(CH ₂) ₂ -CHO	11	
Aldéhydes éthyléniques	(CH ₃) ₂ -C=CH-CHO	11	
	CH ₂ =CH-CHOH-CHO (<i>R, S</i>)	56	
	CH ₂ =CH-CH ₂ -CHOH-CHO (<i>R, S</i>)	28	
	CH ₂ =CH-(CHOH) ₂ -CHO (<i>2R, 3S</i>)	36	
	CH ₂ =CH-(CHOH) ₂ -CHO (<i>2R, 3R</i>)	32	
Aldéhydes aromatiques		< 10	
		28	
Aldéhydes hétérocycliques		13	
		32	

Tableau 5 : Vitesses relatives (V_{rel}) d'un panel de substrats accepteurs de la TK de *S. cerevisiae*

En présence d'aldéhydes polyhydroxylés, l'activité de la TK diminue avec l'élongation de la chaîne carbonée. L'activité vis-à-vis du D-glucose (C6) est plus faible que celle vis-à-vis du D-ribose (C5), elle-même inférieure à celle vis-à-vis du D-érythrose (C4) ou encore à celle vis-à-vis du D-glycéraldéhyde (C3).

Les aldéhydes α -hydroxylés de configuration (2R) sont très préférentiellement acceptés par la TK par rapport aux aldéhydes α -hydroxylés (2S), conduisant exclusivement à des cétooses de configuration D-*thréo* (3S, 4R). Plusieurs études ont mis en évidence la haute énantiosélectivité de la TK de *S. cerevisiae* et d'*E. coli* en faveur des aldéhydes α -hydroxylés (2R) : aucune réaction n'a lieu en présence du L-glycéraldéhyde [109], [115], [116], alors que le D-glycéraldéhyde réagit presque aussi bien que le glycolaldéhyde [115]. Des résultats similaires ont été obtenus avec la TK de feuilles d'épinards en présence d'aldéhydes α -hydroxylés à 5 atomes de carbone : l'utilisation du D-ribose, du L-lyxose, du L-arabinose et du D-xylose, de configuration (2R), conduit à l'obtention du D-sédoheptulose, du L-*galacto*-heptulose, du L-*gluco*-heptulose et du D-*ido*-heptulose, respectivement, en présence du HPA comme substrat donneur, tandis que les aldoses correspondants de configuration (2S) ne sont pas acceptés [100]. Cette propriété a été exploitée pour dédoubler des mélanges racémiques d'aldéhydes α -hydroxylés, afin d'obtenir des aldéhydes α -hydroxylés de configuration (2S) [117].

Si les aldéhydes α -hydroxylés (2S) ne sont pas convertis par la TK, plusieurs études ont montré que leurs analogues (2S) phosphorylés étaient de meilleurs substrats. Des activités ont en effet été détectées à l'échelle analytique en présence de la TK de *S. cerevisiae* vis-à-vis du L-glycéraldéhyde-3-phosphate (L-G3P) (C3) [108], du D-thréose-4-phosphate (D-T4P) (C4) [118] et du D-arabinose-5-phosphate (D-A5P) (C5) [108], [118]. Cependant, ces activités sont faibles ou très faibles et les résultats n'ont pas été confirmés à plus grande échelle, *via* la caractérisation des cétooses L-*érythro* (3S, 4S) phosphorylés correspondants. Par ailleurs, le D-arabinose-5-phosphate est décrit comme substrat inhibiteur de la TK d'*E. coli* avec un K_i de 6 mM [58].

L'activité de la TK est également influencée par la configuration du carbone 3 des aldéhydes polyhydroxylés. A titre d'exemple, la TK est deux fois plus active vis-à-vis du D-érythrose (2R, 3R) que vis-à-vis du L-thréose (2R, 3S). La configuration (3R) semble donc être privilégiée. Cette tendance a été confirmée par la détermination des K_M de la TK de feuilles d'épinards vis-à-vis du D-ribose (2R, 3R, 4R) et du L-lyxose (2R, 3R, 4S), significativement inférieurs à ceux mesurés vis-à-vis du D-xylose (2R, 3S, 4R) et du L-arabinose (2R, 3S, 4S), respectivement [100].

Les aldéhydes non- α -hydroxylés sont acceptés par la TK mais avec une moindre activité, comparée à celles obtenues avec des aldéhydes α -hydroxylés. Par exemple, l'activité vis-à-vis de l'acétaldéhyde ne représente que 25% de celle vis-à-vis du glycolaldéhyde. On notera que dans le cas de ces aldéhydes non- α -hydroxylés, la configuration du carbone 3 ne semble plus aussi cruciale. Toutefois, la configuration (3*R*) apparaît légèrement plus favorable. Ce résultat a été corroboré par la détermination des paramètres cinétiques de la TK de *S. cerevisiae* vis-à-vis d'un panel d'aldéhydes hydroxylés en position β et non hydroxylés en position α [119]. Les aldéhydes α -hydroxylés et non β -hydroxylés n'engendrent eux, qu'une faible perte d'activité. Effectivement, des activités similaires sont obtenues vis-à-vis du D,L-glycéraldéhyde et du D, L-lactaldéhyde.

La présence d'une double liaison ne semble pas influencer l'activité de la TK, sauf lorsque l'insaturation est située en position α - β de la fonction aldéhydique.

Par ailleurs, la TK accepte des aldéhydes aliphatiques, aromatiques et hétéroaromatiques. Néanmoins, les activités mesurées sont faibles (10% à 32% de celle vis-à-vis du glycolaldéhyde). Pour les aldéhydes aliphatiques, il est à noter une diminution de l'activité en fonction de l'allongement de la chaîne carbonée : l'activité vis-à-vis du butanal est par exemple deux fois plus faible environ que celle vis-à-vis de l'acétaldéhyde. Un résultat semblable a été décrit en présence de la TK d'*E. coli*, vis-à-vis d'un panel d'aldéhydes aliphatiques (C3-C8) [120]. Des aldéhydes aromatiques tels que le benzaldéhyde sont également substrats de la TK, dont l'activité est améliorée par la présence d'un groupement hydroxyle en position *ortho* de l'aldéhyde ou d'un hétéroatome au sein du cycle.

Enfin, des aldéhydes α -hydroxylés plus exotiques, ne figurant pas dans le Tableau 5 et possédant notamment un groupement alcyne, cyano, azoture ou encore 1,3-dithiane, sont acceptés par la TK, mais avec de faibles activités [37], [105], [111]. De surcroît, le nitrosobenzène, substitué par des groupements NO₂, CF₃, H, Cl, CH₃, C₆H₅ et OC₆H₅, a été décrit comme substrat accepteur de la TK de *S. cerevisiae*, permettant l'obtention d'analogues de l'acide hydroxamique, en présence du D-X5P comme substrat donneur [121].

2.5.2.2. Paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques K_M et V_{max} des TKs de *S. cerevisiae* et d'*E. coli*, déterminés vis-à-vis de quelques substrats accepteurs physiologiques ou non et en présence de

substrats donneurs naturels ou non naturels, sont référencés dans la littérature (Tableau 6). Les rapports V_{max}/K_M , déterminés en présence des aldéhydes phosphorylés naturels, sont largement supérieurs à ceux mesurés en présence des aldéhydes non phosphorylés. De plus, les valeurs de K_M obtenues vis-à-vis de ces derniers augmentent très nettement avec l'allongement de la chaîne carbonée, traduisant une faible affinité de l'enzyme pour les aldéhydes non phosphorylés et à longue chaîne polyhydroxylée (Tableau 6).

	TK de <i>S. cerevisiae</i>		TK d' <i>E. coli</i>	
	K_M [mM]	K_M [mM]	V_{max} [U.mg ⁻¹]	V_{max}/K_M [U.mg ⁻¹ .mM ⁻¹]
D-R5P	0,4 ^[108]	1,4 ^[58]	50,4 ^[58]	36
D-E4P	-	0,09 ^[58]	≥ 110 ^[58]	≥ 1222
D,L-G3P	-	2,1 ^[58]	100 ^[58]	48
Formaldéhyde	4,9 ^[58]	3,1 ^[58]	12,5 ^[58]	4
Glycolaldéhyde	21 ^[122]	14 ^[58]	60 ^[58]	4,3
D-glycéraldéhyde	40 ^[122]	48 ^[122]	-	-
D,L-glycéraldéhyde	45 ^[122]	10 ^[58]	25 ^[58]	2,5
D-érythrose	214 ^[122]	150 ^[58]	75 ^[58]	0,5
D-ribose	-	1400 ^[58]	25 ^[58]	0,018

Tableau 6 : Paramètres cinétiques de quelques substrats accepteurs des TKs de *S. cerevisiae* et d'*E. coli*

2.5.3. Conclusions

L'emploi du HPA comme substrat donneur de la TK permet de rendre la réaction irréversible, un avantage certain pour l'utilisation de cette enzyme en synthèse organique. Si la TK accepte une très large variété d'aldéhydes accepteurs, parfois très éloignés structurellement de ses substrats naturels, beaucoup conduisent à de faibles vitesses relatives, notamment les aldéhydes polyhydroxylés non phosphorylés à longue chaîne (C5-C6), les aldéhydes aliphatiques, aromatiques et hétéroaromatiques. Afin d'augmenter l'activité spécifique de la TK sauvage vis-à-vis de ces aldéhydes, deux stratégies peuvent être suivies : soit en recherchant de nouvelles TKs au sein de la biodiversité (métagénomique), soit en façonnant artificiellement la TK par ingénierie, en faisant appel aux techniques de la Biologie Moléculaire et du Génie Génétique. La première approche n'a pas été envisagée avec cette enzyme. Seule la seconde approche a fait l'objet de travaux décrits dans la littérature et sera donc développée dans cette étude bibliographique.

3. Modification ou amélioration des propriétés de la TK par Evolution dirigée

L'Evolution dirigée est un outil privilégié pour améliorer ou modifier les différentes caractéristiques d'une enzyme. Concernant la TK, les travaux décrits dans la littérature portent sur la modification et l'amélioration de la spécificité de substrat accepteur, de la stéréosélectivité et de la thermostabilité et sont développés par deux groupes européens depuis une dizaine d'années : l'équipe des Pr. P. Dalby et H. E. Hailes (Royaume-Uni) et l'équipe du Pr. U. Hanefeld (Pays-Bas). A la suite d'une brève introduction décrivant les principes généraux de cette technologie, un bilan des différentes techniques développées et appliquées à la TK sera dressé, c'est-à-dire la construction de banques de TKs mutées et la mise au point de tests de sélection et de tests de criblage de cette enzyme. Puis les résultats obtenus avec les TKs mutées les plus performantes seront présentés et discutés.

3.1. L'Evolution dirigée

Si grâce à l'Evolution, les enzymes sont parfaitement optimisées pour remplir une fonction biologique spécifique au sein d'un organisme vivant, elles ne sont pas forcément adaptées aux conditions requises pour leur utilisation dans des conditions non-physiologiques et en présence de substrats non naturels. En effet, les enzymes sont souvent spécifiques des substrats proches de leurs substrats naturels, peuvent être inhibées par de fortes concentrations en substrat ou en produit et ne sont généralement stables qu'en milieu physiologique, sur une courte durée. Ces paramètres peuvent être autant de facteurs limitant leur utilisation en biocatalyse.

Il est possible d'optimiser une enzyme pour une propriété recherchée grâce à une méthode reproduisant *in vitro* et de façon accélérée l'évolution et la sélection naturelle : l'Evolution dirigée ou *in vitro*. Un processus d'évolution ciblant une caractéristique précise est ainsi amorcé et l'échelle de temps est alors réduite du million d'années à quelques mois seulement. Cette technologie, créée au début des années 1990 par le Pr. W. P. C. Stemmer (Pays-Bas) [3] et le Pr. F. Arnold (Etats-Unis) [4], s'est révélée être un outil puissant pour façonner une enzyme. L'évolution dirigée comporte typiquement trois grandes étapes successives : 1) la création d'une diversité génétique, 2) un test de

criblage ou de sélection, et 3) l'amplification de la nouvelle propriété par itération des deux premières étapes (Figure 14).

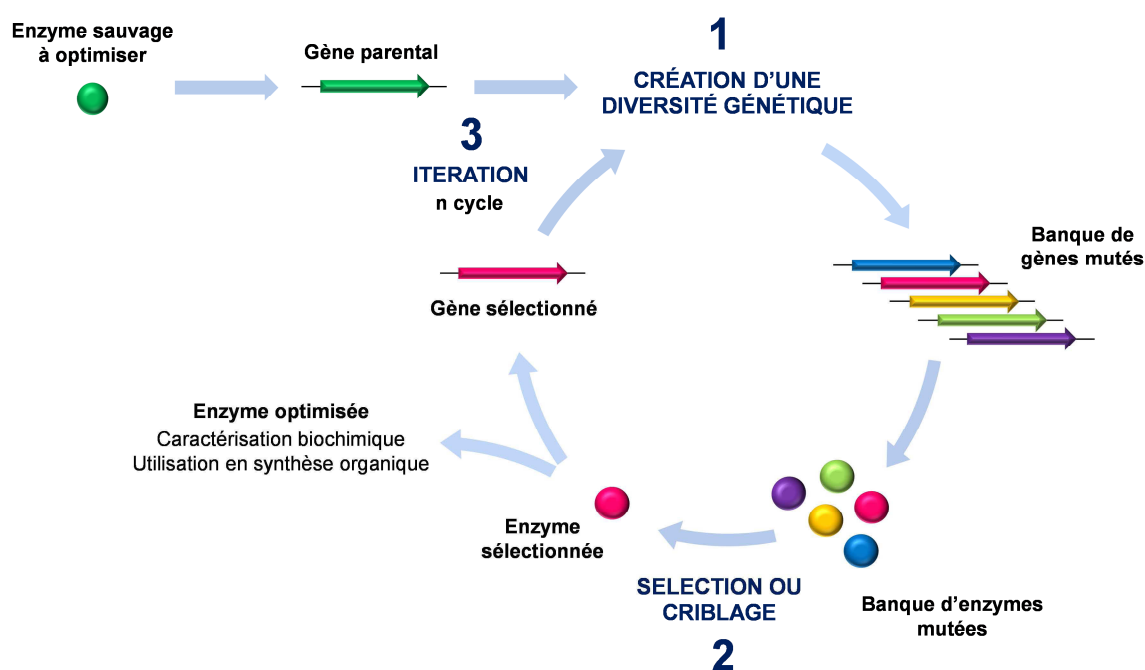


Figure 14 : Principe de l'Evolution dirigée

La première étape consiste à créer une diversité génétique à partir d'un gène parental. Il existe de nombreuses techniques permettant de créer des banques (ou bibliothèques) de gènes mutés, comme par exemple les techniques de mutagenèse ou de recombinaison entre gènes d'une même famille. Les enzymes mutées sont ensuite produites dans une cellule hôte appropriée à partir des gènes mutés correspondants. La seconde étape permet de mettre en évidence les enzymes mutées qui présentent la ou les propriété(s) recherchée(s), soit par un test de sélection, soit par un test de criblage. L'ensemble est un processus itératif (troisième étape) : les enzymes mutées retenues après sélection ou criblage peuvent être à leur tour soumises à de nouveaux cycles, jusqu'à l'obtention d'une protéine optimisée pour la ou les propriété(s) recherchée(s). Une caractérisation biochimique plus fine de cette dernière est alors effectuée. Elle pourra ensuite être utilisée comme biocatalyseur performant en synthèse organique pour accéder à de nouveaux produits d'intérêt [123].

L'évolution dirigée a permis le développement de nombreuses protéines ayant de nouvelles propriétés : résistance à haute température, tolérance vis-à-vis de pH non physiologiques et de solvants organiques, amélioration et modification de la spécificité de

substrat, de la stéréosélectivité ou encore de l'énantiosélectivité [124], [125]. Un bel exemple d'application est le travail du Pr. M. T. Reetz (Allemagne) et son équipe, sur la modification de l'énantiosélectivité de lipases, basé sur la combinaison de différentes techniques de mutagenèse couplées à un test de criblage à haut débit [126]. L'objectif est d'augmenter le coefficient d'énantiosélectivité E [127] de la lipase de *Pseudomonas aeruginosas* pour le dédoublement cinétique d'un ester chiral par hydrolyse. La lipase sauvage de *P. aeruginosa* présente un faible E de 1,1 vis-à-vis de l'énantiomère (S). L'enchaînement de différentes stratégies de mutagenèse appliquées aux lipases mutées présentant les meilleurs E à l'issue de chaque cycle, a permis finalement d'obtenir une lipase mutée présentant un E supérieur à 51 [128].

3.2. Construction des banques d'enzymes mutées

3.2.1. Création de la diversité au niveau des gènes

Au cours des trente dernières années, le développement des outils de la Biologie Moléculaire et du Génie Génétique a permis l'émergence de nombreuses techniques, visant à créer une diversité génétique au niveau du gène codant pour la protéine d'intérêt. Pour obtenir un ensemble de gènes modifiés, deux stratégies principales peuvent être envisagées : soit par recombinaison aléatoire *in vitro* des différentes séquences nucléotidiques d'un ou plusieurs gène(s) parental(aux), le « *DNA shuffling* », de l'anglais « *shuffle* » : brasser, une technique décrite pour la première fois par le Pr. W. P. C. Stemmer et son équipe en 1994 [3], soit par mutagenèse à partir d'un gène parental codant pour l'enzyme d'intérêt. Seule la seconde stratégie sera développée ici.

Afin de créer une diversité génétique à partir d'un gène parental par mutagenèse, une première approche dite aléatoire s'est développée dans les années 1990, dans laquelle des mutations sont effectuées à des endroits non définis dans la séquence nucléotidique du gène d'intérêt. La technique la plus ancienne et la plus communément utilisée est appelée « PCR infidèle » ou en anglais « *error-prone PCR* » [129], [130], reposant sur l'utilisation d'une ADN polymérase de *Thermus aquaticus*, la Taq polymérase (EC 2.7.7.7) [131] et générant de très larges banques. Une meilleure connaissance de la structure 3D et de la fonction des protéines a conduit au développement de stratégies plus ciblées, visant à introduire des mutations sur un acide aminé précis. L'essor de cette approche rationnelle a permis de limiter la taille des banques d'enzymes mutées générées. La frontière entre ces deux approches tend depuis plusieurs années à s'effacer et des

approches semi-rationnelles sont de plus en plus adoptées (Figure 15). Seules les approches rationnelles et semi-rationnelles seront présentées par la suite.

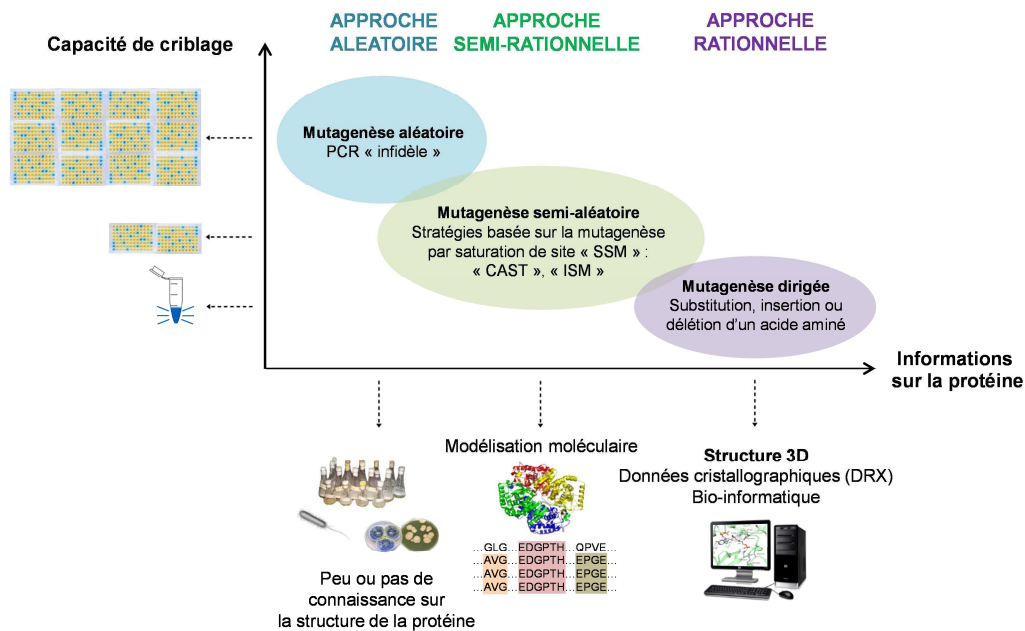


Figure 15 : Création d'une diversité génétique par mutagenèse à partir d'un gène parental selon une approche aléatoire, rationnelle et semi-rationnelle

3.2.1.1. Approche rationnelle

Cette approche requiert une bonne connaissance de la structure, de la fonction et du mécanisme de la protéine. La technique utilisée est la mutagenèse dirigée, qui a pour but de substituer un acide aminé par un autre en une position précise dans la séquence d'ADN d'intérêt.

La méthode la plus utilisée est la méthode « QuikChange® site-directed mutagenesis » brevetée par la firme Stratagene (Brevet : US 5789166 A), car elle est simple et rapide. Les mutations sont introduites directement à partir du plasmide contenant le gène d'intérêt et de deux amorces nucléotidiques complémentaires contenant la mutation désirée, qui peut être soit un échange de bases (substitution), une insertion ou une délétion (Figure 16).

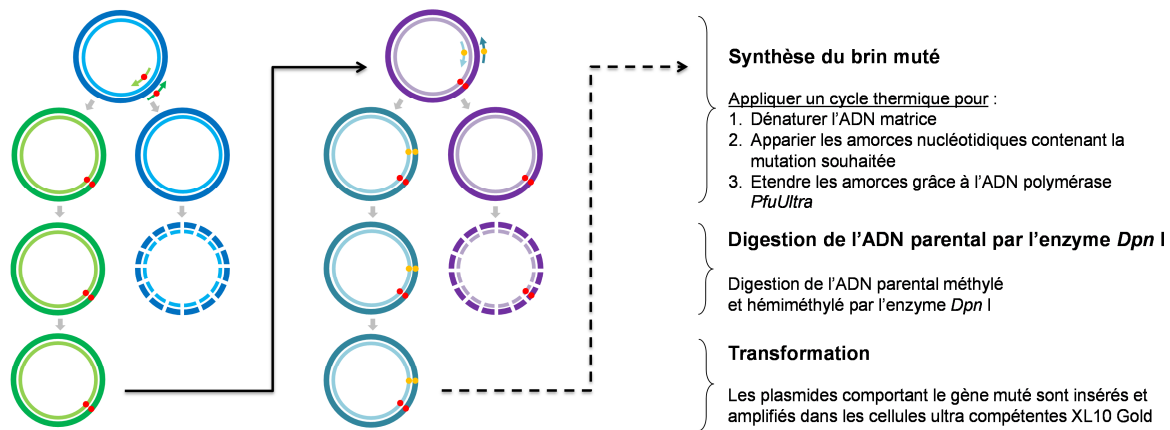


Figure 16 : Principe de la méthode QuikChange®

Schéma adapté du manuel « QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit »

La première étape consiste à concevoir et synthétiser les amorces nucléotidiques. Ces petites séquences d'ADN, de 20 à 45 paires de bases, viennent s'hybrider à l'ADN du gène d'intérêt à l'endroit où l'on souhaite introduire la mutation, puis chacune est ensuite allongée par une ADN polymérase, qui copie le reste du gène durant l'étape de PCR (étape d'élongation du gène). Ainsi, le gène copié comporte la mutation. Une étape de digestion par l'enzyme *Dpn I* permet ensuite d'éliminer sélectivement l'ADN parental méthylé et hémiméthylé. Le plasmide porteur du gène néosynthétisé est ensuite inséré dans une cellule hôte et amplifié.

La technique de mutagenèse dirigée permet donc d'introduire une mutation dans une position donnée, mais peut également être utilisée pour l'introduction de mutations sur plusieurs positions, sur une courte séquence, voire sur un gène entier [132], [133].

3.2.1.2. Approche semi-rationnelle

L'approche semi-rationnelle combine les avantages des approches aléatoire et rationnelle [134]. Une diversité génétique est apportée sur un acide aminé précis ou sur plusieurs acides aminés simultanément, constitutifs d'une séquence plus ou moins grande, voire même d'un gène entier. La sélection de ces résidus ou de ces séquences repose sur la connaissance de la structure 3D de la protéine. La taille des banques d'enzymes mutées est ainsi plus limitée, en comparaison des banques générées selon une approche aléatoire.

Mutagenèse par saturation de site (« SSM »)

La mutagenèse par saturation de site ou « *site-saturation mutagenesis* » (« SSM ») consiste à remplacer de façon systématique un résidu d'une protéine par les 19 autres acides aminés naturels. Ces substitutions sont réalisées à partir de codons dégénérés, introduits dans la position désirée lors de la synthèse des oligonucléotides utilisés comme amorces. La dégénérescence est introduite grâce aux différentes proportions de chaque nucléotide constituant les codons désignés par les lettres NNN, où N est égal à 25 % de chaque base A, T, G et C. Un pool d'amorces différentes est ainsi obtenu. Un protocole similaire à la mutagenèse dirigée peut être alors suivi (Méthode QuikChange®), à partir du plasmide contenant le gène d'intérêt et du mélange d'amorces.

Par ailleurs, il est possible de réduire les biais dus à la redondance du code génétique (voir *Annexe 2*), c'est-à-dire diminuer le nombre de codons correspondants à un même acide aminé, en utilisant des codons de type NNK, où K représente 50 % de G et 50 % de T, de type NNB, où B représente 33 % de C, 33 % de G et 33 % de T ou bien de type NNS, où S représente 50 % de G et 50% de C [135]. Par exemple, un codon de type NNN conduira à 64 codons possibles correspondants aux 20 acides aminés, alors qu'un codon de type NNK, quant à lui, conduira à seulement 32 codons, couvrant les 20 acides aminés. Ainsi, l'emploi de codons dégénérés NNK, NNB ou NNS permet, tout en conservant la qualité des banques d'enzymes mutées générées, d'en réduire la taille [135].

La mutagenèse par saturation de site a été appliquée avec succès pour l'amélioration ou la modification des propriétés des enzymes [136], comme la thermostabilité [137], l'efficacité catalytique [138] ou encore la stéréosélectivité [139].

Mutagenèse combinatoire par saturation de site (« CAST »)

La mutagenèse par saturation de site a été étendue à une approche visant à remplacer de façon systématique deux ou trois résidus simultanément par les 19 autres acides aminés naturels. Il s'agit de la mutagenèse combinatoire par saturation de site ou « *Combinatorial Active-Site Saturation Test* » (« CAST »), développée par le Pr. M. T. Reetz [140]. Cette stratégie permet d'obtenir des effets de coopération entre les mutations générées du fait de la proximité spatiale des acides aminés sélectionnés [141], [142]. De plus, elle permet d'introduire une plus grande diversité par rapport à une démarche de saturation de site limitée à une seule position et constitue ainsi un compromis pratique

entre la mutagenèse par saturation de site conventionnelle (une position) et la mutagenèse aléatoire sur plusieurs sites en utilisant de larges séquences.

A partir de ce concept, le Pr. M. T. Reetz a développé une méthode itérative, la mutagenèse par saturation de site itérative ou « *Iterative saturation mutagenesis* » (« ISM ») [143], [144], [145]. Plusieurs régions clé de la protéine sont identifiées grâce à sa structure 3D ou à la modélisation moléculaire. Dans chaque région, deux ou trois acides aminés sont sélectionnés, sur lesquels est appliquée la méthode « CAST ». A la suite du criblage des banques d'enzymes mutées générées, les meilleurs candidats sont utilisés comme point de départ pour réaliser un nouveau cycle de mutagenèse « CAST » et ce, jusqu'à l'obtention d'une enzyme mutée performante, présentant la ou les propriété(s) recherchée(s). Cette stratégie permet l'émergence des enzymes mutées d'intérêt de façon plus rapide. De plus, la coopération entre les acides aminés mutés est très nettement amplifiée [143].

Ces méthodes peuvent être optimisées par l'emploi de codons dégénérés NDT, où D représente 33% des bases A, G et T, conduisant à seulement 12 codons correspondants à 12 acides aminés, représentatifs des différents groupes (polaires, apolaires, aromatiques et chargés). L'emploi de ce type de codon est particulièrement adapté lors de la mutation simultanée de 2 résidus ou plus. L'objectif est de réduire la taille des banques d'enzymes mutées générées, tout en augmentant la fréquence des mutations bénéfiques [146].

L'efficacité de la méthode « CAST », seule ou combinée à la méthode « ISM », a été largement démontrée par le Pr. M. T. Reetz et son équipe, pour améliorer et modifier les propriétés des enzymes, comme la spécificité de substrat [147], l'énantiosélectivité [143], ou encore la thermostabilité [148].

3.2.2. Construction des banques de TKs mutées

Les travaux décrits dans la littérature portent principalement sur l'amélioration ou la modification de la spécificité de substrat et de la stéréosélectivité de la TK. De nombreuses études ont montré que la modification ou l'amélioration de l'activité catalytique, de la spécificité de substrat ou de la sélectivité d'une enzyme, est d'autant plus efficace lorsqu'elle résulte de la modification d'acides aminés situés au niveau du site actif de l'enzyme et interagissant directement avec le(s) substrat(s) [149]. Cette démarche

a été employée par les groupes qui s'intéressent à l'amélioration et à la modification des propriétés de la TK.

Une approche semi-rationnelle a été adoptée et la mutagenèse par saturation de site (méthode QuikChange®) a tout d'abord été utilisée sur une position pour la création de banques de TKs mutées de première génération. Deux ou trois acides aminés, dont les mutations avaient été identifiées comme « bénéfiques », ont ensuite été combinés selon les stratégies « CAST » [140] et « ISM » [143], afin d'obtenir un effet coopératif, conduisant à la construction de banques de TKs mutées de seconde génération.

Le choix des acides aminés à muter est un aspect déterminant dans cette technique. Ainsi, l'étude des interactions entre les résidus du site actif de la TK et les substrats et la comparaison des séquences protéiques de TKs issues de diverses sources, ont permis à l'équipe des Pr. P. Dalby et H. E. Hailes de cibler un ensemble d'acides aminés selon deux approches complémentaires [150].

La première approche définit un ensemble de 10 acides aminés retenus pour des raisons structurales : ils sont situés à 4 Å ou moins du substrat fixé dans le site actif (le D-E4P dans la TK de *S. cerevisiae*, structure : 1NGS.pdb). Ces positions sont les suivantes : H26, H100, I189, H261, G262, R358, S385, H461, D469 et R520. Il est intéressant de noter que ces acides aminés sont très conservés et qu'ils jouent, pour la plupart, un rôle crucial dans la liaison au substrat et dans le mécanisme catalytique de la TK.

La seconde approche repose sur des considérations structurales mais aussi phylogénétiques. Les résidus sont choisis dans un périmètre de 10 Å du ThDP et correspondent à des acides aminés n'ayant pas été conservés au cours de l'évolution des TKs bactériennes et de levures. Après la comparaison de 52 séquences de TK provenant de divers microorganismes et de végétaux, 10 acides aminés ont été sélectionnés : K23, A29, N64, M159, S188, D259, A383, P384, V409 et L466 (Figure 17).

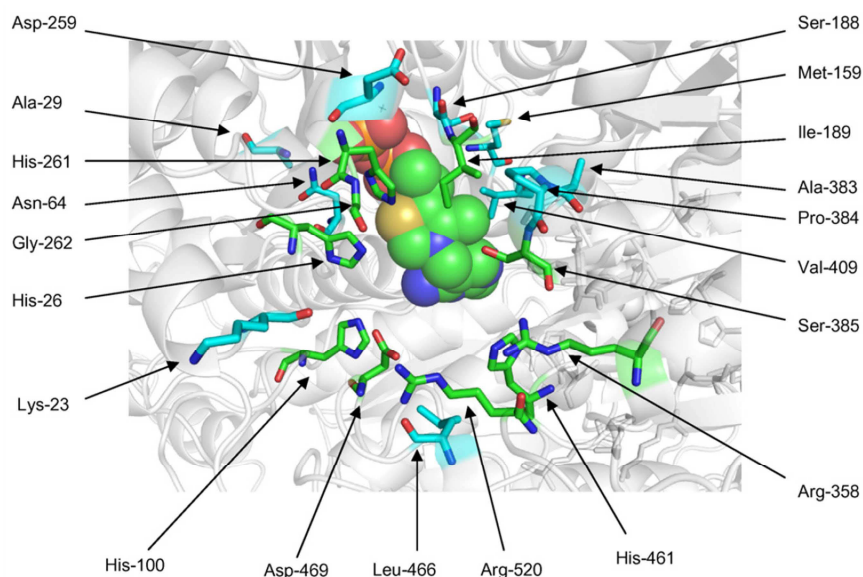


Figure 17 : Positions des résidus sélectionnés selon des critères structuraux (vert) et des critères phylogénétiques (cyan) dans le site actif de la TK d'*E. coli* (1QGD.pdb) en présence du ThDP. Schéma extrait de la littérature [150].

Les activités des TKs mutées ainsi générées ont ensuite été déterminées vis-à-vis d'un panel d'aldéhydes accepteurs non-naturels grâce à divers tests, présentés dans le paragraphe suivant.

3.3. Test de sélection et de criblage

3.3.1. Généralités

Quelle que soit la technique utilisée pour générer des mutations à partir d'un gène sauvage, il est nécessaire de disposer d'un test efficace, rapide et spécifique, pour mettre en évidence la ou les enzymes(s) mutée(s) présentant la(es) propriété(s) recherchée(s), au sein de la banque d'enzymes mutées, qui peut être de plus ou moins grande taille. Au cours des vingt dernières années, de nombreux travaux ont conduit au développement de tests de plus en plus ingénieux pour mettre en évidence les principales propriétés qu'il est souhaitable de modifier ou d'améliorer chez une enzyme : l'activité catalytique, l'énantiosélectivité, la stéréosélectivité, la stabilité thermique et la résistance aux solvants organiques [151], [152], [153]. Ceux-ci sont regroupés en deux catégories : les tests de sélection et les tests de criblage (Figure 18).

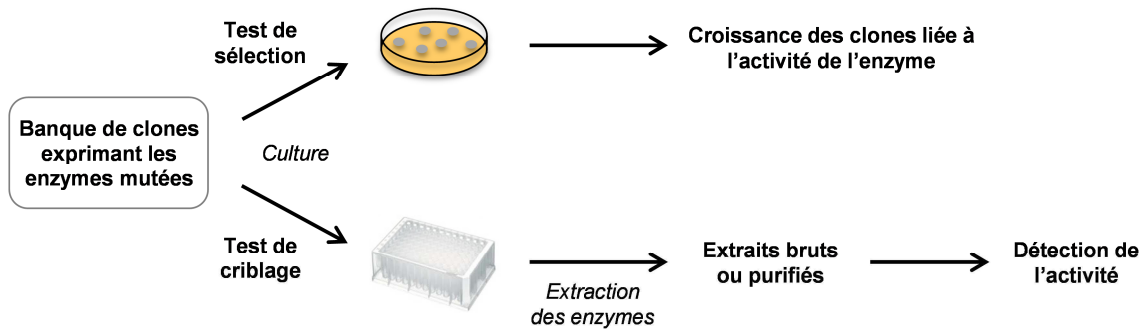


Figure 18 : Test de sélection et test de criblage

Un test de sélection est un test *in vivo*, basé très souvent sur la survie des clones comportant l'enzyme ayant les propriétés recherchées, ce qui permet d'éliminer rapidement tous ceux qui ne présentent pas les activités enzymatiques ciblées. Ces méthodes de sélection sont rapides, efficaces et permettent de cribler rapidement des bibliothèques de grande taille (10^8 à 10^{10} mutants) [154]. Néanmoins, la mise au point de ces tests est délicate puisqu'il faut relier de façon spécifique l'activité enzymatique recherchée et la survie de la cellule hôte. De plus, il faut veiller à prendre en compte l'existence de voies métaboliques secondaires, qui peuvent conduire à la survie cellulaire sans requérir le concours de l'enzyme recherchée [154]. Les méthodes de sélection d'enzymes *in vivo* décrites dans la littérature, reposent essentiellement sur l'utilisation d'un élément essentiel ou d'un élément toxique pour la cellule : pour survivre, la cellule devra soit être capable de synthétiser cet élément essentiel [155], soit de métaboliser l'élément toxique [156], ces deux processus requérant le concours de l'enzyme mutée recherchée [154].

Un test de criblage est un test *in vitro*, dans lequel chaque enzyme est testée individuellement pour une propriété déterminée. Dans cette technique, il est donc nécessaire de faire croître les clones individuellement dans des plaques 96-puits (voire 384-puits), puis d'en extraire les enzymes mutées correspondantes. L'extrait pourra alors être purifié ou étudié directement par des méthodes analytiques et, dans certains cas, en milieu non conventionnel [157], [158]. Bien que ce travail puisse être assisté par des automates, la taille des banques est généralement plus limitée (10^3 à 10^5 mutants) [159]. Suivant la propriété recherchée, différentes méthodes ont été mises au point. L'activité de l'enzyme d'intérêt peut être déterminée en utilisant des dosages spectrophotométriques, fluorométriques ou spectrométriques [160], [161], [162]. Certaines stratégies peuvent être

développées directement en présence des substrats requis pour la réaction ; d'autres font appel à des substrats modifiés [163] ou à des chimiodétecteurs [162], [164].

Concernant la TK, le groupe du Pr. L. Hecquet a développé ces dernières années des stratégies basées sur l'utilisation de substrats donneurs modifiés, soit précurseurs d'un acide aminé (la L-méthionine ou la L-leucine), conduisant au seul test de sélection de cette enzyme décrit dans la littérature [165], [166], soit précurseurs d'un fluorophore, l'umbelliférone [167], [168], [169]. A ce jour, ces tests n'ont pas encore été appliqués à l'analyse de banques de TKs mutés. Dans la suite de l'étude bibliographique, seuls les tests de criblage développés en présence des substrats d'intérêt utilisés en biocatalyse et utilisés pour le criblage de banques de TKs mutées seront présentés.

3.3.2. Tests de criblage en présence des substrats d'intérêt

Ces tests présentent l'avantage d'être réalisés en présence des substrats d'intérêt, qui seront par la suite utilisés en biocatalyse, pour la synthèse des cétooses et analogues correspondants. Il s'agit du HPA, utilisé comme substrat donneur et d'un panel d'aldéhydes accepteurs, aux structures variées. Seuls les tests colorimétriques, développés afin de quantifier de façon directe la disparition du substrat ou la formation du produit de la réaction, seront décrits ici.

- Test en présence du rouge de tétrazolium

Un test colorimétrique basé sur l'utilisation d'un sel de tétrazolium, le chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (TTC) ou rouge de tétrazolium, a été développé afin de cribler rapidement des banques de TKs mutées [170]. Le rouge de tétrazolium est un réactif incolore, qui est capable d'oxyder l' α -hydroxycétone formée à la suite de la réaction catalysée par la TK entre le Li-HPA et un aldéhyde aliphatique comme substrat accepteur. Il est alors lui-même réduit pour conduire à sa forme formazan, un composé présentant une intense couleur rouge à $\lambda_{\max} \approx 485$ nm (Figure 19). Des excès de rouge de tétrazolium et de soude (3M) sont introduits à la fin de la réaction afin d'évaluer la quantité de cétoose formé par spectrophotométrie.

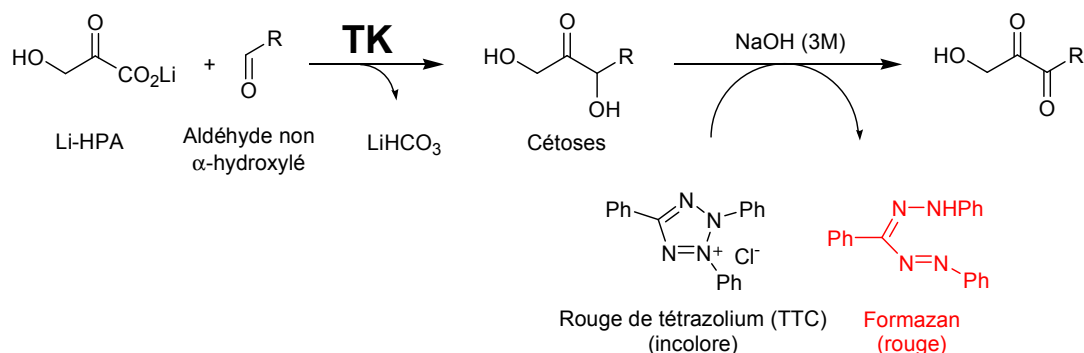


Figure 19 : Test d'activité colorimétrique de la TK basé sur l'utilisation du rouge de tétrazolium

Cette méthode est rapide, peu coûteuse et est réalisée en présence des substrats d'intérêt de la TK, vis-à-vis desquels l'activité de cette enzyme doit être améliorée. Cependant, ce test est limité à l'utilisation de substrats accepteurs non α -hydroxylés. En effet, les substrats α -hydroxylés réagiraient directement avec le rouge de tétrazolium. De plus, la forme formazan du rouge de tétrazolium n'est pas soluble dans l'eau. Elle est présente sous la forme d'un précipité, qui reste temporairement en suspension dans le liquide, limitant sa détection par spectrophotométrie avec une reproductibilité et une sensibilité satisfaisante. Enfin, il est impératif d'éliminer le HPA résiduel à la fin de la réaction, car le groupement « cétole » de ce composé réagirait, comme le produit de la réaction, avec le rouge de tétrazolium. Il s'agit ainsi d'un test indirect, qui nécessite la réalisation d'une étape supplémentaire pour le rendre spécifique de la réaction catalysée par la TK.

- Test de Seliwanoff

Le groupe du Pr H. E. Hailes a très récemment développé un test de criblage colorimétrique haut débit, basé sur le test décrit par le Pr. T. Seliwanoff [171], [172]. Celui-ci repose sur la différence de vitesse de déshydratation des cétoles et des aldoses. En milieu acide (HCl 6M) et à 100°C , le cétole formé (Ex : *L-gluco*-heptulose) se déshydrate rapidement : il est converti en 5-hydroxyméthylfurfural (5-HMF), qui réagit avec la résorcine pour former un motif xanthone, présentant une intense couleur rouge. La réaction de déshydratation des aldoses est plus lente et conduit à l'apparition d'une couleur jaune à verte pâle (Figure 20).

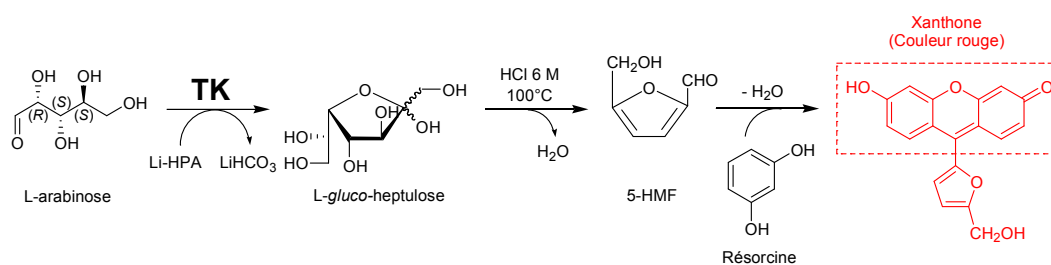


Figure 20 : Test d'activité colorimétrique de la TK basé sur le test de Seliwanoff
(Exemple de l'utilisation du L-arabinose pour la synthèse du L-gluco-heptulose)

Ce test est rapide, peu coûteux et facile à mettre en œuvre. Cependant, il ne permet qu'une détermination qualitative de l'activité de la TK et nécessite d'être complété par une technique analytique quantitative.

- Test en présence du rouge de phénol

Un test d'activité pH-métrique, basé sur l'utilisation d'un indicateur coloré, le rouge de phénol, a récemment été mis au point par le groupe du Pr. W.-D. Fessner, en collaboration avec le Pr. L. Hecquet [122].

Ce test a été développé en présence du Li-HPA comme substrat donneur de la TK, celui-ci étant utilisé dans les réactions de synthèse car il rend la réaction irréversible. Lors de la réaction catalysée par la TK en présence de ce donneur, un proton H⁺ est consommé à chaque cycle, ce qui libère un équivalent d'ions bicarbonates HCO₃⁻, entraînant l'augmentation du pH dans le milieu (Figure 21).

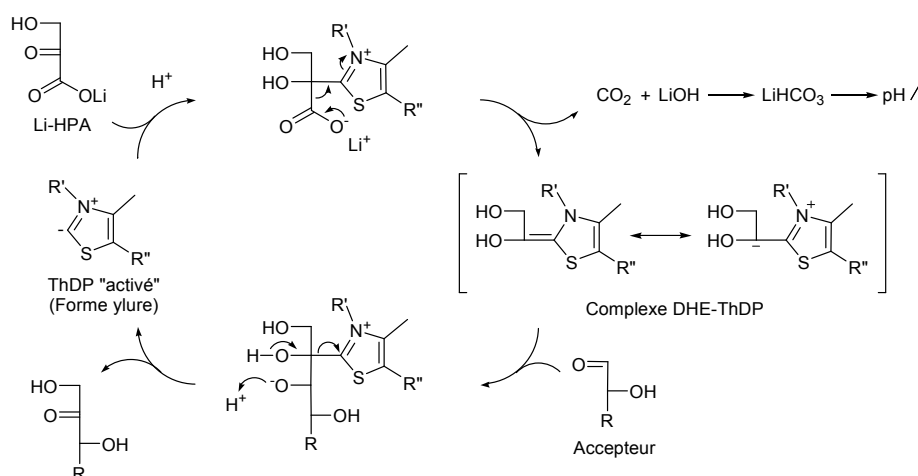


Figure 21 : Cycle catalytique de la TK en présence du Li-HPA

Schéma adapté de la littérature [112]. R' représente le cycle 2'-méthyl-4'-aminopyrimidine relié par un pont méthylène au cycle thiazolium. R'' représente le groupement diphosphate relié au cycle thiazolium par une fonction hydroxyéthyle.

En effet, l'ion bicarbonate est la forme dissociée de l'acide carbonique (H_2CO_3) et est impliqué dans un équilibre dynamique de dissociation dans l'eau, qui conduit à une basification de la solution, en raison de la formation partielle d'ions hydroxydes (Figure 22).

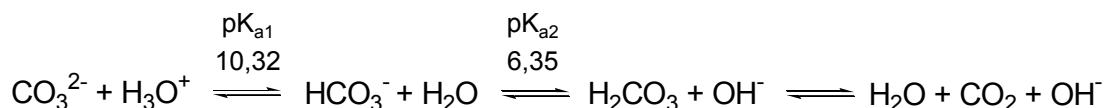


Figure 22 : Equilibre de dissociation de l'ion bicarbonate en solution dans l'eau

Cette variation de pH est suivie par spectrophotométrie, en présence d'un indicateur coloré : le rouge de phénol. Celui-ci a été sélectionné pour son pK_a : 7,4 [173] et sa zone de virage : $6,8 < \text{pH} < 8,2$, compatibles avec le pH optimal de la TK, d'environ 7,5 [95] (Figure 23 a)). Jaune vif à pH acide, le rouge de phénol vire au rose vif à pH basique (Figure 23 b)). Ainsi, il offre un large spectre de couleurs, permettant une visualisation aisée de l'avancement de la réaction. Enfin, le rouge de phénol, sous sa forme déprotonée, présente un coefficient d'absorption molaire élevé : $\epsilon = 56000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à $\lambda_{\text{max}} = 557 \text{ nm}$, ce qui permet de le détecter par spectrophotométrie avec une haute sensibilité [173].

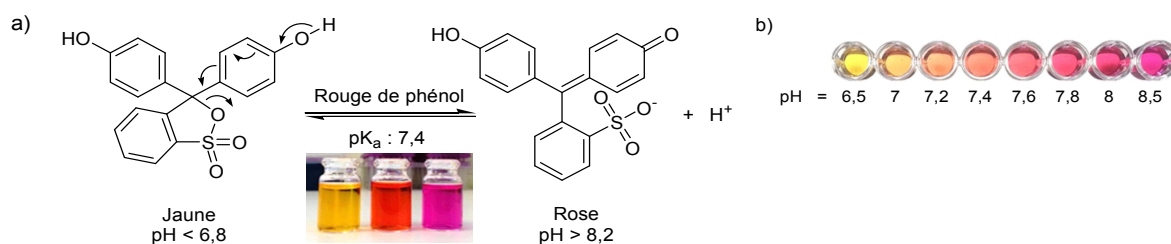


Figure 23 : Test d'activité pH-métrique de la TK basé sur l'utilisation du rouge de phénol comme indicateur coloré

Le test d'activité au rouge de phénol présente de nombreux avantages par rapport aux tests décrits précédemment. En effet, il est direct, rapide, quantitatif et convient à tout type d'aldéhyde accepteur, hydroxylé ou non. Il est de surcroît facile à mettre en œuvre, miniaturisable en microplaques 96-puits et peu coûteux. Ce test bénéficie donc de tous les critères requis pour le criblage à haut débit, aussi bien d'un grand nombre de substrats vis-à-vis d'une TK donnée (appelé « Fingerprinting » [174]), que d'un grand nombre de TKs mutées vis-à-vis d'un substrat donné.

Sa fiabilité a été attestée par les valeurs des activités spécifiques et des paramètres cinétiques obtenus pour la TK de *S. cerevisiae* et d'*E. coli*, similaires à celles indiquées dans la littérature [122].

3.3.3. Conclusions

Parmi les tests de criblage colorimétriques décrits, seul le test pH-métrique au rouge de phénol est à la fois rapide, facile à mettre en œuvre, peu coûteux, miniaturisable, direct, applicable à un très large spectre d'aldéhydes accepteurs (ce qui est important pour tester plusieurs substrats potentiels ayant des structures différentes) et permet une détermination quantitative de l'activité de la TK et ce avec une bonne sensibilité. Un verrou technologique est donc levé car jusqu'alors, il n'existait aucune méthode automatisable et générique, permettant de déterminer l'activité de la TK de façon quantitative.

3.4. Amélioration et modification des propriétés des TKs mutées les plus performantes

Les travaux développés par l'équipe des Pr. P. Dalby et H. E. Hailes et du Pr. U. Hanefeld portent essentiellement sur l'amélioration de l'activité de la TK et l'élargissement de son spectre de substrats accepteurs vis-à-vis d'aldéhydes aliphatiques [120], [139], [175], [176], [177] et aromatiques [141], [142], [178], [179], mais également sur l'amélioration et l'inversion de sa stéréosélectivité [139] et l'augmentation de sa thermostabilité [180]. Récemment, ces mêmes groupes se sont intéressés à l'amélioration de l'activité de la TK vis-à-vis d'aldéhydes à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6) [106], [171]. Dans ces études, le Li-HPA est toujours utilisé comme substrat donneur.

3.4.1. Amélioration de l'activité de la TK vis-à-vis d'aldéhydes aliphatiques linéaires et cycliques

Les résultats les plus significatifs ont été obtenus en présence de TKs mutées sur la position D469. En effet, des gains d'activité d'un facteur 8, 5, 4,4, et 4,3 par rapport à l'enzyme sauvage (TK d'*E. coli*) ont été obtenus avec les mutants D469E, D469T, D469Y et D469A, respectivement, vis-à-vis du propanal [139], [176]. En présence d'aldéhydes aliphatiques linéaires de 4 à 6 atomes de carbone, une augmentation des rendements de

synthèse est observée avec le mutant D469E, par rapport aux résultats obtenus avec la TK sauvage. Cependant, au-delà de 6 atomes de carbone, les rendements sont peu améliorés et restent faibles. Enfin, ce même mutant D469E conduit à une hausse des rendements vis-à-vis d'aldéhydes aliphatiques cycliques, ceux-ci n'étant pas convertis par l'enzyme sauvage [120] (Tableau 7).










Aldéhyde	Product	WT-TK <i>ee</i> (yield)	D469E <i>ee</i> (yield)	D469T <i>ee</i> (yield)	D469K <i>ee</i> (yield)	D469L <i>ee</i> (yield)	H26Y <i>ee</i> (yield)
2a 	3a ¹²	58% (3 <i>S</i>) (36%) ¹²	90% (3 <i>S</i>) (70%) ¹²	64% (3 <i>S</i>) ¹² (68%) ¹⁷	—	12% (3 <i>S</i>) (nd)	88% (3 <i>R</i>) (63%) ¹²
2b 	3b	75% (3 <i>S</i>) (36%)	98% (3 <i>S</i>) (44%)	—	—	—	92% (3 <i>R</i>) (16%)
2c 	3c	84% (3 <i>S</i>) (16%)	97% (3 <i>S</i>) (58%)	—	—	—	84% (3 <i>R</i>) (7%)
2d 	3d	85% (3 <i>S</i>) (25%)	97% (3 <i>S</i>) (47%)	—	—	—	84% (3 <i>R</i>) (12%)
2e 	3e	74% (3 <i>S</i>) (7%)	86% (3 <i>S</i>) (14%)	—	—	—	78% (3 <i>R</i>) (4%)
2f 	3f	66% (3 <i>S</i>) (<3%)	86% (3 <i>S</i>) (18%)	—	—	—	83% (3 <i>R</i>) (21%)
2g 	3g	72% (1 <i>S</i>) (<3%)	>99% (1 <i>S</i>) (10%)	99% (1 <i>S</i>) (10%)	99% (1 <i>S</i>) (<3%)	99% (1 <i>S</i>) (<3%)	no reaction
2h 	3h	0% (<3%)	>99% (1 <i>S</i>) (40%)	99% (1 <i>S</i>) (30%)	25% (1 <i>S</i>) (10%)	no reaction	30% (1 <i>R</i>) (<3%)
2i 	3i	0% (<3%)	97% (1 <i>S</i>) (10%)	99% (1 <i>S</i>) (<3%)	25% (1 <i>S</i>) (<3%)	no reaction	no reaction

Tableau 7 : Elargissement du spectre de substrats accepteurs de la TK d'*E. coli* vis-à-vis d'un panel d'aldéhydes aliphatiques et cycliques. Tableau extrait de la littérature [120].

Plus récemment, une seconde génération de double et triple mutants de la TK a été construite selon les méthodes « CAST » [140] et « ISM » [143], en combinant les positions les plus favorables identifiées lors de la première génération de TKs mutées. Ainsi, les doubles mutants D469T/R520Q et D469Y/R520V ont été sélectionnés pour une activité relative de 9,6 et 7,7 vis-à-vis du propanal par rapport à la TK sauvage, mettant en évidence l'effet de coopération dû à la combinaison de plusieurs mutations [177].

3.4.2. Amélioration de l'activité de la TK vis-à-vis d'aldéhydes aromatiques et hétéroaromatiques

De faibles rendements sont généralement obtenus en présence d'aldéhydes aromatiques et hétéroaromatiques avec les mutants testés. Toutefois, un rendement de 10% est obtenu avec le mutant F434A de la TK d'*E. coli* en présence du benzaldéhyde, cet accepteur n'étant pas converti par l'enzyme sauvage. De plus, en présence du phénylacétaldéhyde le rendement de 5% obtenu avec la TK sauvage a pu être multiplié par 10 en présence des mutants D469E, D469T, D469K et F434A [179] (Tableau 8).

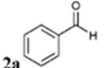
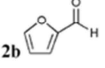
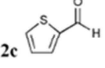
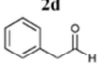
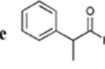
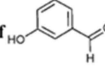
Aldéhyde	Product	WT-TK ee or isomer (yield)	D469E ee or isomer (yield)	D469T ee or isomer (yield)	D469K ee or isomer (yield)	F434A ee or isomer (yield)
	3a (R = Ph)	No reaction	0% (2%) [4 (5%)]	70% (3R) (2%) [4 (5%)]	82% (3R) (2%) [4 (5%)]	82% (3R) (10%) no 4
	3b (R = furyl)	No reaction	— (5%) [5 (<2%)]	— (3%) [5 (<2%)]	— (3%) [5 (<2%)]	— (1%) [5 (<2%)]
	3c (R = thienyl)	No reaction	— (2%) [5 (<2%)]	— (3%) [5 (<2%)]	— (2%) [5 (<2%)]	— (1%) [5 (<2%)]
	3d (R = CH ₂ Ph)	93% (3S) (5%)	90% (3S) (50%)	96% (3S) (50%)	95% (3S) (50%)	97% (3S) (48%)
	3e (R = CH(CH ₃)Ph)	88% (3S,4R) 12% (3S,4S) (35%)	95% (3S,4R) 5% (3S,4S) (30%)	96% (3S,4R) 4% (3S,4S) (40%)	95% (3S,4R) 5% (3S,4S) (38%)	85% (3S,4R) 15% (3S,4S) (35%)
	3f (R = <i>m</i> -(OH)C ₆ H ₄)	No reaction	No reaction	0% (4%)	—	53% (3R) (6%)

Tableau 8 : Elargissement du spectre de substrats accepteurs de la TK d'*E. coli* vis-à-vis d'un panel d'aldéhydes aromatiques et hétéroaromatiques. Tableau extrait de la littérature [179].

Par la suite, les activités des TKs mutées de seconde génération ont été mesurées en présence du benzaldéhyde et d'analogues du benzaldéhyde, le 3-FBA, le 4-FBA et le 3-HBA, trois aldéhydes non convertis par la TK sauvage [141], [142], [181] (Figure 24).

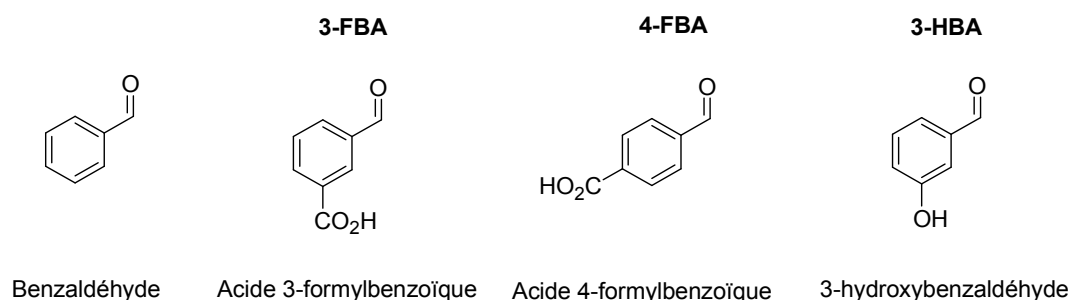


Figure 24 : Formules développées du benzaldéhyde et d'analogues utilisés comme substrat accepteur potentiel des TKs mutées

L'effet de coopération entre les mutations est illustré par la comparaison des paramètres cinétiques du simple mutant D469T et du double mutant D469T/R520Q, vis-à-vis du 3-FBA et du 4-FBA : des K_M de 56 mM et 251 mM ont été obtenus pour le mutant D469T, respectivement, tandis que ces valeurs diminuent d'un facteur 4 au moins pour le double mutant D469T/R520Q (13 mM et 25 mM respectivement). Ces résultats mettent en évidence une très nette amélioration de l'affinité de ce dernier pour ces aldéhydes aromatiques [141]. Plus récemment, un article publié en 2015 a permis de confirmer l'effet de synergie entre 3 mutations au sein du site actif de la TK. En effet, l'activité du triple mutant S385T/D469T/R520Q a été multipliée par 13 vis-à-vis du 3-HBA par rapport à l'activité du mutant simple D469T [142].

3.4.3. Modification de la stéréosélectivité de la TK

Si la stéréosélectivité de la TK sur le carbone 3 du cétose formé est excellente en utilisant le glycolaldéhyde comme substrat accepteur (excès énantiomérique ou $ee > 95\%$ en faveur du produit de configuration (3S)), elle est beaucoup moins élevée en présence d'un aldéhyde non- α -hydroxylé tel que le propanal (ee de 58 % en faveur du produit de configuration (3S) [139] (Tableau 7). Les résultats décrits dans les paragraphes 3.4.1. et 3.4.2. ont montré qu'il était non seulement possible d'améliorer mais aussi d'inverser la stéréosélectivité de la TK en présence d'aldéhydes non- α -hydroxylés (Tableau 7 et Tableau 8). Le mutant D469E, notamment, présente d'excellents ee en faveur du produit (3S), nettement supérieurs à ceux obtenus avec la TK sauvage, en présence d'aldéhydes aliphatiques linéaires et cycliques [120], [139] (Tableau 7). Au contraire, le mutant H26Y et les mutants D469T, D469K et F434A présentent une stéréosélectivité inversée, puisqu'ils conduisent à l'obtention de très bons ee en faveur du produit (3R), en présence d'aldéhydes aliphatiques linéaires et cycliques et du benzaldéhyde [120], [139], [179] (Tableau 8).

3.4.4. Amélioration de l'activité de la TK vis-à-vis d'aldéhydes à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6)

Le groupe du Pr. U. Hanefeld s'est récemment intéressé à l'amélioration de la TK de *S. cerevisiae* par Evolution dirigée (2012) [106]. L'étude a porté sur l'amélioration de son activité vis-à-vis d'aldéhydes présentant de longues chaînes polyhydroxylées : le D-ribose (C5) et le D-glucose (C6). Cinq banques ont été construites par mutagenèse par saturation de site, en ciblant individuellement cinq résidus conservés : H30, H263, D477,

H481 et R528 (équivalents aux positions H26, H261, D469, H473 et R520 dans la TK d'*E. coli*). La banque a été criblée en deux étapes à l'aide d'une méthode basée sur l'HPLC, puis la GC [182].

La mutation du résidu R528 a conduit aux meilleurs résultats : l'activité vis-à-vis du D-ribose a pu être améliorée d'un facteur 1,4, 1,5, 1,6 et 1,7 par rapport à la TK sauvage, avec les mutants respectifs R528N, R528Y, R528K et R528Q. De plus, un gain d'activité d'un facteur 1,8 et 1,9 par rapport à l'enzyme sauvage vis-à-vis du D-glucose a été observé en présence des mutants R528N et R528Q, respectivement. Il est intéressant de noter que les résidus asparagine et lysine sont retrouvés dans cette position chez d'autres TKs sauvages.

Une seconde génération de doubles mutants a par la suite été construite selon une approche itérative [143] : 5 acides aminés voisins du résidu R528 ont été ciblés et mutés individuellement avec celui-ci. Il s'agit des acides aminés : I189, R359, H469, S527 et Q529. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le double mutant R528Q/S527T, dont l'activité relative par rapport à la TK sauvage a été augmentée d'un facteur 2,6 et 2,1 vis-à-vis du D-ribose et du D-glucose, respectivement. Ces travaux mettent ainsi en évidence l'intérêt des stratégies basées sur des mutations multiples grâce à l'effet de coopération entre les mutations.

Dans une étude récente de 2016, l'équipe des Pr P. Dalby et H. E. Hailes a également envisagé d'améliorer l'activité de la TK vis-à-vis du L-arabinose, un aldéhyde à longue chaîne polyhydroxylée [171]. Issu de la biomasse végétale, cet aldéhyde permet la synthèse du L-*gluco*-heptulose, un heptose naturel rare, utilisé pour le traitement du cancer et de l'hypoglycémie [183]. Trois banques de 90 clones chacune ont été générées par mutagenèse par saturation de site, en ciblant individuellement trois résidus conservés : R520, H461 et R358. Celles-ci ont été testées selon un protocole de criblage moyen débit, couplant un test colorimétrique haut débit qualitatif, une analyse par HPLC, puis par GC-MS pour les meilleures TKs mutées. Les deux mutants R520Y et R520P, mis en évidence lors de cette étude, sont respectivement 2,1 et 1,5 fois plus actifs que la TK d'*E. coli* sauvage vis-à-vis du L-arabinose. Le mutant R520Y, ainsi que le mutant H461Y, sélectionné en raison de sa stabilité et de son taux de conversion élevé du L-arabinose, ont ensuite été utilisés en biocatalyse, pour la synthèse à l'échelle préparative du L-*gluco*-heptulose, obtenu avec des rendements de 40% et 45%, respectivement.

3.4.5. Amélioration de la thermostabilité de la TK

Très récemment, l'équipe des Pr P. Dalby et H. E. Hailes ont également amélioré la thermostabilité de la TK d'*E. coli* [180]. Les résidus composant les séquences 187-198 du domaine N-terminal (*séquence 1*) et 382-394 du domaine intermédiaire (*séquence 2*) de la TK, impliqués dans la liaison au ThDP et au Ca^{2+} [85] (Voir paragraphe 2.3.2.1., page 19 de ce manuscrit), ont été ciblés et mutés par leurs équivalents présents chez une TK issue de la bactérie thermophile *Thermus thermophilus* [184]. Tandis que la mutation de résidus appartenant à la *séquence 2* a un effet délétère sur l'activité de la TK à haute température, la mutation de résidus constituant la *séquence 1* semble bénéfique. L'activité spécifique du mutant H192P, notamment, est 3 fois et 19 fois plus élevée que celle de l'enzyme sauvage à respectivement 60°C et 65°C. De plus, celle-ci reste inchangée et est même améliorée d'un facteur 2,7 et 4, après une heure d'incubation à 55°C et 60°C, respectivement. Enfin, l'activité du mutant H192P est maximale à 60°C, au lieu de 55°C pour la TK d'*E. coli* sauvage [180]. Il est à noter que la stabilité du mutant H192Y n'a néanmoins pas été examinée sur une durée supérieure à 1 heure.

3.4.6. Conclusions

Ces premiers travaux de modification des propriétés de la TK par Evolution dirigée selon une approche semi-rationnelle ont permis d'élargir son spectre de substrats accepteurs et d'augmenter son activité vis-à-vis des aldéhydes aliphatiques à courte chaîne et des aldéhydes aromatiques, d'améliorer et d'inverser sa stéréosélectivité au niveau du carbone 3 du cétose formé, mais également d'améliorer sa thermostabilité. Les résultats obtenus confirment qu'une bonne connaissance du site actif de l'enzyme et des acides aminés impliqués dans le mécanisme catalytique, permet d'améliorer significativement et efficacement l'activité et la sélectivité d'une enzyme, d'autant plus lors de la mutation conjointe de plusieurs acides aminés, par effet de synergie.

4. Stratégies de synthèse impliquant la TK

La TK sauvage, issue de différentes sources (*S. cerevisiae*, *E. coli* ou feuilles d'épinards), a été abondamment employée en synthèse organique, permettant le développement de voies de synthèse de polyols chiraux par formation stéréospécifique d'une liaison C-C. Le principal atout de cette enzyme concerne l'utilisation du HPA comme substrat donneur, qui permet de rendre la réaction irréversible. La TK présente également une grande flexibilité vis-à-vis de substrats accepteurs non naturels, permettant d'accéder à des cétooses et analogues d'une grande diversité structurale. Les composés formés, utilisés seuls ou comme précurseurs de molécules plus complexes, présentent de très nombreuses applications dans les secteurs de la pharmacie, de l'agroalimentaire de la cosmétique et de la chimie fine [48].

Différentes stratégies ont été développées pour accéder à ces composés. Certaines font appel à une seule étape enzymatique catalysée par la TK ; d'autres impliquent des enzymes auxiliaires pour générer les substrats et/ou transformer les produits.

4.1. Synthèse de cétooses en une étape catalysée par la TK

Synthèse du D-sédoheptulose et du D-S7P

Le D-ribose-5-phosphate (D-R5P), l'un des substrats accepteurs naturels de la TK, a été utilisé par notre groupe en présence du Li-HPA comme substrat donneur, pour synthétiser le D-sédoheptulose-7-phosphate (D-S7P), un sucre phosphorylé requis pour l'étude des voies métaboliques et employé comme précurseur d'antibiotiques [23] et de composés inhibiteurs d' α -glycosidases [24]. Celui-ci a été obtenu sous forme de sels de barium en une étape à l'échelle du gramme avec un rendement de 81%, en présence de la TK de *S. cerevisiae* [185]. Le laboratoire s'est également intéressé à l'obtention de son équivalent non phosphorylé, le D-sédoheptulose, employé comme marqueur de diverses pathologies [21], [22]. Ce dernier a été synthétisé à partir du D-ribose et en présence de la TK de feuilles d'épinards, avec un rendement de 70% [186] (Figure 25).

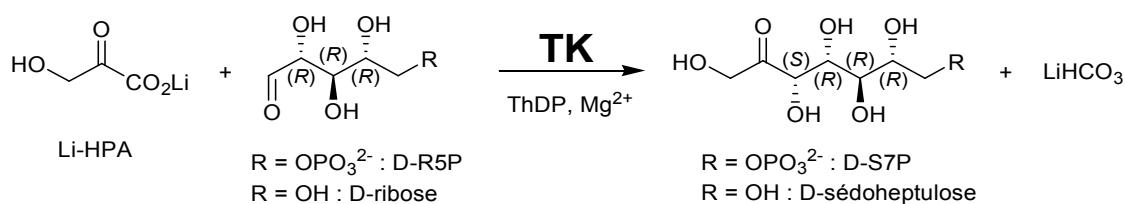


Figure 25 : Synthèses du D-S7P et du D-sedoheptulose catalysées par la TK à partir respectivement du D-R5P et du D-ribose

Synthèses d'azasucres

La D-fagomine, le 1,4-didésoxy-1,4-imino-D-arabinitol et le 2-hydroxyméthyl-pyrrolidine-1,3,4-triol sont des azasucres utilisés pour leur potentiel en tant qu'inhibiteurs des glycosidases [48], [187], [188], [189]. Des précurseurs chiraux de ces trois composés peuvent être préparés par voie enzymatique, à partir d'aldéhydes α -hydroxylés achiraux (commerciaux ou obtenus par voie chimique), utilisés comme substrats accepteurs de la TK et en présence du HPA comme donneur. L'atome d'azote peut être apporté directement par l'aldéhyde **d** ou bien introduit après l'étape enzymatique, par voie chimique (**a**, **b**, **c** et **e**). Les cétooses préparés à partir du (*R,S*)-3-hydroxy-4-oxobutyronitrile **a**, du (*R,S*)-3-azido-2-hydroxypropanal **d** et du (*R,S*)-3-O-benzylglycéraldéhyde **e**, sont synthétisés avec des rendements respectifs de 82%, 71% et 80 % [189], [190], [191]. Des rendements plus modestes sont obtenus dans le cas de la synthèse des cétooses correspondants au (*R,S*)-1,3-dithian-2-yl-hydroxy-propanal **b** et au (*R,S*)-1,3-dithian-2-yl-hydroxy-acétaldéhyde **c**, 12% et 10%, respectivement [192] (Figure 26).

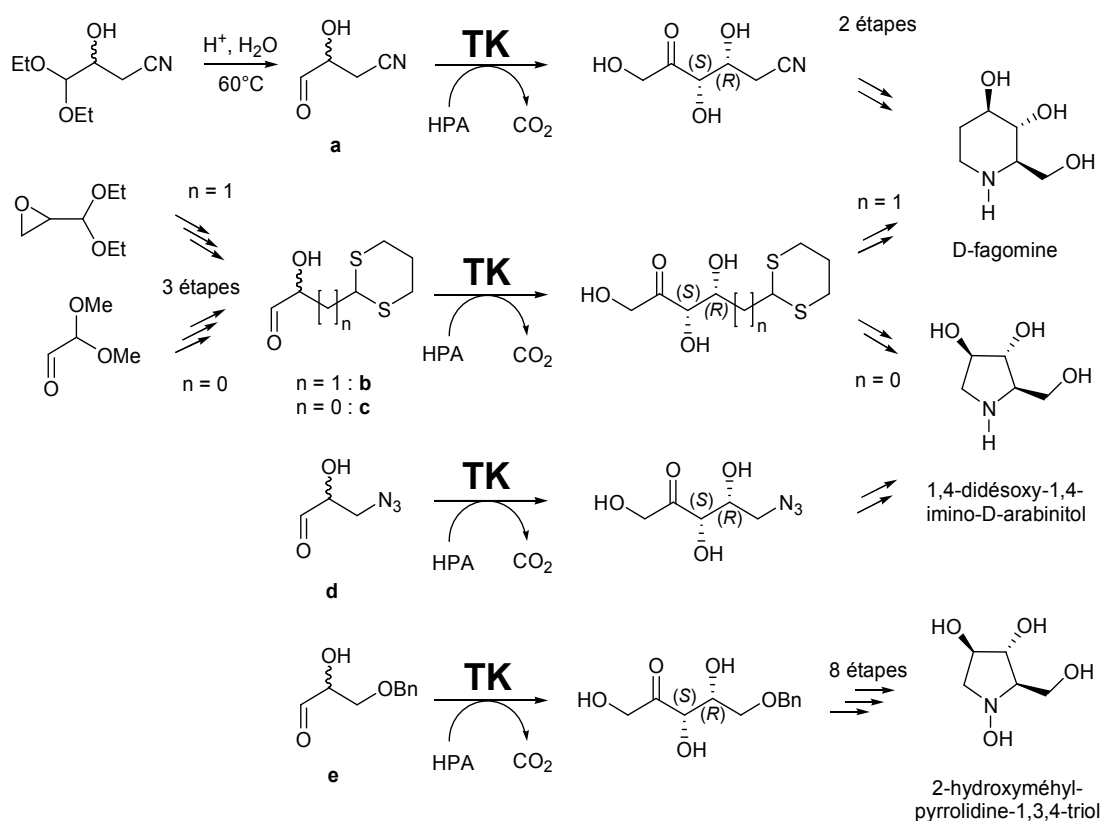


Figure 26 : Synthèses chimioenzymatiques de la D-fagomine, du 1,4-didésoxy-1,4-imino-D-arabinitol et du 2-hydroxyméthyl-pyrrolidine-1,3,4-triol

Synthèse de la (+)-*exo*-brévicomine

Le groupe du Pr. G. Whitesides (Etats-Unis) a développé un procédé original de synthèse de la (+)-*exo*-brévicomine, une des phéromones sécrétées par le scarabée. Ce composé est préparé en sept étapes à partir du (*R,S*)-2-hydroxybutanal, utilisé comme substrat accepteur de la TK de *S. cerevisiae* en présence du HPA. Le cétose obtenu, précurseur de la (+)-*exo*-brévicomine, est synthétisé avec un rendement de 45 % [193] (Figure 27).

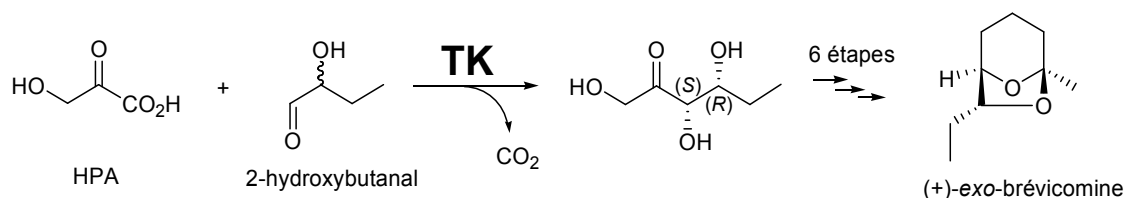


Figure 27 : Synthèse chimioenzymatique de la (+)-*exo*-brévicomine

4.2. Synthèse multi-enzymatique de cétooses et analogues impliquant la TK

La TK a été associée à une ou plusieurs autres enzymes, appartenant aux classes des oxydo-réductases, des transférases, des hydrolases, des lyases et des isomérases, au sein de procédés bi- et multi-enzymatiques originaux, pour transformer le produit obtenu avec la TK, ou bien pour générer le substrat donneur ou accepteur de la TK.

Le principe général consiste en des réactions enzymatiques en cascade, dans lesquelles le produit d'une des réactions est utilisé comme substrat de la réaction suivante. Ce procédé permet d'éviter la purification d'intermédiaires parfois instables et/ou toxiques et conduit ainsi à une diminution des déchets et une augmentation du rendement global. Les différentes réactions enzymatiques peuvent être réalisées indépendamment ou bien au sein d'un même réacteur « one-pot », soit de façon séquentielle (les enzymes sont introduites successivement), soit de façon simultanée (les enzymes sont introduites conjointement). Enfin, ce type de procédé représente une stratégie efficace pour déplacer l'équilibre d'une réaction enzymatique réversible [194], [195]. Dans ce contexte, l'irréversibilité de la réaction catalysée par la TK en présence du HPA est un atout majeur, qui permet de déplacer les équilibres des réactions enzymatiques avec lesquelles elle est couplée.

4.2.1. Transformation enzymatique du produit de la réaction catalysée par la TK

Isomérisation du cétoose produit par la réaction catalysée par la TK

Le 5-thio-D-xylopyranose est utilisé comme inhibiteur des β -D-xylosidases [196] mais également comme synthon pour la préparation de D-xylopyranosides, composés à activité antithrombotique [197]. Le groupe du Pr. L. Hecquet a développé un procédé de synthèse bi-enzymatique « one-pot » séquentiel de ce composé [197], qui consiste à obtenir tout d'abord le 5-thio-D-xylulofuranose (cétoose) grâce à la TK, puis à l'isomériser par voie enzymatique en aldose. Le (*R,S*)-3-thioglycéraldéhyde, préparé au préalable par voie chimique à partir de l'acroléine diéthylacétal, est utilisé comme substrat accepteur de la TK, pour synthétiser le 5-thio-D-xylulofuranose en présence du HPA, avec un rendement de 48%. Celui-ci est ensuite isomérisé en 5-thio-D-xylopyranose, *via* l'utilisation d'une D-glucose isomérase (GlcI, EC 5.3.1.5) (Figure 28).

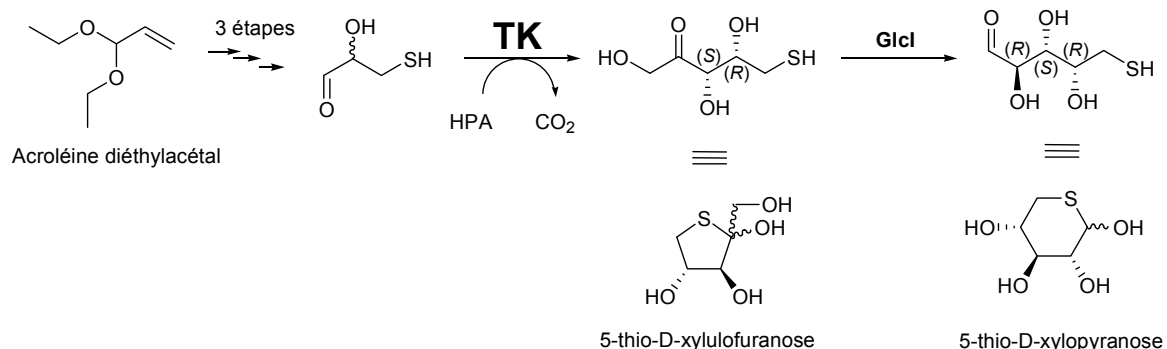


Figure 28 : Synthèse chimioenzymatique du 5-thio-D-xylopyranose

Amination du cétose produit par la réaction catalysée par la TK

Le (2S, 3R)-2-amino-1,3,4-butanetriol (ABT) est un aminoalcool utilisé comme précurseur de nombreuses molécules à activité thérapeutique comme des statines [198], qui sont des inhibiteurs de protéases (comme le Nelfinavir, utilisé dans le traitement du VIH [199]), des agents détoxifiants [200], des antibiotiques ou encore des antiviraux [201]. Une stratégie de synthèse bi-enzymatique « one-pot » simultanée de ce composé a été proposée par plusieurs groupes, dont celui des Pr. P. Dalby et H. E. Hailes. Le L-érythrose, synthétisé avec la TK d'*E. coli* en présence du glycolaldéhyde et du HPA, est converti en ABT, via une réaction de transamination, en présence d'un substrat donneur d'amine, la L- α -méthylbenzylamine (MBA) ou la L-isopropylamine (IPA) (Tableau 9) [202], [203].

Groupement R	Aldéhyde	Cétose	Aminoalcool
OH	Glycolaldéhyde	L-érythrose	ABT : (2S, 3R)-2-amino-1,3,4-butanetriol
CH ₃	Propanal	(3S)-1,3-dihydroxypentan-2-one	APD : (2S, 3S)-2-aminopentan-1,3-diol
Groupements R ₁ et R ₂	Amine	Cétone	
R ₁ = Ph - R ₂ = CH ₃	MBA : L- α -méthylbenzylamine	Acétophénone	
R ₁ = R ₂ = CH ₃	IPA : L-isopropylamine	Acétone	

Tableau 9 : Synthèse "one-pot" de l'ABT et de l'APD, basée sur l'utilisation simultanée de la TK d'*E. coli*, du mutant D469T ou D469E et d'une transaminase

Il est à noter que cet exemple est le seul parmi tous ceux cités qui a été réalisé *in cellulo*, au sein d'une souche unique d'*E. coli* surexprimant à la fois la TK d'*E. coli* et l'amine-alanine pyruvate transaminase de *Pseudomonas aeruginosa* (amine-A:P-TA, EC 2.6.1.18) employée. Cette stratégie a permis l'obtention de l'ABT avec un rendement de 21%, en présence du MBA comme donneur d'amine [202]. Le procédé a, par la suite, été amélioré avec l'utilisation de l'amine-MBA pyruvate transaminase de *Chromobacterium violaceum* (amine-MBA:P-TA, EC 2.6.1.18) et de l'IPA comme nouveau donneur d'amine ; l'ABT a été synthétisé avec un rendement 4 fois plus élevé. Ce second procédé a récemment été modélisé et optimisé en milieu microfluidique [204].

Cette même stratégie a été appliquée par l'équipe des Pr. P. Dalby et H. E. Hailes à la synthèse du (2S, 3S)-2-aminopentan-1,3-diol (APD) [203], [205]. Ce composé présente un motif « 2-amino-1,3-diol », retrouvé dans de nombreux antibiotiques, des inhibiteurs de glycosidases et des sphingolipides [205]. Il a été obtenu en présence du propanal, utilisé comme aldéhyde accepteur des TKs mutées D469T et D469E, respectivement 5 et 8 fois plus actives que la TK d'*E. coli* vis-à-vis de cet aldéhyde [139], [176].

4.2.2. Génération enzymatique du substrat accepteur de la TK

Dans de nombreux cas, l'aldéhyde utilisé comme substrat accepteur de la TK doit être synthétisé, soit parce qu'il est commercial mais coûteux, soit parce qu'il n'est pas disponible. Pour éviter l'utilisation de voies chimiques, quelques approches enzymatiques décrites ci-après ont été envisagées, faisant intervenir une époxyde hydrolase ou un couple aldolase/isomérase.

Génération d'un aldéhyde β -hydroxylé (3S) catalysée par une époxyde hydrolase

Cette stratégie, développée par le laboratoire en collaboration avec le Dr. A. Archelas (Marseille), a été envisagée pour générer l'aldéhyde **c** optiquement pur (3S) par dédoublement de l'époxyde racémique **a** grâce à une époxyde hydrolase d'*Aspergillus niger* (EC 3.3.2.9). L'aldéhyde **c** a été utilisé comme substrat accepteur de la TK en présence du L-érythrose **d**, pour synthétiser le 4-désoxy-D-fructose-6-phosphate, un inhibiteur potentiel des enzymes intervenant dans le métabolisme des monosaccharides telle que les aldolases [118], [206]. Afin de déplacer l'équilibre de la réaction, le glycolaldéhyde **e** libéré est réduit par l'alcool déshydrogénase de *S. cerevisiae* (ADH, EC

1.1.1.1) en présence de NADH, H⁺, régénéré par le système formiate/formiate déshydrogénase (FDH, EC 1.2.1.2) de *S. cerevisiae* (Figure 29).

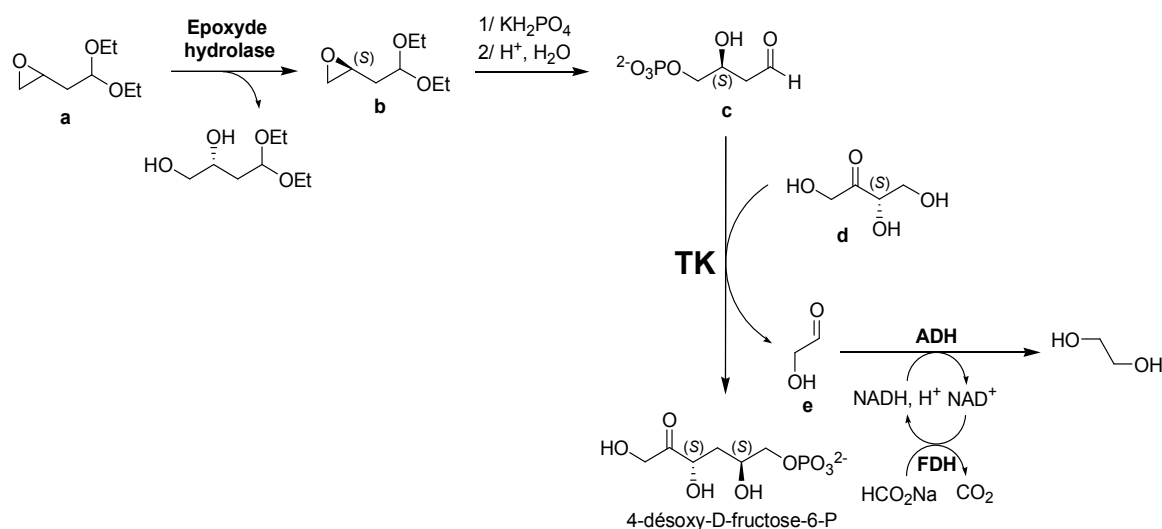


Figure 29 : Synthèse chimioenzymatique du 4-désoxy-D-fructose-6-phosphate via la synthèse enzymatique de l'époxyde (S)-b catalysée par une époxide hydrolase

Génération in situ du D-G3P catalysée par la D-fructose-1,6-bisphosphate aldolase et la triose-phosphate isomérase

Le Pr. W.-D. Fessner et ses collaborateurs [207] ont développé un procédé « one-pot » simultané, dans lequel le D-glycéraldéhyde-3-phosphate (D-G3P) est généré *in situ* à partir du D-fructose-1,6-bisphosphate (D-F-1,6P), via l'utilisation de la D-fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FruA, EC 4.1.2.13) et de la triose-phosphate isomérase (TPI, EC 5.3.1.1). Cet aldéhyde est ensuite utilisé comme substrat accepteur de la TK d'*E. coli*, en présence du HPA comme substrat donneur, permettant la synthèse du D-xylulose-5-phosphate (D-X5P) avec un rendement de 82% sur une échelle de l'ordre du gramme. Ce pentose phosphorylé est un intermédiaire d'intérêt pour l'étude de maladies métaboliques [207], [208] mais également un substrat indispensable pour l'étude de nombreuses enzymes (Figure 30).

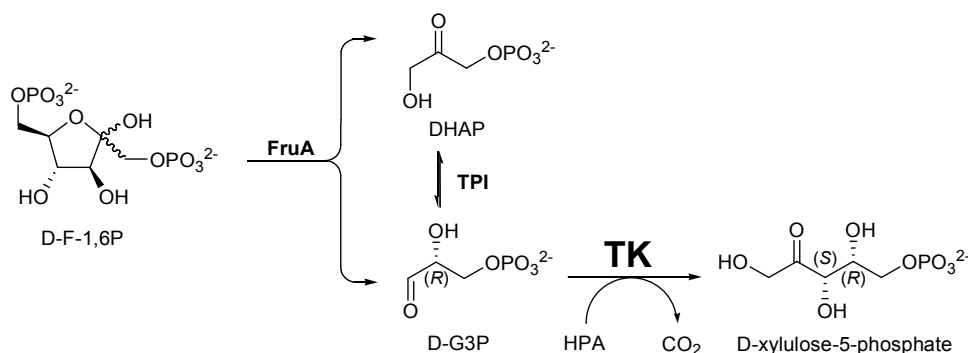


Figure 30 : Synthèse « one-pot » du D-X5P basée sur la génération *in situ* du D-G3P par voie enzymatique

4.2.3. Génération enzymatique du substrat donneur de la TK

L'utilisation du HPA comme substrat donneur de la TK est privilégiée car il permet de rendre la réaction irréversible. Cependant, ce composé est commercial mais très onéreux et sa synthèse, réalisée par voie chimique, implique l'utilisation de produits toxiques et conduit à des rendements modestes [101], [102], [115]. Ainsi, plusieurs groupes ont envisagé de générer ce composé *in situ* par voie enzymatique, en présence d'un aldéhyde accepteur de la TK, pour accéder au cétose correspondant. Deux voies sont décrites dans la littérature, à partir de la sérine comme précurseur. La première approche met en jeu une réaction catalysée par des transaminases, la seconde, par une D-amino acide oxydase.

Génération in situ du HPA par voie enzymatique catalysée par une transaminase (TA)

Des travaux ont été développés par le groupe du Pr. L. Hecquet, en collaboration avec le groupe Sanofi [209], pour obtenir le HPA *in situ* en présence de l' α -sérine glyoxylate transaminase de feuilles d'épinards (α -S:G-TA, EC 2.6.1.45), à partir de la L-sérine, comme substrat donneur d'amine et de l'acide glyoxylique, comme substrat accepteur. Ce procédé a été appliqué à la synthèse du 6-désoxy-L-sorbose, utilisé comme précurseur du furanéol, un arôme alimentaire ayant la saveur du caramel [209]. La problématique est ici la source de la transaminase, qui est en réalité un extrait brut obtenu à partir de feuilles d'épinards, ne permettant pas l'obtention de cette enzyme en grande quantité et avec une activité spécifique élevée (Figure 31).

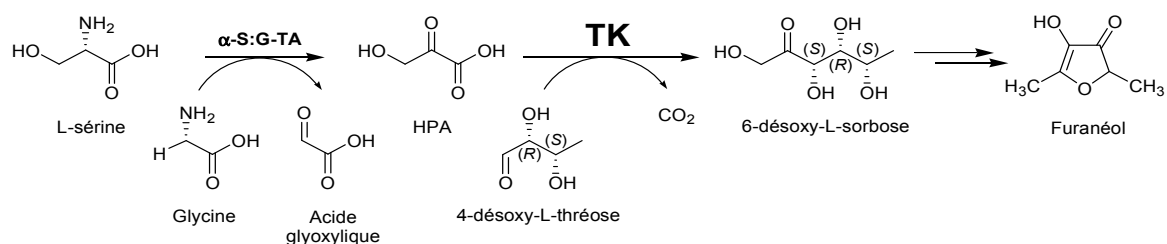


Figure 31 : Synthèse du 6-désoxy-L-sorbose via la génération *in situ* du HPA par voie enzymatique à partir de la L-sérine

Une autre stratégie a récemment été proposée par le groupe des Pr. H. E. Hailes et P. Dalby, en présence d'une amine-sérine pyruvate transaminase de *Rhodobacter sphaeroides* (amine-S:P-TA, EC 2.6.1.51), pour la synthèse de l'ABT. Dans ce procédé, le HPA est généré à partir de la L-sérine lors de l'étape de transamination du cétose, produit de la réaction catalysée par la TK. Ce procédé présente l'avantage de faire intervenir une seule transaminase pour la génération du HPA et l'amination du cétose et ne génère donc pas de sous-produits. Cependant, l'amine-S:P-TA est peu active vis-à-vis de la L-sérine et cette dernière enzyme utilise aussi le glycolaldéhyde, substrat de la TK, pour générer l'éthanolamine [210] (Figure 32).

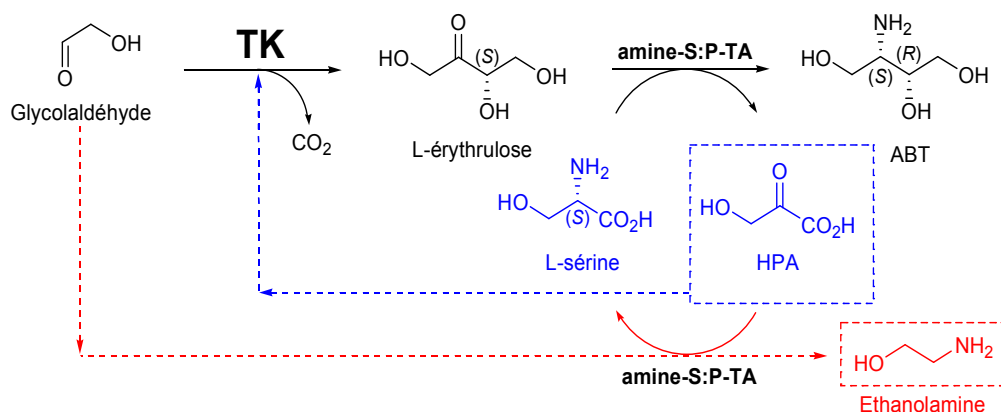


Figure 32 : Cascade multi-enzymatique basée sur le couplage de la TK d'*E. coli* et d'une transaminase pour la synthèse de l'ABT. Schéma extrait et traduit de la littérature [210].

Génération *in situ* du HPA par voie enzymatique catalysée par une D-aminoacide oxydase (D-AAO)

Une autre stratégie a également été envisagée par deux groupes pour générer le HPA *in situ*. Celle-ci est basée sur l'oxydation de la fonction amine de la sérine catalysée par la D-aminoacide oxydase (D-AAO, EC 1.4.3.3) en présence d'O₂, régénéré par la catalase (EC 1.11.1.6). Elle a été appliquée à la synthèse du D-xylulose, utilisé comme précurseur de molécules à activité thérapeutique [211], du D-S7P et du D-*ido*-heptulose-7-phosphate, précurseurs d'antibiotiques [23] et de composés inhibiteurs d' α -glycosidases [24].

Le groupe du Pr. L. Hecquet a décrit un procédé de synthèse bi-enzymatique « one-pot », dans lequel le HPA est généré *in situ*, via l'oxydation de la fonction amine de la D,L-sérine, moins coûteuse que la D-sérine, catalysée par la D-AAO commerciale. Le D-glycéraldéhyde, utilisé comme substrat accepteur de la TK de feuilles d'épinards, permet l'obtention du D-xylulose avec un rendement de 37% [212] (Figure 33 a)). Puis le groupe du Pr. H. G. Floss a développé une stratégie multi-enzymatique similaire, mais à partir de la L-sérine, qui est convertie en son énantiomère, la D-sérine, en présence d'une alanine racémase (EC 5.1.1.1). Cette stratégie permet d'éviter l'accumulation de la L-sérine dans le milieu, au contraire du cas précédent, réalisé à partir du mélange racémique. L'utilisation du D-R5P et du D-xylose-5-phosphate comme substrats accepteurs de la TK conduit respectivement à l'obtention du D-S7P et du D-*ido*-heptulose-7-phosphate avec des rendements de 69 % et 70 % [213] (Figure 33 b)).

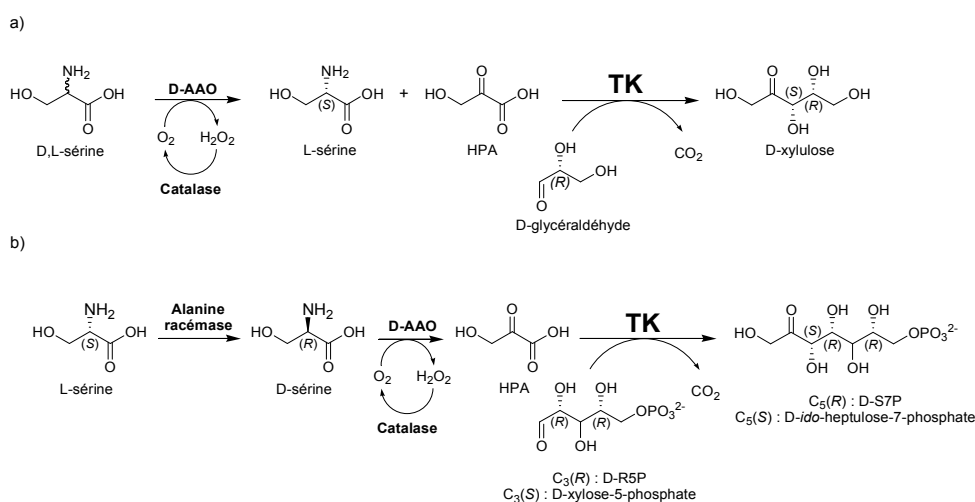


Figure 33 : Synthèse du D-xylulose, du D-S7P et du D-*ido*-heptulose-7-phosphate via la génération *in situ* du HPA à partir de la sérine. a) Synthèse du D-xylulose à partir de la D,L-sérine. b) Synthèse du D-S7P et du D-*ido*-heptulose-7-phosphate à partir de L-sérine.

4.3. Immobilisation de la TK et utilisation en milieu non conventionnel

4.3.1. Immobilisation de la TK

Compte-tenu de l'intérêt de la TK en synthèse et de son utilisation potentielle à l'échelle industrielle, différents groupes se sont intéressés à son immobilisation, afin d'assurer son recyclage et d'augmenter sa stabilité dans le temps.

Différentes méthodes d'immobilisation ont été envisagées, soit par liaison covalente sur un support organique de type Sépharose [214], soit par encapsulation sur gel de polyacrylamide [215] ou soit par adsorption sur résine Eupergit-C® [216], [217], sur résine Amberlite XAD-7 [217] ou encore sur résine Nylon [218]. Un autre procédé consiste à immobiliser la TK d'*E. coli* présentant une étiquette 6-His sur une résine chargée en ions Ni²⁺ chélatés par l'acide nitriloacétique (Ni-NTA), conduisant ainsi à une immobilisation réversible [219], [220], [221], [222]. Cette stratégie a été exploitée pour le développement de réacteurs microfluidiques dans lesquels la TK d'*E. coli*, couplée à l'amine-MBA pyruvate transaminase de *Chromobacterium violaceum*, sont immobilisées pour la synthèse de l'ABT, réalisée selon le procédé « one-pot » décrit précédemment dans le paragraphe 4.2.1. [219], [220], [222].

Enfin, le groupe de Pr. L. Hecquet, en collaboration avec l'équipe « Hydroxydes Doubles Lamellaires » (HDL) de l'ICCF, a développé un procédé non exploité jusqu'alors pour cette enzyme, consistant à immobiliser la TK sur un support inorganique de type argile (Hydroxydes Doubles Lamellaires, HDL), par adsorption ou co-précipitation. Cette approche a été appliquée à la TK de *S. cerevisiae* [223], la TK d'*E. coli* [224] et la TK de *G. stearothermophilus* [225], [226]. Peu coûteuse et facile à mettre en œuvre, cette méthode d'immobilisation permet de recycler l'enzyme au moins 6 fois pour la TK de *S. cerevisiae* [223], au moins 4 fois pour la TK d'*E. coli* [224] et au moins 4 fois pour la TK de *G. stearothermophilus* [225] et ceci, sans perte d'activité. De plus, elle assure une meilleure stabilité de l'enzyme dans le temps [223].

4.3.2. Utilisation de la TK en milieu non conventionnel

La stabilité thermique d'une enzyme allant souvent de pair avec une tolérance aux solvants non-conventionnels [227], l'équipe du Pr. L. Hecquet a étudié l'activité et la stabilité de la TK de *G. stearothermophilus*, libre et immobilisée, en présence d'un panel de liquides ioniques [225]. Ceux-ci sont constitués d'un cation de type imidazolium et ammonium et d'anions tels que [Cl], [CH₃CO₂], [BF₄] ou encore [Br] et ont été sélectionnés afin d'obtenir un milieu monophasique. Le chlorure de 1-butyl-3-méthylimidazolium ou [BMIM][Cl] s'est avéré être le liquide ionique le plus favorable pour maintenir l'activité de la TK de *G. stearothermophilus* : celle-ci conserve en effet plus de 80% de son activité après 16h d'incubation dans une solution à 50% de ce liquide ionique dans l'eau. De surcroît, en présence de 30% de [BMIM][Cl], son activité catalytique est significativement supérieure à celle déterminée en l'absence de liquide ionique vis-à-vis d'aldéhydes α -hydroxylés à 5 atomes de carbone, dont notamment le D-ribose (vitesse maximale apparente améliorée d'un facteur 2). Cette remarquable tolérance de la TK de *G. stearothermophilus* aux fortes concentrations en [BMIM][Cl] permettrait potentiellement d'augmenter la solubilité de certains substrats de l'enzyme.

De plus, dans le cadre d'un partenariat entre l'équipe du Pr. L. Hecquet, le groupe HDL de l'ICCF, l'Institut des Sciences Moléculaires (ISM) et l'Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux (ICMCB) de Bordeaux, il a été montré que des matériaux hybrides HDL/TK (de *G. stearothermophilus*) pouvaient être synthétisés selon un procédé « one-pot », en utilisant une approche par coprécipitation en flux hydrothermique continu (temps de résidence de 5 secondes, températures comprises entre 175°C et 200°C, pression de 20 MPa), illustrant la résistance de cette TK thermostable dans des conditions extrêmes [226].

Objectifs et Stratégies

La robustesse des enzymes thermostables en font des biocatalyseurs privilégiés pour des applications à l'échelle industrielle mais également d'excellentes candidates pour des travaux d'ingénierie. Ainsi, l'utilisation d'une TK thermostable est d'un intérêt majeur. Ces travaux de thèse sont centrés sur la TK thermostable issue de la bactérie thermophile *G. stearothermophilus*, la TK_{gst}, récemment identifiée et caractérisée par notre groupe [60].

Comme nous l'avons vu au cours de l'étude bibliographique, seules les TKs issues de microorganismes mésophiles tels que la bactérie *E. coli* ou la levure *S. cerevisiae*, ont été utilisées en biocatalyse pour la synthèse de composés d'intérêt. De plus, ces TKs ont fait l'objet de nombreux travaux de mutagenèse, notamment pour améliorer leurs activités vis-à-vis d'aldéhydes aliphatiques et aromatiques et pour améliorer et inverser leur stéréosélectivité, dans le but d'obtenir des cétooses de configuration (3*R*).

- Un des objectifs de ces travaux porte sur l'amélioration de l'activité de la TK_{gst} par Evolution dirigée vis-à-vis de substrats dont certains n'ont pas été envisagés dans la littérature. Un aspect jamais étudié porte sur l'inversion de la configuration du carbone 4 du cétoose formé. Pour cela, la TK_{gst} doit être modifiée pour qu'elle accepte des aldéhydes α -hydroxylés de configuration (2*S*) et ainsi, accéder aux cétooses de configuration L-érythro (3*S*, 4*S*) correspondants. La TK_{gst} de type sauvage conduit en effet préférentiellement à des cétooses de configuration D-thréo (3*S*, 4*R*), à partir d'aldéhydes α -hydroxylés de configuration (2*R*). Un autre défi, encore peu développé avec les TKs d'*E. coli* ou de *S. cerevisiae*, concerne l'amélioration de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2*R*) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6), pour la synthèse de cétooses de configuration D-thréo (3*S*, 4*R*) à 7 et 8 atomes de carbone à l'échelle préparative. Enfin, l'amélioration de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis d'aldéhydes aliphatiques et aromatiques, mais également vis-à-vis de nouveaux substrats donneurs, sera envisagée.

Pour atteindre cet objectif, la stratégie que nous avons envisagée consiste à « remodeler » l'enzyme par ingénierie selon une approche semi-rationnelle, qui conduira à des TK_{gst} mutées adaptées aux propriétés recherchées (Figure 34 a)). Les différentes étapes de cette stratégie sont les suivantes : une étape préliminaire consistera tout d'abord à explorer le spectre de substrats de la TK_{gst} à l'échelle analytique. L'étape suivante reposera sur la modification par Evolution *in vitro* de la TK_{gst}, afin d'augmenter son activité vis-à-vis des substrats identifiés lors de l'étape préliminaire. Pour cela, des résidus clés du site actif de l'enzyme seront sélectionnés, grâce à l'étude de sa structure 3D par modélisation moléculaire. Les banques de TK_{gst} mutées générées par mutagenèse

par saturation de site, en utilisant la stratégie « CAST », seront ensuite criblées vis-à-vis des substrats d'intérêt. Les TK_{gst} mutées les plus performantes seront enfin purifiées puis caractérisées plus finement à l'échelle analytique.

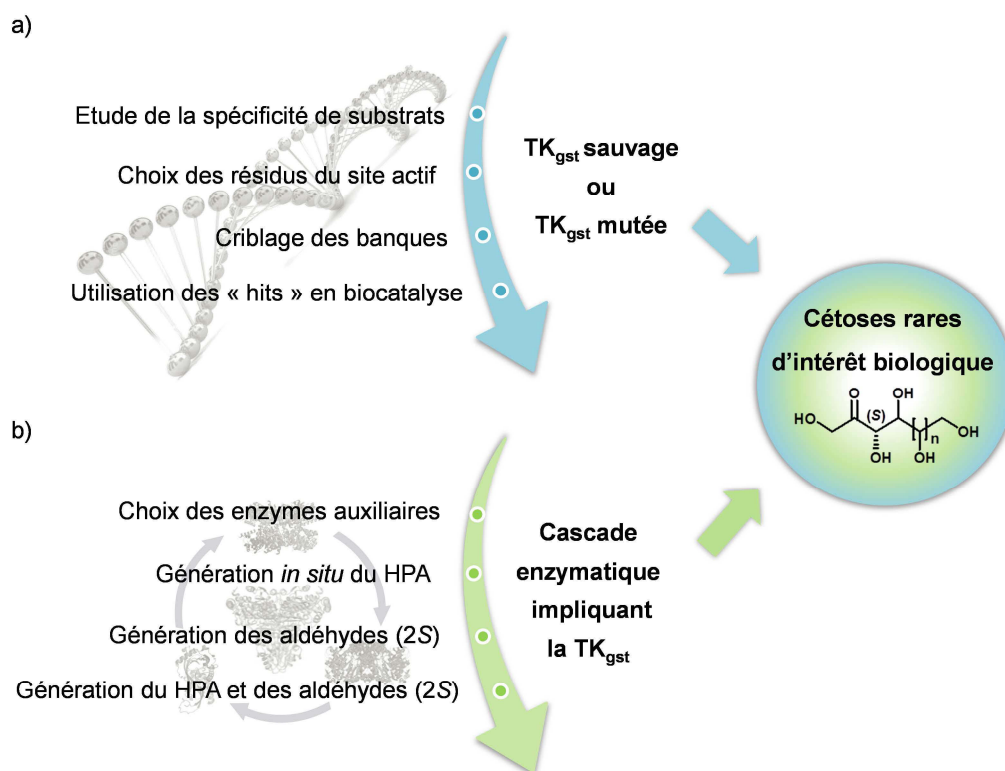


Figure 34 : Stratégies envisagées pour accéder aux cétooses rares d'intérêt biologique

▪ L'autre objectif de ces travaux concerne l'optimisation du procédé enzymatique catalysé par le TK_{gst} à haute température. Le défi sera d'accéder de façon efficace grâce à une température élevée, à des cétooses rares de haute valeur ajoutée, dont l'accès est difficile, voire impossible à température ambiante avec cette enzyme. La TK_{gst} sauvage et les TK_{gst} mutées les plus performantes seront utilisées pour la synthèse à haute température des cétooses correspondants.

Pour améliorer les rendements, tout en privilégiant l'utilisation de substrats naturels et peu coûteux, la stratégie envisagée sera de générer par voie enzymatique les substrats donneurs et/ou accepteurs de la TK_{gst} . L'enzyme sauvage sera utilisée pour l'optimisation des différentes étapes. Le verrou majeur qui devra être levé est l'instabilité du Li-HPA à haute température. Celui-ci sera ainsi généré *in situ* par voie enzymatique, *via* l'utilisation d'une transaminase et d'une D-aminoacide oxydase, à partir respectivement de la L- et D-sérine, deux composés non toxiques et très peu coûteux. D'autre part, des aldéhydes α -hydroxylés (2S), particulièrement onéreux, seront générés par voie enzymatique, *via*

l'utilisation d'une aldolase sauvage ou mutée, à partir d'aldéhydes achiraux à très courte chaîne carbonée plus accessibles, le glycolaldéhyde et le formaldéhyde. Finalement, la génération par voie enzymatique du substrat donneur et du substrat accepteur dans une même cascade multi-enzymatique, sera appliquée à la synthèse d'un cétose comme « preuve de principe », en présence des trois enzymes nécessaires (Figure 34 b)).

Résultats et Discussions

1. Production et caractérisation de la TK de *Geobacillus stearothermophilus* (TK_{gst})

1.1. Introduction

Ces travaux de thèse sont centrés sur la TK thermostable de *G. stearothermophilus*, la TK_{gst}, identifiée récemment au laboratoire dans le cadre d'un projet ANR précédent (DeoTK) [60]. Cette enzyme n'ayant jamais été identifiée dans ce microorganisme auparavant, sa caractérisation a été initiée par le groupe du Pr. L. Hecquet, dans le cadre du projet ANR DeoTK [228]. Comme nous l'avons vu au cours de l'étude bibliographique, l'activité optimale de la TK_{gst} se situe à 70°C et cette enzyme est 11 fois plus active à cette température qu'à 20°C [60]. Cette TK étant très robuste, elle est particulièrement adaptée à nos objectifs, qui visent d'une part, à réaliser des expériences de mutagenèse pour améliorer et modifier son spectre de substrats et d'autre part, à exploiter son potentiel synthétique à haute température.

Afin d'atteindre ces objectifs, mes travaux ont consisté à produire la TK_{gst} sauvage, puis, afin de mieux caractériser cette enzyme, son spectre de substrat a été étudié et ses paramètres cinétiques apparents vis-à-vis de ses cofacteurs et d'un large panel de substrats donneurs et accepteurs ont été déterminés.

Pour l'ensemble de cette étude, réalisée à l'échelle analytique, les mesures ont été effectuées à 25°C, afin de comparer les résultats avec ceux obtenus dans la littérature. De plus, lorsque que de nombreux essais ont été nécessaires (détermination des paramètres cinétiques, étude de la spécificité de substrat), les mesures ont été réalisées en microplaques 96-puits, *via* l'utilisation d'un lecteur de plaques (dont il n'est pas possible de réguler la température au-delà de 40°C), avec le test d'activité en présence du rouge de phénol, utilisé comme indicateur coloré, récemment développé par l'équipe du Pr. W.-D. Fessner, en collaboration avec notre groupe [122]. Ce test, décrit dans le chapitre précédent (Voir paragraphe 3.3.2., page 45), est référencé sous le nom « test TK_{ROUGE DE PHENOL} » dans la suite de ce manuscrit. En revanche, lorsque le nombre d'essai était plus réduit, le « test TK_{ROUGE DE PHENOL} » ou le « test TK_{ADH} », décrit par la suite (Voir paragraphe 1.2.2., page 72) ont été utilisés en macrocuve, au moyen d'un spectrophotomètre thermostaté par effet Peltier, permettant, dans certains cas, de mettre en évidence l'effet de la température sur l'activité de la TK_{gst}.

1.2. Production de la TK_{gst}

1.2.1. Expression

Dans le cadre du projet ANR DeoTK, un gène « synthétique » de la TK_{gst} a été commandé à la société Invitrogen, afin de produire cette enzyme. Ce gène synthétique comporte une séquence codant pour une étiquette comportant 6 histidines (6-His), positionnée à l'extrémité N-terminale de la séquence protéique, afin de faciliter la purification de cette enzyme. Ce gène « synthétique » a été utilisé dans le cadre de ces travaux de thèse.

Ce gène a été cloné dans le vecteur d'expression pGEN452 possédant un gène de résistance à la kanamycine. Ainsi, l'expression du gène est sous le contrôle du promoteur T7, permettant la production de la TK_{gst} en grande quantité. Après transformation de la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS par le plasmide résultant pGEN768, les cellules exprimant la TK_{gst} sont cultivées dans notre laboratoire dans un milieu approprié en présence de kanamycine (Voir *Partie Expérimentale*) puis recueillies par centrifugation. Les cellules sont ensuite lysées par sonication à 4°C en présence de tampon. La suspension résultante est centrifugée et le surnageant, correspondant au lysat cellulaire et contenant l'enzyme surexprimée, est recueilli pour être purifié.

N.B. : La souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS contient le plasmide pLysS, qui code pour le lysozyme du promoteur T7, un inhibiteur naturel de l'ARN polymérase de ce promoteur. La présence de cet inhibiteur prévient toute expression basale du gène de la TK_{gst}, en l'absence d'induction. Puis l'induction par l'IPTG lève cette inhibition par l'action du promoteur T7. Ce plasmide comporte un gène de résistance au chloramphénicol, un antibiotique toxique appartenant à la classe des CMR (Cancérigène, Mutagène, Reprotoxique). Des études complémentaires nous ont permis de montrer que 99% des clones se développent en présence de chloramphénicol, à la suite de 8 cultures bactériennes successives réalisées en l'absence de cet antibiotique ; le plasmide pLysS est donc conservé dans 99% des cas. Ainsi, nous avons fait le choix de ne pas introduire cet antibiotique dans les cultures, réalisées en présence de kanamycine uniquement. Ce dernier permet de vérifier la présence du vecteur d'expression pGEN768, qui contient un gène de résistance à cet antibiotique.

1.2.2. Purification par IMAC

La purification de la TK_{gst}, exprimée avec une étiquette 6-His en position N-terminale, a été réalisée par chromatographie d'affinité en présence de cations métalliques (IMAC), à température ambiante (Figure 35 a)). Le lysat cellulaire est déposé sur une colonne contenant une résine chargée en ions Ni²⁺, chélatés par l'acide nitriloacétique (résine Ni-NTA). La TK_{gst} se fixe alors sur la résine par liaison de coordination entre les 6-His de l'étiquette et les cations Ni²⁺, tandis que les autres protéines ne sont pas retenues (Figure 35 b)). Enfin, la TK_{gst} est éluée après ajout d'une solution d'imidazole à forte concentration, qui permet de déplacer l'équilibre par compétition de ligands. Des études préalables ayant montré que les TKs de *S. cerevisiae* ou TK_{sce} et d'*E. coli* ou TK_{eco} précipitent en présence prolongée d'imidazole, une étape de dialyse est systématiquement réalisée après la purification, afin de recueillir la TK_{gst} purifiée sans imidazole.

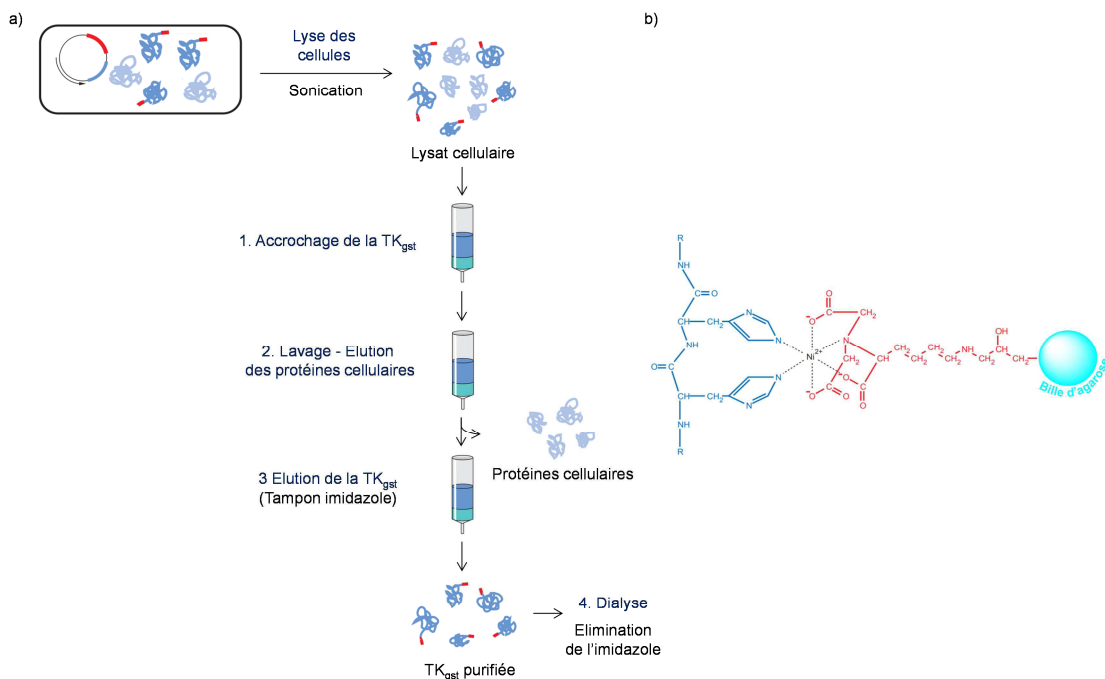


Figure 35 : Purification de la TK_{gst} par IMAC

a) Principe de la purification par IMAC. b) Interaction entre l'étiquette 6-His et la matrice Ni-NTA. Schémas traduits et adaptés des manuels « The QIAexpressionist™ » et « TAGZyme™ Handbook » de la société Qiagen.

La surexpression de la TK_{gst} et la pureté de l'extrait purifié ont été vérifiées par électrophorèse en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) sur gel d'acrylamide (15%) (SDS-PAGE) [229]. L'électrophorégramme présente une bande unique à environ 74 kDa, correspondant au poids moléculaire d'un monomère de la TK.

L'activité enzymatique de la TK_{gst} purifiée a été évaluée par un test spectrophotométrique direct, communément utilisé et décrit dans la littérature [99], en présence du L-érythrulose comme substrat donneur, du D-R5P comme substrat accepteur, d'une enzyme auxiliaire, l'alcool déshydrogénase (ADH) et du cofacteur NADH. La consommation de NADH, H⁺, proportionnelle à la quantité de L-érythrulose convertie au cours du temps, est suivie par la mesure de son absorbance à 340 nm. Une unité de TK_{gst} (U) correspond à une micromole de L-érythrulose ou de D-R5P (ou de glycolaldéhyde) convertie par minute (μmol.min⁻¹). Ce test d'activité est réalisé en macrocuve et sera référencé par la suite sous le nom de « test TK_{ADH} » (Figure 36).

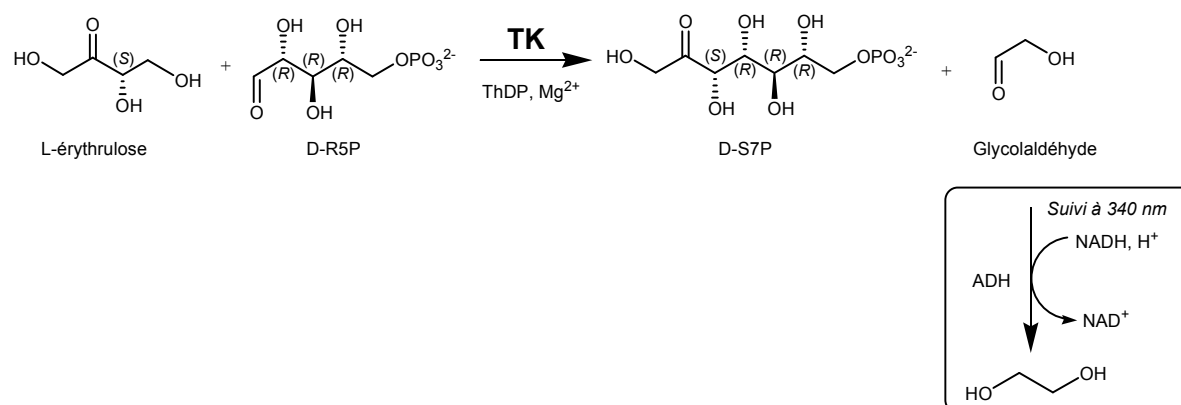


Figure 36 : Test d'activité de la TK (« test TK_{ADH} »)

L'activité enzymatique de la TK_{gst} a ainsi été mesurée, avant et après purification et le rendement de la purification a été calculé pour un litre de culture cellulaire (Tableau 10). Les concentrations en protéines (mg.mL⁻¹) ont été déterminées par le test de Bradford [230].

Fraction	Activité [U]	Protéines [mg]	Activité spécifique [U.mg ⁻¹]	Facteur de purification	Rendement [%]
Lysat cellulaire	398	446	0,89	-	-
TK _{gst} purifiée	324	160	2,02	2,29	81,6

Tableau 10 : Activité de la TK_{gst} avant et après purification par IMAC déterminées à l'aide du « test TK_{ADH} » en présence du L-érythrulose (100 mM) et du D-R5P (8 mM) à 25°C Pour 1 L de culture cellulaire (soit 3,73 g. L⁻¹ de cellules humides)

Cette procédure de purification a permis l'obtention de 160 mg de TK_{gst} purifiée à partir de 1 L de culture contenant 3,73 g de cellules humides. L'activité spécifique de la TK_{gst} est relativement faible car elle a été déterminée à 25°C, température ambiante. Cette enzyme

étant issue d'un microorganisme thermophile, son activité augmente avec la température et est améliorée d'un facteur 9 à 60°C et d'un facteur 11 à 70°C [60] (Figure 37).

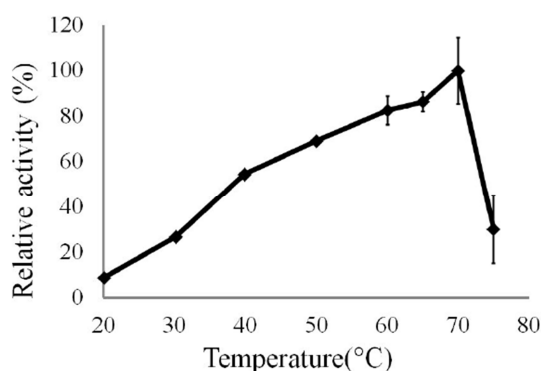


Figure 37 : Profil de l'activité de la TK_{gst} en fonction de la température
Schéma extrait de la littérature [60]

De plus, l'activité de la TK_{gst} est parfaitement conservée durant au moins 7 jours à 50°C, durant 4 jours à 60°C et durant 3 jours à 65°C [60]. Après purification, la TK_{gst} peut être lyophilisée et conservée à -18°C sans perte d'activité durant plusieurs mois.

Remarque : L'étude du modèle structural de la TK_{gst} (dont la construction est décrite dans le paragraphe 2.2.1. du chapitre suivant) et sa comparaison avec la structure 3D de la TK_{eco}, nous ont permis d'identifier 4 interactions électrostatiques entre les deux sous-unités de la TK_{gst}, qui n'existent pas chez la TK_{eco}. Ainsi, la présence de ces interactions « monomère-monomère », plus nombreuses chez la TK_{gst} que chez la TK_{eco}, permettrait d'expliquer en partie la grande résistance à haute température de la TK_{gst} en comparaison de la TK_{eco}, issue d'un microorganisme mésophile.

1.3. Etude cinétique de la réaction catalysée par la TK_{gst}

Dans cette étude, la TK_{gst} sera caractérisée sur le plan cinétique (activités spécifiques, détermination des paramètres cinétiques apparents) vis-à-vis de ses deux cofacteurs, mais également vis-à-vis de divers substrats donneurs et accepteurs. Notre objectif est ici de préciser son spectre de substrats qui n'était jusqu'alors pas connu, cette enzyme n'ayant jamais été décrite dans la littérature. La TK_{gst} faisant intervenir deux substrats, les paramètres cinétiques sont déterminés pour un substrat tandis que la concentration du second substrat est fixée ; ils seront notés : K_M^{app} (Constante de Michaelis-Menten apparente) et V_{max}^{app} (Vitesse maximale apparente) dans la suite de ce manuscrit.

1.3.1. Détermination des paramètres cinétiques apparents vis-à-vis des cofacteurs ThDP et Mg²⁺

Les paramètres cinétiques apparents K_M^{app} et V_{max}^{app} de la TK_{gst} vis-à-vis de ses cofacteurs, le ThDP et le Mg²⁺, ont été déterminés en présence du Li-HPA comme substrat donneur (50 mM) et du glycolaldéhyde comme substrat accepteur (20 mM). Les valeurs de K_M^{app} mesurées ont ensuite été comparées à celles décrites dans la littérature pour la TK_{sce} et la TK_{eco} (Tableau 11).

	TK _{gst}			TK _{sce}	TK _{eco}
	K_M^{app}	V_{max}^{app}	V_{max}^{app}/K_M^{app}	K_M	V_{max}
	[μM]	[U.mg ⁻¹]	[U.mg ⁻¹ .μM ⁻¹]	[μM]	[μM]
ThDP	1,8 ± 0,0002 ¹	22,7 ± 2,567 ¹	12,6	0,6 ± 0,1 ^[88]	1,8 ^[231]
Mg ²⁺	1,4 ± 0,002 ²	25,2 ± 4,639 ²	18	400 ^[232]	-

Tableau 11 : Paramètres cinétiques apparents de la TK_{gst} vis-à-vis du ThDP et du Mg²⁺ déterminés à l'aide du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} » en présence du Li-HPA (50 mM) et du glycolaldéhyde (20 mM) à 25 °C. ¹ [Mg²⁺] = 1 mM. ² [ThDP] = 0,1 mM. Les valeurs indiquées en présence de la TK_{eco} et de la TK_{sce} sont issues de la littérature.

La méthode de Hanes-Woolf a permis de déterminer un K_M^{app} de 1,8 ± 0,0002 μM et une V_{max}^{app} de 22,7 ± 2,567 U.mg⁻¹ pour le ThDP et un K_M^{app} de 1,4 ± 0,002 μM et une V_{max}^{app} de 25,2 ± 4,639 U.mg⁻¹ pour le Mg²⁺. Le K_M^{app} déterminé pour la TK_{gst} vis-à-vis du ThDP est du même ordre de grandeur que celui déterminé pour la TK_{sce} et la TK_{eco}. En revanche, le K_M^{app} mesuré vis-à-vis du Mg²⁺ est significativement inférieur à celui mentionné dans la littérature pour la TK_{sce}.

1.3.2. Etude de la spécificité vis-à-vis des substrats donneurs

1.3.2.1. Activités vis-à-vis d'un panel d'α-cétoacides

Le Li-HPA a tout d'abord été testé comme α-cétoacide donneur (50 mM), puisqu'il permet de rendre la réaction irréversible [233]. Puis afin d'étendre le potentiel synthétique de la TK_{gst}, un panel d'α-cétoacides, structurellement proches du Li-HPA, ont été envisagés comme substrats donneurs potentiels (50 mM), en présence du glycolaldéhyde comme substrat accepteur (20 mM) (Figure 38). Tous ces composés sont commerciaux, à l'exception du 3-hydroxy-2-oxobutanoate de potassium ou HOBA (mélange racémique). Celui-ci a été synthétisé *via* un procédé chimique, basé sur la condensation de Baylis Hillman entre

l'acrylate de méthyle et l'acétaldéhyde (Travaux de thèse du Dr. E. Heuson, encadré par le Pr. T. Gefflaut, Equipe BioMéta, ICCF).

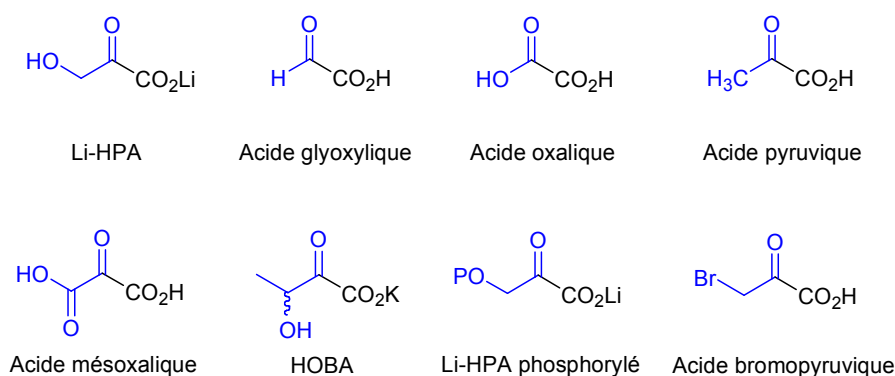


Figure 38 : Panel d' α -cétoacides testés comme substrats donneurs potentiels (50 mM) de la TK_{gst} à l'aide du « test $TK_{ROUGE\ DE\ PHENOL}$ » en présence du glycolaldéhyde comme substrat accepteur (50 mM) à 25°C. HOBA = 3-hydroxy-2-oxobutanoate de potassium - P = PO_3^{2-}

Parmi les différents α -cétoacides testés, la TK_{gst} présente l'activité spécifique la plus élevée en présence du Li-HPA ($4,18\ U.mg^{-1}$). Aucune activité, mesurable dans les conditions du test, n'a été détectée vis-à-vis des autres α -cétoacides testés, à l'exception de l'acide pyruvique. L'utilisation de l'acide pyruvique comme substrat donneur de la TK n'avait jusqu'alors jamais été décrite dans la littérature. Son utilisation permettrait l'accès à un large éventail de monosaccharides en série 1-désoxy. Ce résultat obtenu à l'échelle analytique a par la suite été confirmé à l'échelle préparative. L'acide pyruvique a été utilisé en tant que substrat donneur pour synthétiser à plus grande échelle le 1-désoxy-L-érythrose **12**, en présence du glycolaldéhyde comme substrat accepteur, à 60°C.

Néanmoins, l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis de cet α -cétoacide est très faible ($0,02\ U.mg^{-1}$, soit environ 0,5% de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis du Li-HPA) et la synthèse du 1-désoxy-L-érythrose **12** est peu efficace, puisqu'un rendement de 20% a été obtenu. Ainsi, l'équipe du Pr. W.-D. Fessner, notre partenaire sur ce projet, a envisagé d'améliorer l'affinité de la TK_{gst} vis-à-vis de ce nouveau donneur et d'analogues par Evolution dirigée [234]. La description et les résultats de cette étude seront décrits dans le paragraphe 2.6. du chapitre suivant.

1.3.2.2. Détermination des paramètres cinétiques apparents vis-à-vis du Li-HPA

Les paramètres cinétiques apparents K_M^{app} et V_{max}^{app} de la TK_{gst} vis-à-vis du Li-HPA ont été étudiés en vue de son utilisation en tant que substrat donneur pour la réalisation de synthèses enzymatiques catalysées par la TK_{gst} à l'échelle préparative. Différentes

concentrations en Li-HPA ont été testées en présence de la TK_{gst}, de ses cofacteurs (ThDP et Mg²⁺) et du glycolaldéhyde (50 mM), utilisé comme substrat accepteur, dans le tampon Gly-gly 50 mM, pH 7,5, à 25°C. Des échantillons du milieu réactionnel ont été prélevés au cours du temps et la concentration du Li-HPA résiduel a été déterminée par le dosage enzymatique en présence de la L-lactate déshydrogénase (L-LDH) et du cofacteur NADH, tel que décrit dans le paragraphe 2.2.4.2. de la *Partie Expérimentale*.

La TK_{gst} présente une cinétique de type Michaelis-Menten vis-à-vis du Li-HPA. La méthode de Hanes-Woolf a permis de calculer un K_M^{app} de 2,5 ± 0,2 mM et un V_{max}^{app} de 135 ± 7 U.mg⁻¹ à 25°C (Tableau 12), des valeurs de K_M très proches, *i.e* 3,8 ± 0,4 mM, 2,92 ± 0,08 mM et 2,3 ± 0,7 mM ayant été mentionnées dans la littérature [225], [234], [235].

	K _M ^{app} [mM]	V _{max} ^{app} [U.mg ⁻¹]	V _{max} ^{app} /K _M ^{app} [U.mg ⁻¹ .mM ⁻¹]
TK _{gst}	2,5±0,2	135±7	54
TK _{eco}	18 [58]	60 [58]	3
TK _{sce}	7 [109] - 33 [110]	9 [37]	1,28 - 0,27
TK _{spi}	-	2 [37]	-

Tableau 12 : Paramètres cinétiques apparents de la TK_{gst} vis-à-vis du Li-HPA en présence du glycolaldéhyde (50 mM), déterminés par le dosage enzymatique du Li-HPA en présence de la L-LDH et du NADH, à 25°C. Les valeurs indiquées en présence de la TK_{eco}, de la TK_{sce} et de la TK_{spi} sont issues de la littérature.

Le K_M^{app} vis-à-vis du Li-HPA est inférieur à celui de la TK_{eco} et de la TK_{sce}. De plus, la V_{max}^{app} atteinte est largement supérieure à celles déterminées pour les autres sources de TKs (TK_{eco}, TK_{sce} et TK de feuilles d'épinards ou TK_{spi}). L'efficacité de la réaction en présence de ce substrat est donc excellente (rapport V_{max}^{app}/K_M^{app} de 54 U.mg⁻¹.mM⁻¹) ; la V_{max} sera ainsi facilement atteinte et ceci à de faibles concentrations en Li-HPA. Il est à noter qu'aucune inhibition de la TK_{gst} n'a été observée pour des concentrations en Li-HPA allant jusqu'à 70 mM, un K_i de 42 mM pour la TK_{eco} vis-à-vis de ce substrat donneur ayant été décrit dans la littérature [236].

1.3.3. Etude de la spécificité vis-à-vis des substrats accepteurs

La spécificité des TK_{sce} et TK_{eco} vis-à-vis de différents aldéhydes accepteurs a largement été décrite dans la littérature et les vitesses relatives comme les paramètres cinétiques, déterminés pour des substrats physiologiques ou non, montrent un comportement semblable de ces deux enzymes [37], [58], [99], [122].

L'étude du spectre de substrat de la TK_{gst} a été initiée dans le cadre du projet ANR DeoTK avec quelques aldéhydes accepteurs [60]. A la suite de ces premiers résultats, nous avons envisagé une étude plus complète de la spécificité de la TK_{gst} vis-à-vis d'un large panel d'aldéhydes. Pour cela, nous avons tout d'abord déterminé les activités spécifiques de la TK_{gst} vis-à-vis d'un ensemble de substrats accepteurs non-naturels, testés pour la plupart avec les TK_{sce} et TK_{eco} [37], [105], [111]. Puis l'influence de la température sur l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis de certains de ces aldéhydes a été étudiée. Enfin, les paramètres cinétiques apparents de cette enzyme vis-à-vis de quelques-uns de ces substrats accepteurs ont été déterminés. Dans ce cadre, le substrat donneur utilisé est toujours le Li-HPA car il rend la réaction irréversible. Ces travaux ont fait l'objet de deux articles dont je suis co-auteur, publiés dans les journaux *Advanced Synthesis and Catalysis* en 2015 [237] et *Green chemistry* en 2017 [238]. Ces publications sont fournies en annexe de ce manuscrit.

1.3.3.1. Activité vis-à-vis d'un panel d'aldéhydes

Analyses des résultats obtenus à 25°C en présence d'un panel d'aldéhydes

L'activité spécifique de la TK_{gst} a été déterminée vis-à-vis d'un large éventail d'aldéhydes accepteurs polyhydroxylés (C2 à C6) énantiomériquement purs et vis-à-vis de quelques aldéhydes aliphatiques et aromatiques, sélectionnés d'une part, pour leur diversité structurale et d'autre part, car ils ont déjà, pour une grande majorité, été testés avec la TK_{sce} et la TK_{eco} [37], [105], [111] (Tableau 13).

Aldéhydes polyhydroxylés					
C2-C3					
	Glycolaldéhyde	D-glycéraldéhyde	L-glycéraldéhyde	D-lactaldéhyde	L-lactaldéhyde
C4					
	D-érythrose	L-thréose	D-thréose	L-érythrose	
C5					
	D-ribose	D-xylose	D-arabinose	D-lyxose	
C6					
	D-allose	D-glucose	D-mannose		
Aldéhydes aliphatiques et aromatiques					
	Propanal	Butanal	Cyclohexanal	Benzaldéhyde	

Tableau 13 : Panel d'aldéhydes polyhydroxylés et d'aldéhydes aliphatiques et aromatiques testés comme substrats accepteurs de la TK_{gst}

La détermination des activités spécifiques de la TK_{gst} vis-à-vis des différents aldéhydes testés a été réalisée à 25°C, en présence de 50 mM de Li-HPA, concentration vingt fois supérieure au K_M^{app} de 2,5 mM, déterminé précédemment. Dans le cas des aldéhydes en présence desquels la TK_{gst} est peu active, il a été nécessaire d'augmenter leur concentration, afin de pouvoir détecter une activité, mesurable dans les conditions du test. Enfin, il est à noter que le propanal, le butanal et le benzaldéhyde sont solubles en milieu aqueux aux concentrations envisagées, alors que la dissolution du cyclohexanal a nécessité l'ajout de 20% v/v de DMSO au milieu réactionnel (teneur compatible avec l'activité de la TK_{gst} sur la durée de la mesure [228]) (Figure 39).

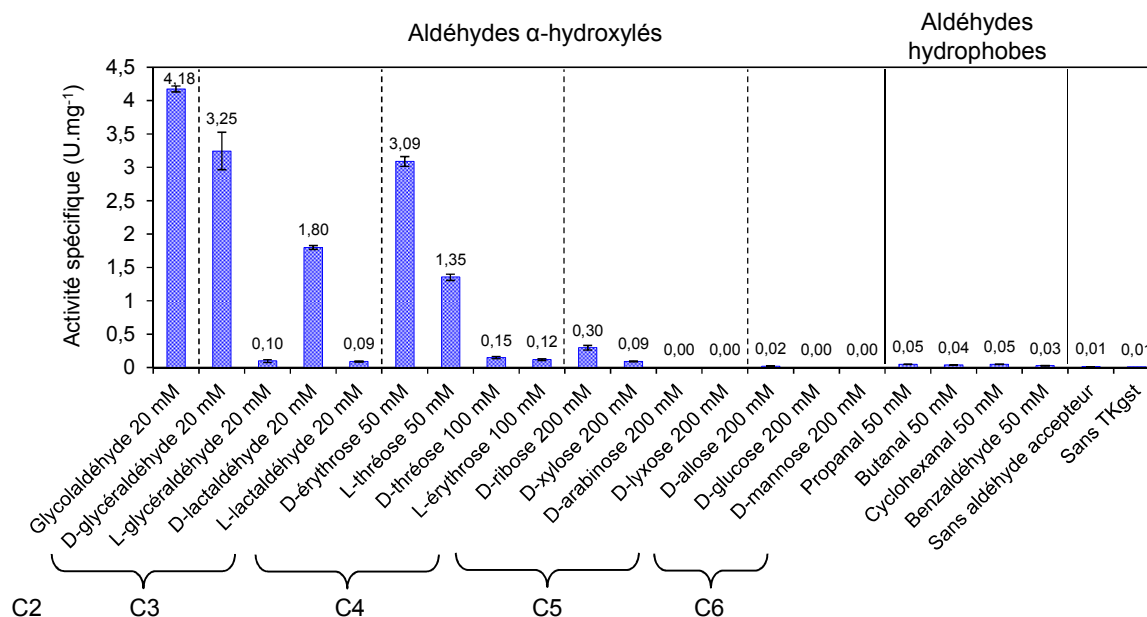


Figure 39 : Activités spécifiques de la TK_{gst} vis-à-vis d'un panel d'aldéhydes accepteurs (20-200 mM) déterminées à l'aide du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} » en présence de 50 mM de Li-HPA à 25°C

De même que pour la TK_{sce} [114] et la TK_{eco} [115], le glycolaldéhyde (20 mM) est l'aldéhyde α -hydroxylé non phosphorylé en présence duquel la TK_{gst} est la plus active.

De plus, les activités mesurées en présence des aldéhydes α -hydroxylés (2R), le D-glycéraldéhyde, le D-lactaldéhyde, le D-érythrose ou encore le L-thréose, sont proches de celles obtenues avec les autres sources de TK décrites dans la littérature. Les résultats montrent que l'allongement de la chaîne carbonée des aldéhydes polyhydroxylés (2R) entraîne une chute significative des activités de la TK_{gst}. Il est surprenant de constater que les analogues (2S) à 3 et 4 atomes de carbone tels que le L-glycéraldéhyde, le L-lactaldéhyde, le L-érythrose et le D-thréose, sont également acceptés par l'enzyme. Néanmoins, les valeurs mesurées sont beaucoup plus faibles qu'en présence des analogues (2R) (20 et 30 fois plus faibles environ dans le cas du lactaldéhyde et du glycéraldéhyde, respectivement, par exemple). Ce résultat est inédit car les aldéhydes α -hydroxylés (2S), notamment le L-glycéraldéhyde, n'ont jamais été décrits dans la littérature comme étant des substrats de la TK_{sce} [109], [116] et de la TK_{eco} [115]. Toutefois, les résultats montrent que lorsque que le nombre d'atomes de carbone des aldéhydes α -hydroxylés (2S) atteint cinq (D-arabinose, D-lyxose) ou six (D-mannose), aucune activité n'est détectée.

Par ailleurs, la configuration (R) du carbone 3 des aldéhydes polyhydroxylés influence positivement l'activité de la TK_{gst}. Effectivement, celle-ci est deux fois plus active vis-à-vis du D-érythrose (50 mM) de configuration (3R) que vis-à-vis du L-thréose (50 mM), de

configuration (3S). De plus, une augmentation de l'activité d'un facteur 3 est observée entre le D-ribose (200 mM) de configuration (3R) et le D-xylose (200 mM), de configuration (3S). Enfin, le D-glucose (200 mM), de configuration (3S), n'est pas accepté par la TK_{gst} alors qu'une activité est détectée en présence du D-allose (200 mM), de configuration (3R). Cette tendance a déjà été observée dans le cas de la TK_{sce} [114] et de la TK_{spi} [100].

L'absence d'une fonction hydroxyle en position β de la fonction aldéhydique entraîne une baisse de l'activité de la TK_{gst} d'un facteur 2 environ, entre le D-glycéraldéhyde et le D-lactaldéhyde.

Enfin, de faibles activités ont été mesurées en présence d'aldéhydes aliphatiques linéaires et cycliques (50 mM) (propanal, butanal, cyclohexanal) et aromatiques (benzaldéhyde) (50 mM). Comme dans le cas des aldéhydes polyhydroxylés, l'allongement de la chaîne carbonée conduit à une diminution de l'activité de la TK_{gst} (activité plus élevée vis-à-vis du propanal par rapport au butanal). Par conséquent, l'amélioration de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes hydrophobes par Evolution dirigée est un des objectifs de notre projet ANR ThermoTK. Ces travaux, auxquels j'ai participé, ont été développés par le groupe du Pr. W.-D. Fessner, notre partenaire [175], [238], [239]. La description et les résultats de ces études seront décrits dans le paragraphe 2.5. du chapitre suivant.

En conclusion, la spécificité de substrat accepteur de la TK_{gst} est très similaire à celle des TK_{sce} et TK_{eco}. La TK_{gst} est très active vis-à-vis d'aldéhydes α -hydroxylés (2R) à courte chaîne. L'allongement de la chaîne carbonée des aldéhydes polyhydroxylés, l'absence d'une fonction hydroxyle en position α ou β de l'aldéhyde, la présence d'une chaîne non hydroxylée ou la présence d'un cycle aromatique, entraîne une chute significative de son activité. En revanche, la TK_{gst} se distingue des autres TKs microbiennes décrites par son activité vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2S) à 3 et 4 atomes de carbone, jusqu'alors jamais décrite pour une TK. Ces aldéhydes sont particulièrement intéressants car ils pourraient conduire à l'obtention de cétooses rares à haute valeur ajoutée.

Analyse des résultats obtenus à 60°C en présence d'aldéhydes α -hydroxylés (2S)

Compte-tenu de l'activité plus élevée de la TK_{gst} à haute température [60], nous avons envisagé de déterminer son activité spécifique à 60°C, une température très proche de sa température optimale (70°C), vis-à-vis des quatre aldéhydes α -hydroxylés (2S) à 3 et 4 atomes de carbone, identifiés précédemment comme substrats accepteurs, mais conduisant à de très faibles activités à 25°C. Afin de contrôler précisément ce paramètre, les

expériences ont été réalisées en macrocuve, dont la température est contrôlée par un thermostat à effet Peltier. La TK_{gst} a été incubée en présence de tous les composants du test excepté le Li-HPA à 60°C jusqu'à ce que cette température soit atteinte, puis le Li-HPA a été ajouté pour initier la réaction. L'absorbance du milieu a été mesurée à 560 nm durant 30 minutes. Ce test n'ayant jusqu'alors jamais été utilisé à haute température, la stabilité du Li-HPA et du rouge de phénol à 60°C ont été vérifiées individuellement sur la durée des mesures et les contrôles négatifs (*i.e.* sans aldéhyde accepteur, sans Li-HPA et sans TK_{gst}) ont été effectués. Dans ce cas, la concentration de tous les aldéhydes a été fixée à 100 mM et le Li-HPA a été utilisé à une concentration finale de 50 mM. Enfin, les mesures ont également été réalisées à 25°C, à titre de comparaison (Figure 40).

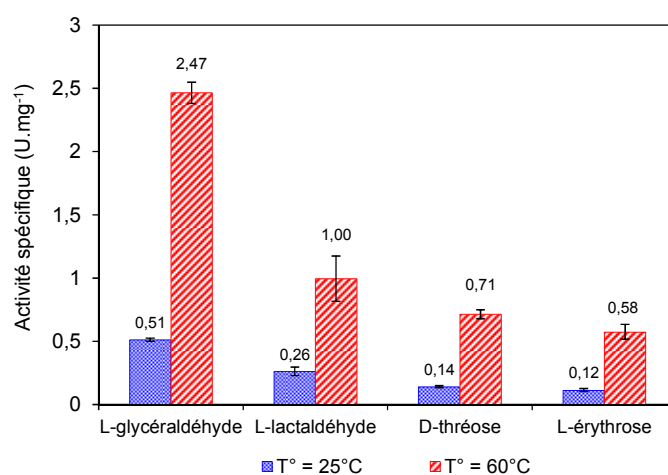


Figure 40 : Activités spécifiques de la TK_{gst} vis-à-vis d'un panel d'aldéhydes α -hydroxylés (2S) (100 mM) déterminées à l'aide du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} » en présence de 50 mM de Li-HPA à 25°C et 60°C

L'activité spécifique de la TK_{gst} est très nettement améliorée d'un facteur 4 à 5 environ à 60°C, en comparaison des résultats obtenus à 25°C. Ces résultats analytiques sont très encourageants puisque les activités mesurées à haute température sont comparables à celles obtenues en présence de leurs analogues (2R) à 25°C.

1.3.3.2. Déterminations des paramètres cinétiques apparents

Les paramètres cinétiques apparents de la TK_{gst} ont été déterminés en présence de 50 mM de Li-HPA, à 25°C, vis-à-vis d'un panel d'aldéhydes α -hydroxylés sélectionnés précédemment. Les paramètres cinétiques apparents de la TK_{gst} ont été déterminés vis-à-vis du glycolaldéhyde et d'aldéhydes α -hydroxylés (2R) : le D-glycéraldéhyde, le D-lactaldéhyde

et le D-ribose et comparés aux valeurs obtenues avec les TK_{sce} et TK_{eco} décrites dans la littérature. La mesure des K_M^{app} et V_{max}^{app} de la TK_{gst} vis-à-vis des quatre aldéhydes α -hydroxylés (2S) identifiés précédemment comme substrats accepteurs, le L-glycéraldéhyde, le L-lactaldéhyde, le D-thréose et le L-érythrose, a également été envisagée. Néanmoins, compte-tenu de l'activité très faible de la TK_{gst} vis-à-vis du D-thréose et du L-érythrose à température ambiante, les paramètres cinétiques apparents de l'enzyme vis-à-vis de ces deux aldéhydes n'ont pas pu être déterminés (Tableau 14).

	K_M^{app} [mM]	TK_{gst}		TK_{sce}	TK_{eco}
		V_{max}^{app} [U.mg ⁻¹]	V_{max}^{app}/K_M^{app} [U.mg ⁻¹ .mM ⁻¹]	K_M [mM]	K_M [mM]
Glycolaldéhyde	8±0,5	15,1±0,2	1,9	21 [122]	13 [122]
D-glycéraldéhyde (2R)	6±2	16±1	2,7	40 [122]	48 [122]
L-glycéraldéhyde (2S)	> 300	2,3±0,6	< 0,008	-	-
D-lactaldéhyde (2R)	8,4±0,7	11,4±0,5	1,4	-	-
L-lactaldéhyde (2S)	> 400	1,4±0,4	< 0,004	-	-
D-thréose (2S)	nd	nd	nd	-	-
L-érythrose (2S)	nd	nd	nd	-	-
D-ribose (2R)	302,7±41,1	1,1±0,1	0,0036	-	1400 [58]

Tableau 14 : Paramètres cinétiques apparents de la TK_{gst} vis-à-vis d'aldéhydes α -hydroxylés déterminés à l'aide du « test $TK_{ROUGE\ DE\ PHENOL}$ » en présence du Li-HPA (50 mM) à 25 °C. Les valeurs de K_M indiquées en présence de la TK_{sce} et de la TK_{eco} sont issues de la littérature. nd = non détecté.

Les valeurs des K_M^{app} de la TK_{gst} vis-à-vis du glycolaldéhyde et du D-glycéraldéhyde sont inférieures à celles indiquées dans la littérature pour les TK_{eco} et TK_{sce} [122] et illustrent une meilleure affinité de la TK_{gst} pour le D-glycéraldéhyde, contrairement aux TK_{eco} et TK_{sce} , qui acceptent préférentiellement le glycolaldéhyde. En revanche, les valeurs de V_{max}^{app} obtenues pour ces deux aldéhydes sont très proches.

Les valeurs des K_M^{app} et V_{max}^{app} , déterminées vis-à-vis du D-lactaldéhyde, montrent que l'absence d'un groupement hydroxyle en position β de la fonction aldéhydique conduit à une légère diminution de l'efficacité de la réaction catalysée par la TK_{gst} , un résultat en accord avec les résultats obtenus précédemment (Voir paragraphe 1.3.3.1., page 78). Cependant, aucune comparaison n'est possible avec les paramètres cinétiques des autres TKs microbiennes vis-à-vis de cet aldéhyde, ceux-ci n'ayant pas été décrits dans la littérature. Enfin, un K_M^{app} de 302,7 ± 41,1 mM et une V_{max}^{app} de 1,1 ± 0,1 U.mg⁻¹ ont été mesurés en présence du D-ribose. La valeur du K_M^{app} est relativement élevée, traduisant une faible

affinité de la TK_{gst} pour cet aldéhyde à plus longue chaîne carbonée (5 atomes de carbone), ce qui est cohérent avec les activités spécifiques obtenues précédemment. Néanmoins, cette valeur est inférieure à celle déterminée pour la TK_{eco}, montrant une meilleure affinité de la TK_{gst} pour ce substrat [58].

Pour les aldéhydes α -hydroxylés (2S), les paramètres cinétiques apparents de la TK_{gst} ont pu être déterminés en présence du L-glycéraldéhyde et du L-lactaldéhyde : pour le L-glycéraldéhyde, le K_M^{app} est supérieur à 300 mM et la V_{max}^{app} est de $2,3 \pm 0,6 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$; pour le L-lactaldéhyde, le K_M^{app} est supérieur à 400 mM et la V_{max}^{app} est de $1,4 \pm 0,4 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$. Les valeurs des K_M^{app} sont très élevées, illustrant une très faible affinité de la TK_{gst} pour ces deux substrats. Les valeurs des V_{max}^{app} sont similaires pour les deux aldéhydes et très basses par rapport aux valeurs obtenues avec les analogues (2R) testés. Il est à noter que ces valeurs ont été déterminées à 25°C et pourraient être améliorées à une température supérieure, notamment à 60°C. Ainsi, l'utilisation de ces aldéhydes α -hydroxylés (2S) en tant qu'accepteurs de la TK_{gst} est donc envisageable pour accéder à haute température, aux cétooses L-érythro (3S, 4S) correspondants, en présence du Li-HPA comme substrat donneur. De plus, l'augmentation de l'activité de la TK_{gst} par Evolution dirigée vis-à-vis de ces aldéhydes fait partie des objectifs de ces travaux de thèse.

1.4. Conclusions

L'objectif, qui était de produire et d'étudier la spécificité de substrat de la TK_{gst} à l'échelle analytique pour d'une part, modifier la TK_{gst} par mutagenèse afin d'augmenter son activité vis-à-vis de certains substrats et d'autre part, optimiser le procédé enzymatique catalysé par cette enzyme, a été atteint.

La TK_{gst} a été produite puis purifiée avec un rendement de 82%, conduisant à l'obtention de 160 mg d'enzyme purifiée lyophilisée, à partir d'1 L de culture contenant 3,73 g de cellules (poids humide).

Les études cinétiques réalisées en présence de divers substrats donneurs potentiels montrent que la TK_{gst} est très spécifique du Li-HPA, en présence duquel l'efficacité de la réaction est bien meilleure qu'avec la TK_{sce} et la TK_{eco} (rapport K_M^{app}/V_{max}^{app} environ 20 et 200 fois supérieur, respectivement). Parmi tous les analogues du Li-HPA testés, seul l'acide pyruvique est accepté par la TK_{gst}, avec néanmoins une activité moindre par rapport au Li-HPA. Celui-ci permettrait l'accès à un panel de cétooses en série 1-désoxy, en présence de

divers aldéhydes accepteurs. Par ailleurs, l'étude de la spécificité vis-à-vis de divers substrats accepteurs met en évidence que les activités de la TK_{gst} sont très proches de celles obtenues avec les TK_{sce} et TK_{eco}, avec une forte affinité pour les aldéhydes polyhydroxylés de configuration (2*R*) à courte chaîne. Les aldéhydes polyhydroxylés à longue chaîne ou hydrophobes sont quant à eux acceptés, mais avec des activités beaucoup plus faibles. Le fait marquant concerne les activités détectées à 25°C et augmentées d'un facteur 4 à 5 à 60°C en présence des aldéhydes α-hydroxylés (2*S*) à 3 et 4 atomes de carbone, *i.e* le L-glycéraldéhyde, le L-lactaldéhyde, le D-thréose et le L-érythrose. Ce résultat n'a jamais été publié pour d'autres sources de TKs.

Les résultats de cette étude nous ont permis de mettre en valeur les caractéristiques prometteuses de cette enzyme thermostable pour son utilisation en biocatalyse. L'objectif est maintenant d'utiliser l'Evolution dirigée pour augmenter l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis de certains substrats accepteurs tels que les aldéhydes α-hydroxylés (2*S*) mais également les aldéhydes α-hydroxylés (2*R*) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6), composés susceptibles de conduire à des cétooses rares et hautement valorisables. J'ai également participé aux travaux visant à améliorer l'activité de cette enzyme vis-à-vis des aldéhydes aliphatiques et hydrophobes mais aussi vis-à-vis de l'acide pyruvique et d'analogues comme nouveaux substrats donneurs, aspects développés à l'Université Technique de Darmstadt par le Pr. W.-D. Fessner, notre partenaire dans ce projet.

2. Modification de la spécificité de substrat de la TK_{gst} par Evolution dirigée

2.1. Objectifs

L'étude de la spécificité de substrat de la TK_{gst} sauvage nous a montré précédemment que les aldéhydes α -hydroxylés (2S) et les aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6) sont convertis par la TK_{gst}, mais conduisent à de très faibles activités à 25°C. Or, les cétooses accessibles à partir de ces aldéhydes en présence du Li-HPA font partie des sucres rares, des produits à très haute valeur ajoutée, qui présentent de nombreuses applications, notamment dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire.

Parmi les aldéhydes α -hydroxylés (2S) identifiés précédemment, le L-glycéraldéhyde, le D-thréose et le L-érythrose peuvent conduire aux cétooses L-érythro (3S, 4S) correspondants, le L-ribulose, le D-tagatose et le L-psicose. Le L-ribulose, commercial mais coûteux (160€/50mg), est un pentose utilisé comme précurseur de molécules à activité thérapeutique, tels que des L-nucléosides modifiés, utilisés comme médicaments antiviraux et antitumoraux potentiels [15], [16]. Le D-tagatose, composé commercial mais également onéreux (235€/1g), est un hexose utilisé comme édulcorant hypocalorique (TAGATESSE®) [19]. Il a également montré des propriétés contre le diabète de type II [17], [18]. Enfin, le L-psicose, commercialisé par la société CarboSynth (250€/50mg), est un hexose présentant une activité antivirale [240] et est utilisé comme précurseur du L-fructose, un inhibiteur potentiel des glucosidases [8], [20].

De plus, parmi les aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6) testés précédemment, le D-ribose (C5), le D-xylose (C5) et le D-glucose (C6) pourraient permettre l'obtention de cétooses rares de configuration D-thréo (3S, 4R) à 7 et 8 atomes de carbone correspondants : le D-sédoheptulose (C7), le D-ido-heptulose (C7) et le D-glycéro-D-ido-octulose (C8). Le D-sédoheptulose, un composé commercial mais extrêmement coûteux (952€/50mg), peut être utilisé comme marqueur de diverses pathologies liées au métabolisme des sucres chez l'Homme [21], [22]. De plus, son équivalent phosphorylé au niveau du carbone 7, le D-S7P, peut être employé comme précurseur d'antibiotiques [23] et de composés inhibiteurs d' α -glycosidases [24], de même que le D-ido-heptulose-7-phosphate, l'analogue phosphorylé en C7 du D-ido-heptulose, non commercial. Enfin, le D-glycéro-D-ido-octulose (C8), non disponible sur le marché, est un antioxydant, qui permet

d'augmenter la résistance des plantes à la chaleur et fait actuellement l'objet de nombreuses recherches [25], [26].

L'augmentation des performances de la TK_{gst} vis-à-vis de ces six aldéhydes α -hydroxylés, *i.e.* le L-glycéraldéhyde, le D-thréose, le L-érythrose, le D-ribose, le D-xylose et le D-glucose, permettrait d'accéder plus efficacement aux cétooses rares correspondants en une étape par la formation stéréosélective d'une liaison C-C. Ce procédé enzymatique pourrait ainsi concurrencer les voies d'accès existantes à ce type de composés, notamment par voie chimique, nécessitant de nombreuses étapes et l'emploi de solvants organiques toxiques ou par voie microbiologique, conduisant à l'obtention de ces cétooses avec des rendements modérés [8], [13].

De plus, j'ai également participé aux travaux visant à améliorer l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes aliphatiques et aromatiques mais également vis-à-vis de l'acide pyruvique et d'analogues utilisés comme substrats donneurs, aspects développés à l'Université Technique de Darmstadt par le groupe du Pr. W.-D. Fessner. Ces résultats seront résumés à la fin de ce chapitre.

Pour relever ces défis, le site actif de la TK_{gst} a été modifié par ingénierie enzymatique, la robustesse de cette enzyme en faisant une excellente candidate pour développer ce type d'approche. Il est important de rappeler que l'amélioration de l'activité de la TK vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2S) n'a jusqu'à présent jamais été envisagée par d'autres groupes. De plus, l'augmentation de son activité vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6), a été mentionnée dans la littérature. Des TKs mutées présentant une activité environ deux fois supérieure à l'enzyme sauvage vis-à-vis du D-ribose (C5), du L-arabinose (C6) et du D-glucose (C6) ont été décrites. Néanmoins, leur utilisation en biocatalyse, pour la synthèse efficace des produits correspondants avec l'obtention de meilleurs rendements que ceux déterminés en présence de l'enzyme sauvage, n'a pas été démontrée [106], [171] (Figure 41).

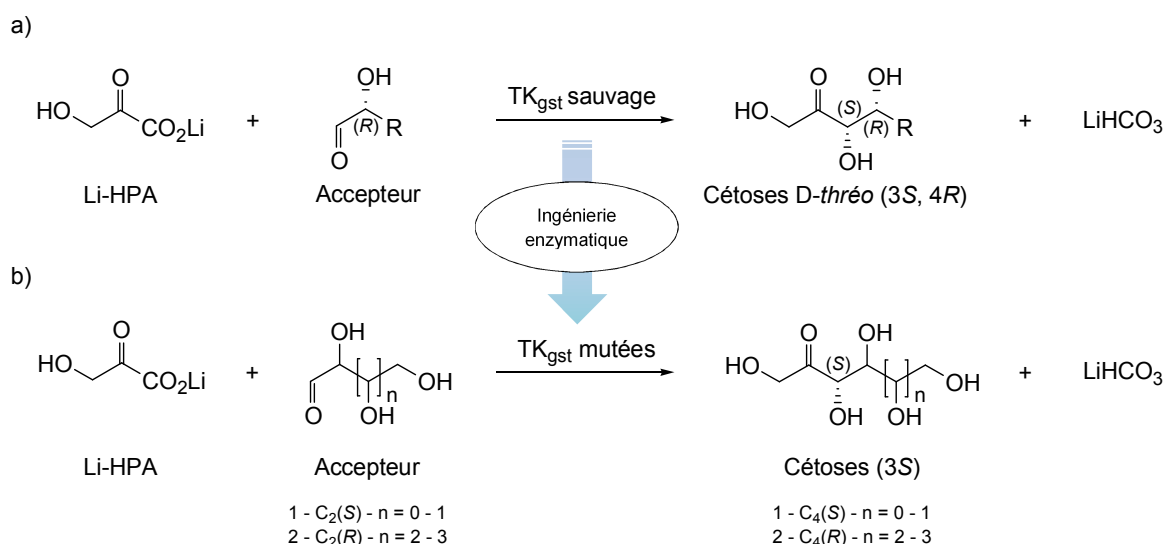


Figure 41 : Amélioration de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2S) et des aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6). a) Réactions catalysées par la TK_{gst} vis-à-vis du Li-HPA et des aldéhydes α -hydroxylés (2R) à courte chaîne. b) Réactions catalysées par les TK_{gst} mutées vis-à-vis du Li-HPA et des aldéhydes α -hydroxylés (2S) ou des aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6).

2.2. Méthodologie

Pour atteindre nos objectifs, le concept d'Evolution dirigée sera utilisé (Figure 42). Les mutations seront créées selon une approche semi-rationnelle, à partir du gène codant pour la TK_{gst} sauvage. Le choix des positions qui seront mutées sera guidé par l'analyse du site actif de l'enzyme. Puis des cycles itératifs seront réalisés. Un premier cycle permettra de générer des banques de TK_{gst} mutées sur une seule position en utilisant la mutagenèse par saturation de site (« SSM »), dont le principe est rappelé dans le paragraphe 3.2.1.2. de l'*Etude Bibliographique*. Les TK_{gst} mutées les plus performantes seront séquencées et les positions les plus bénéfiques seront combinées lors du cycle suivant. Deux, voire trois positions seront mutées simultanément par la technique « SSM ». Un nombre supérieur de position conduirait à l'obtention de banques de trop grande taille, que nous ne pourrions analyser, compte-tenu du test de criblage envisagé et de l'appareillage dont nous disposons au laboratoire.

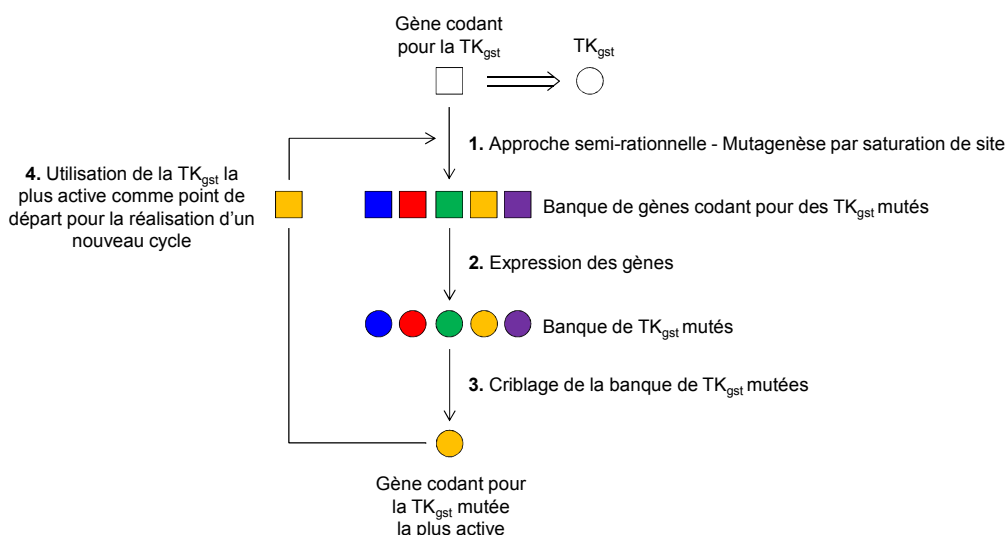


Figure 42 : Modification de la TK_{gst} par Evolution dirigée
Schéma adapté de la littérature [241]

Pour que cette approche réponde aux objectifs fixés en terme d'amélioration de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des substrats envisagés, plusieurs étapes sont nécessaires : 1) la construction *in silico* d'un modèle structural du site actif de la TK_{gst}, 2) la conception et l'obtention de banques de TK_{gst} mutées, suivies de la lyse des cellules, 3) le criblage des banques de TK_{gst} mutées (lysats cellulaires) en présence des substrats d'intérêt et 4) la purification et la caractérisation des TK_{gst} mutées les plus performantes ou « hits » (Figure 43).

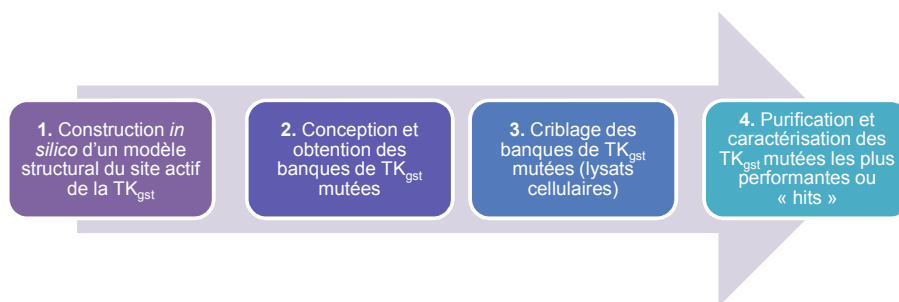


Figure 43 : Méthodologie générale pour l'identification de TK_{gst} mutées performantes ou « hits »

2.2.1. Construction d'un modèle structural de la TK_{gst} par homologie

Sans un modèle du site actif de la TK_{gst}, aucune approche rationnelle pour la conception des banques de TK_{gst} mutées ne peut être développée. La structure cristallographique de la TK_{gst}

n'étant pas connue, la construction d'un modèle structural de la TK_{gst} est cruciale. Ce verrou a été levé en amont, dans le cadre du projet ANR DeoTK, qui a donné lieu à la thèse du Dr. J. Abdoul-Zabar (2011-2013). La genèse est rappelée ci-dessous.

Un modèle structural de cette enzyme a été construit par homologie de séquence avec la TK de *B. anthracis* ou TK_{ban}. En effet, le gène *tkt2* codant pour l'isoenzyme TKT2 de *B. anthracis* présente une identité de séquence nucléotidique de 72 % avec la TK_{gst}. La structure cristallographique de la TK_{ban} (3M49.pdb) correspondante a donc été utilisée comme modèle de départ. Ces travaux ont été développés au moyen des logiciels Modeller 9V11 et Chimera 1.7 et ont été menés en collaboration avec L. Nauton et le Dr V. Théry, responsables de la plateforme modélisation moléculaire de notre institut [228], [237].

Le modèle du site actif de la TK_{gst} a été comparé aux sites actifs des TK_{eco} et TK_{sce} cristallisées. La Figure 44 montre que les résidus clés de ces trois TKs intervenant dans le mécanisme catalytique et la reconnaissance des substrats physiologiques sont identiques et leurs positions presque superposables. Cette observation confirme la forte homologie de structure au sein de la famille des TKs, déjà décrite dans la littérature (Figure 44).

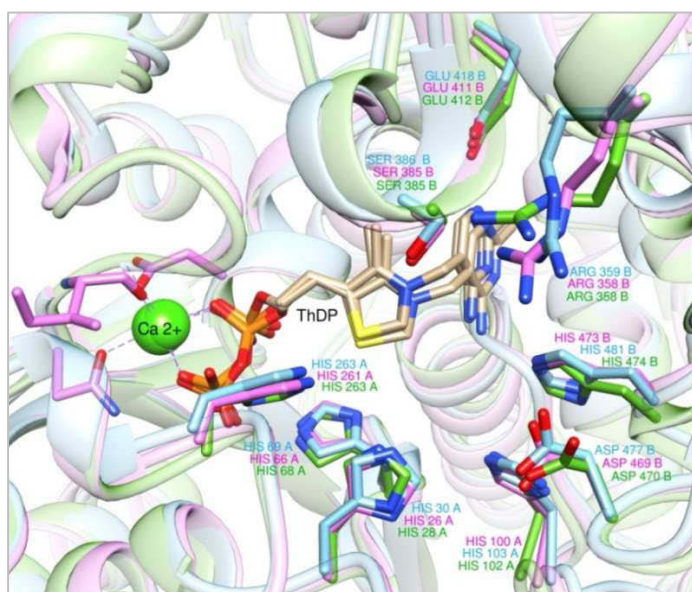


Figure 44 : Superposition des sites actifs de la TK_{sce} (1GQD.pdb, bleu), de la TK_{eco} (1TRK.pdb, rose) et de la TK_{gst} (vert). Notation : exemples : HIS 263 A : résidu His appartenant à la sous-unité A ; ASP 477 B : résidu Asp appartenant à la sous-unité B.

Pour la suite de l'étude, seuls les résidus les plus proches du substrat accepteur seront considérés. Les positions qui seront mutées seront choisies en fonction du type de substrat

pour lequel une amélioration de l'activité de la TK_{gst} est souhaitée. Ces choix seront discutés dans la suite du manuscrit.

2.2.2. Obtention des banques de TK_{gst} mutées

Cette étape a été développée par le Dr. R. Dumoulin, dans le cadre de son stage post-doctoral financé par le projet ANR ThermoTK, dans lequel ces travaux de thèse s'intègrent. Celle-ci est détaillée dans la *Partie Expérimentale* de ce manuscrit.

La méthode « QuikChange® » a été utilisée pour la construction de toutes les banques de TK_{gst} mutées présentées et son principe est décrit dans le paragraphe 3.2.1.1. de l'*Etude Bibliographique*. Deux protocoles ont été appliqués en fonction du nombre de positions à muter. Dans le cas où une seule position est ciblée, des codons dégénérés NNS sont utilisés, où N est égal à 25 % de chaque base A, T, G et C, équivalent à des codons dégénérés NNK, en terme de nombre de codons générés et d'acides aminés représentés. En revanche, des codons dégénérés NDT nous ont semblé plus appropriés quand deux, voire trois positions sont envisagées simultanément. D représente 33% des bases A, G et T. L'emploi de ce type de codon conduit ainsi à seulement 12 codons correspondants à 12 acides aminés, représentatifs des différents groupes (polaires, apolaires, aromatiques et chargés). Cette technique ne permet pas de couvrir toutes les mutations sur chaque position, mais permet d'obtenir une représentation de chaque famille d'acides aminés, conduisant à des banques de plus petite taille, réduisant ainsi le nombre d'enzymes mutées à cribler (Tableau 15).

Nombre d'aa mutés	Codon de type NNK		Codon de type NDT	
	Codons	Enzymes mutées	Codons	Enzymes mutées
1	32	94	12	34
2	1028	3 066	144	430
3	32 768	98 163	1 728	5 175
4	1 048 576	3 141 251	20 726	62 118
5	33 555 432	100 520 093	248 832	745 433
6	> 1,0 x 10 ⁹	> 3,2 x 10 ⁹	> 2,9 x 10 ⁶	> 8,9 x 10 ⁶

Tableau 15 : Taille des banques d'enzymes mutées générées selon le type de codons dégénérés employé pour obtenir un taux de représentation des mutations possibles ≥ 95 %.
Tableau traduit et adapté de la littérature [146].

2.2.3. Criblage des banques de TK_{gst} mutées

J'ai réalisé l'ensemble des étapes du criblage des banques de TK_{gst} mutées présentées dans ce manuscrit.

2.2.3.1. Obtention des lysats cellulaires

A la suite de la culture des souches exprimant chaque TK_{gst} mutée, réalisée en microplaques 96-puits, les cellules sont lysées, suite à l'introduction, dans chaque puits, d'une solution de BugBuster®, à laquelle du lysozyme et de l'endonucléase benzonase sont ajoutés [242]. Cette solution permet de s'affranchir de l'utilisation des ultrasons pour la lyse des cellules, étape matériellement limitante pour un grand nombre de clones à lyser. De plus, ce protocole permet d'obtenir les extraits enzymatiques dans du tampon TEA 2 mM, pH 7,15 (tampon dans lequel l'étape de criblage est réalisée), tout en évitant la dénaturation des protéines pendant toute la durée du criblage (Figure 45)

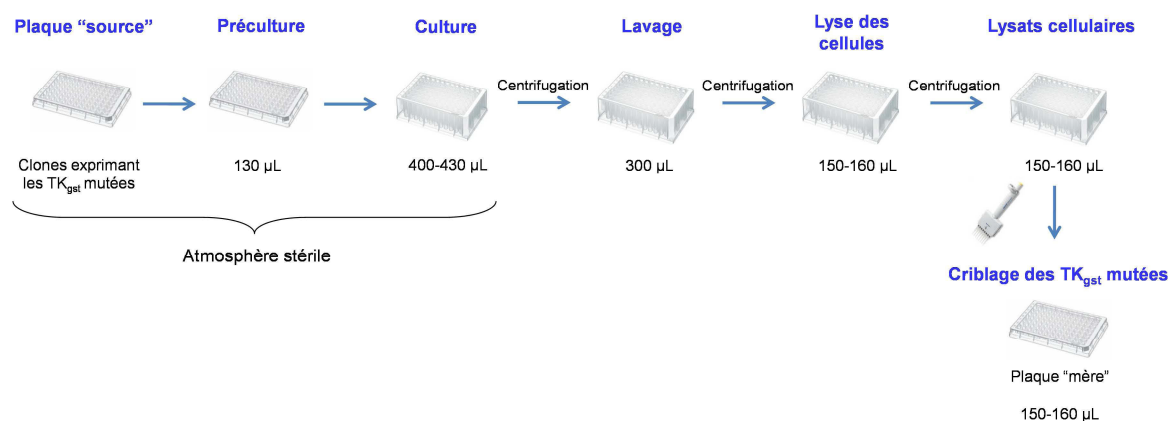


Figure 45 : Protocole de préculture, de culture et de lyse des clones exprimant les TK_{gst} mutées

La concentration moyenne en protéines des lysats cellulaires contenant la TK_{gst} sauvage est de $0,6 \pm 0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$, concentration plus élevée par rapport à celle des lysats cellulaires contenant les TK_{gst} mutées, qui est de $0,4 \pm 0,08 \text{ mg.mL}^{-1}$. Les cellules hôtes utilisées sont pourtant les mêmes dans les deux cas. Nous n'avons pas identifié la cause de cette différence de croissance. De plus, les valeurs moyennes et les écarts types indiqués montrent la variabilité de la teneur en protéines, due à une croissance bactérienne qui n'est pas homogène d'un puit à l'autre. Ces variations vont influencer les absorbances mesurées, qui pourront être plus ou moins élevées pour un même substrat et une même enzyme, conduisant par conséquent à des écart-types plus ou moins importants.

2.2.3.2. Principe du test de criblage

Le test de criblage est crucial dans une approche semi-rationnelle. Il doit être spécifique, automatisable, facile à mettre en œuvre et quantitatif. Dans notre cas, ce test doit être applicable à tout type d'aldéhydes hydroxylés ou non. Ce verrou a été levé en amont dans le cadre du projet ANR DeoTK, qui a donné lieu à la thèse du Dr. J. Abdoul-Zabar (2011-2013). Le principe du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} », qui a été développé en collaboration avec l'équipe du Pr. W.-D. Fessner, est détaillé le paragraphe 3.3.2. de l'*Etude Bibliographique* (Figure 46).

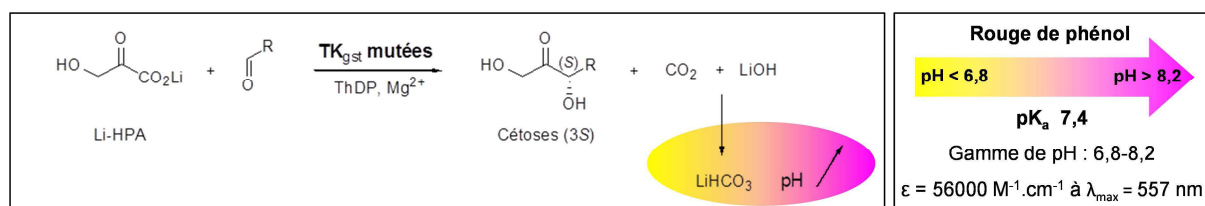


Figure 46 : Principe du test d'activité pH-métrique de la TK : le « test TK_{ROUGE DE PHENOL} »

Au cours de la réaction, la décarboxylation du Li-HPA catalysée par la TK conduit à une augmentation du pH du milieu. Cette variation de pH est suivie par spectrophotométrie en présence d'un indicateur coloré, le rouge de phénol, en milieu faiblement tamponné [122]. Ce test est actuellement le seul qui permette le criblage de banques de TKs mutées en présence des substrats d'intérêt (utilisés par la suite en biocatalyse) et de façon directe (sans traitement préalable du milieu réactionnel). Il présente l'avantage de ne dépendre que du substrat donneur (divers donneurs susceptibles d'être décarboxylés par la TK peuvent être utilisés) et d'être indépendant de la structure de l'aldéhyde.

2.2.3.3. Conditions utilisées pour le criblage des banques de TK_{gst} mutées

Le criblage des banques de TK_{gst} mutées a été réalisé en microplaques 96-puits, sur une plateforme robotisée, grâce à un automate de pipetage (TECAN®), à partir des lysats cellulaires et des solutions mères contenant les réactifs du test, fraîchement préparés le jour du criblage (Figure 47).

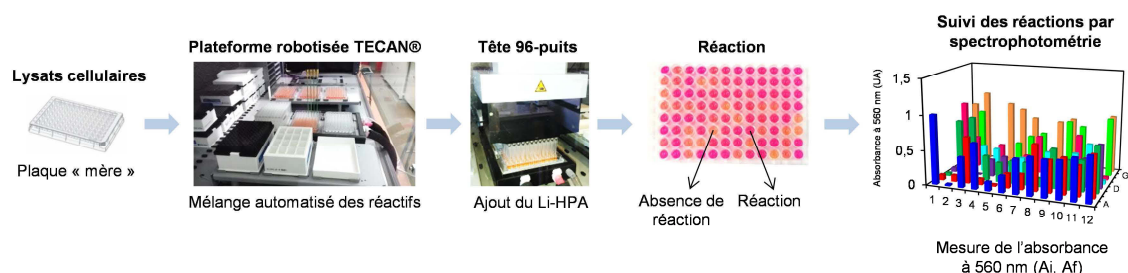


Figure 47 : Protocole de criblage des banques de TK_{gst} mutées sur la plateforme robotisée TECAN®

Les conditions utilisées pour le criblage de toutes les banques de TK_{gst} mutées présentées dans ce manuscrit sont décrites ci-dessous (Tableau 16). Ces conditions résultent d'études d'optimisation du test réalisées antérieurement à ces travaux, en présence de lysats cellulaires contenant des TK_{gst} mutées, obtenues suivant un protocole identique à celui présenté ici [175], [237].

TK _{gst} sauvage ou mutée	40 µL (lysate cellulaire)
ThDP	0,1 mM
MgCl ₂	1 mM
Aldéhydes	20-200 mM
Li-HPA	10 mM
Rouge de phénol	84 µM
Tampon TEA	2 mM
pH initial	7,15*
Volume final dans le puit	200 µL

Tableau 16 : Conditions du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} » utilisé comme test de criblage haut-débit des banques de TK_{gst} mutée (lysate cellulaire). * pH situé au début de la zone de virage du rouge de phénol et permettant une visualisation aisée des TK_{gst} mutées performantes ou « hits »

Des valeurs d'absorbances sont relevées à 560 nm à la suite de l'initiation de la réaction par l'ajout du Li-HPA (absorbance initiale, Ai) puis après 30 minutes d'incubation à 25°C (absorbance finale, Af). Les différences d'absorbances résultantes, notée ΔA_{560} , ont été calculées à l'aide de l'équation suivante :

$$\Delta A_{560} = Af - Ai \quad (1)$$

Références et contrôles utilisés dans chaque microplaque 96-puits

- Afin de comparer les variations d'absorbances de chaque TK_{gst} mutée à celles de la TK_{gst} sauvage, chaque microplaque comporte un puits de référence, qui contient le lysat issu de cellules exprimant la TK_{gst} sauvage, l'aldéhyde d'intérêt et le Li-HPA. Cette référence est utilisée pour le calcul des absorbances relatives A_{rel} de chaque TK_{gst} mutée.
- Pour s'assurer que les variations d'absorbances observées sont bien spécifiques de la réaction catalysée par la TK, un deuxième puits contient le lysat de la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS transformée par le plasmide pGEN452 vide, l'aldéhyde d'intérêt et le Li-HPA. Ce témoin constitue ainsi un premier « contrôle négatif ».
- Un troisième puits de la plaque n'est pas inoculé et contient ainsi uniquement du milieu LB-kanamycine. L'objectif est de s'assurer qu'aucune contamination bactérienne n'a lieu durant les étapes de pré-culture et de culture des clones, même en la présence d'un antibiotique. Ce témoin représente un second « contrôle négatif ».
- Par ailleurs, un substrat accepteur en présence duquel la TK_{gst} est très active, le glycolaldéhyde ou le D-glycéraldéhyde, a été inclus dans le panel des aldéhydes testés, dans le but de s'assurer que la surexpression des enzymes, la lyse des cellules et la réalisation du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} » sont satisfaisantes.
- Enfin, un autre témoin contenant tous les réactifs du test sauf le substrat accepteur, permet de s'assurer qu'aucune variation de pH non spécifique de la réaction catalysée par l'enzyme n'ait lieu, due à une réaction parasite entre la TK_{gst} mutée et le Li-HPA.

Pour l'ensemble des banques de TK_{gst} mutées décrites dans ce manuscrit, aucun changement de couleur de l'indicateur coloré n'a eu lieu en l'absence d'aldéhyde accepteur ou en présence du plasmide pGEN452 vide. Toutefois, une croissance bactérienne a parfois été observée dans le puits non inoculé. Dans ces quelques cas, une nouvelle culture a systématiquement été réalisée.

Normalisation des résultats à l'issue du criblage

Afin de tenir compte des variations d'absorbances d'un puits à l'autre, induites par les différentes étapes du protocole (pré-culture, culture, lyse et test de criblage), les absorbances relatives A_{rel} ont été calculées en utilisant la formule suivante :

$$A_{rel} = \frac{\Delta A_{560} (TK_{gst} \text{ mutée})}{\Delta A_{560} \text{ moyenne } (TK_{gst} \text{ sauvage})} \quad (2)$$

Pour chaque puits contenant une TK_{gst} mutée et un substrat accepteur donné, les différences d'absorbances ΔA_{560} ont été normalisées par rapport à la moyenne des ΔA_{560} obtenues dans les lysats contenant la TK_{gst} sauvage de chaque plaque. L' A_{rel} vaut donc 1 pour l'enzyme sauvage.

Sélection, séquençage et caractérisation des hits

A l'issue du criblage de chaque banque de TK_{gst} mutées, les données sont analysées. Les lysats cellulaires contenant les TK_{gst} mutées pour lesquelles les A_{rel} mesurées en utilisant le « test TK_{ROUGE DE PHENOL} » sont supérieures à la moyenne des lysats contenant la TK_{gst} sauvage sont sélectionnés. Des seuils de sélection variables sont fixés selon les banques et les aldéhydes accepteurs employés. Les séquences de ces « hits » sont ensuite examinées. Par la suite, les meilleures candidates sont produites en plus grande quantité, afin de pouvoir les purifier par chromatographie IMAC. Les activités spécifiques des enzymes mutées purifiées ainsi que leurs paramètres cinétiques apparents sont alors déterminés en présence des substrats d'intérêt.

Dans les parties suivantes, la construction des banques de TK_{gst} mutées puis l'identification de « hits » correspondant aux différents objectifs fixés (amélioration de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis d'aldéhydes α -hydroxylés (2S), d'aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6), d'aldéhydes hydrophobes ou encore vis-à-vis de l'acide pyruvique et d'analogues utilisés comme substrats donneurs) vont être présentées et les résultats discutés.

2.3. Augmentation de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2S)

Comme nous l'avons vu précédemment, la TK_{gst} présente une énantiopréférence très nette vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2R), une propriété commune aux autres TKs microbiennes décrites dans la littérature [37], [105], [111]. Néanmoins, au contraire des autres TKs microbiennes connues, cette enzyme est également capable de convertir les aldéhydes α -hydroxylés (2S) à 3 et 4 atomes de carbone, avec toutefois une faible activité spécifique à 25°C. Cette activité est améliorée d'un facteur 4 à 5 environ à 60°C (comme indiqué précédemment dans le paragraphe 1.3.3.1., page 78), mais elle reste tout de même peu élevée, notamment vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2S) à 4 atomes de carbone. Ainsi, dans l'optique de synthétiser efficacement des cétooses L-érythro (3S, 4S) d'intérêt biologique, notre objectif est d'améliorer l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes α -

hydroxylés (2S) par Evolution dirigée, en utilisant la mutagenèse par saturation de site. Cet aspect a été initié en présence du L-glycéraldéhyde (C3), utilisé comme substrat (2S) « modèle » (Paragraphe 2.3.1.) [228]. Puis notre objectif a été d'améliorer ces premiers résultats obtenus avec le L-glycéraldéhyde et d'élargir le spectre d'activité de la TK_{gst} à deux autres aldéhydes α-hydroxylés (2S) à 4 atomes de carbone : le D-thréose et le L-érythrose (Paragraphe 2.3.2.).

2.3.1. Première approche

Lors d'un premier cycle de mutagenèse, deux résidus clés du site actif de la TK_{gst} ont tout d'abord été ciblés et deux banques de TK_{gst} mutées individuellement sur chaque position ont été générées et criblées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde, utilisé comme substrat (2S) « modèle ». Un second cycle de mutagenèse a été réalisé afin de muter simultanément les deux positions précédentes. La banque obtenue a été criblée vis-à-vis de ce même aldéhyde (2S). Les TK_{gst} mutées les plus actives vis-à-vis du L-glycéraldéhyde issues de cette banque ont été produites à plus grande échelle, purifiées et caractérisées. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Advanced Synthesis and Catalysis* en 2015, donnée en annexe de ce manuscrit [237].

2.3.1.1. Choix des positions clés au niveau du site actif par modélisation moléculaire

L'étude *in silico* du modèle du site actif de la TK_{gst} en présence du D-E4P (aldéhyde accepteur naturel), du D-glycéraldéhyde et du L-glycéraldéhyde comme substrats accepteurs et l'analyse des résultats décrits dans la littérature, concernant l'étude du site actif des TK_{sce} et TK_{eco} et leur modification par ingénierie, ont permis de cibler deux acides aminés clés, qui pourraient conduire, une fois mutés, à l'amélioration de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes α-hydroxylés (2S) (Figure 48).

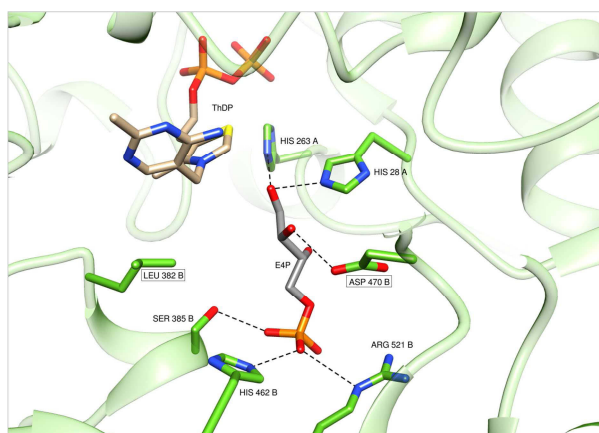


Figure 48 : Modèle du site actif de la TK_{gst} en présence du D-E4P

Notation : exemples : HIS 263 A : résidu His appartenant à la sous-unité A ; ASP 470 B : résidu Asp appartenant à la sous-unité B.

D'après les résultats décrits dans la littérature et l'analyse des sites actifs des TK_{eco} et TK_{sce}, le résidu Asp en position 469 chez la TK_{eco} et 477 chez la TK_{sce} joue un rôle crucial pour la reconnaissance du substrat accepteur. En effet, il a été montré par le Pr. G. Schneider en collaboration avec le Pr. L. Hecquet, que l'interaction par liaison hydrogène entre le résidu Asp en position 477 chez la TK_{sce} et le groupement hydroxyle en position α de l'aldéhyde, était responsable de l'énantiosélectivité de la TK vis-à-vis des aldéhydes accepteurs de configuration (2R) (Figure 48) [89].

La TK_{gst} présente un résidu équivalent en position 470. Ce résidu jouant un rôle stratégique dans le contrôle de l'énantiosélectivité pour la TK_{sce} mais également dans la reconnaissance de substrats accepteurs non α -hydroxylés pour la TK_{eco}, comme indiqué dans l'*Etude Bibliographique*, il a été ciblé en vue de sa modification.

D'autre part, l'analyse *in silico* du modèle du site actif de la TK_{gst} montre qu'un résidu Leu en position 382 est situé exactement à l'opposé de ce résidu D470 par rapport au C2 du substrat aldéhydique (Figure 48 avec le D-E4P, Figure 49 a) avec le D-glycéraldéhyde). Bien que cet acide aminé ne paraisse pas avoir de rôle dans la reconnaissance de l'aldéhyde α -hydroxylé (2R), sa modification pourrait avoir un effet complémentaire à celle du résidu D470 pour l'amélioration de l'activité de l'enzyme vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2S). La proximité du groupement hydroxyle du C2 de configuration (S) du L-glycéraldéhyde (Figure 49 b)) et du résidu L382 laisse envisager une interaction avec un résidu chargé ou polaire à la place de la leucine.

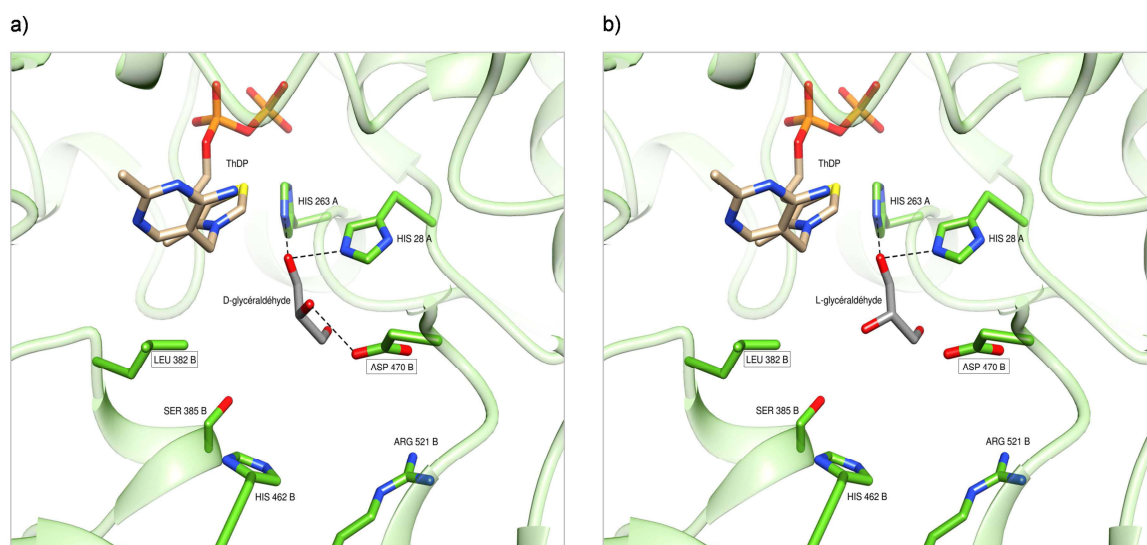


Figure 49 : Modèle du site actif de la TK_{gst} en présence du glycéraldéhyde comme substrat accepteur. a) le D-glycéraldéhyde. b) le L-glycéraldéhyde. Notation : exemples : HIS 263 A : résidu His appartenant à la sous-unité A ; ASP 470 B : résidu Asp appartenant à la sous-unité B.

D'après ces considérations, basées sur l'observation de la structure du modèle du site actif de la TK_{gst}, les résidus D470 et L382 ont été mutés.

2.3.1.2. Obtention et criblage des banques L382X, D470X et L382X/D470X

Lors d'un premier cycle de mutagenèse, des banques de TK_{gst} mutées sur chacune de ces deux positions individuellement ont été conçues à partir du gène codant pour la TK_{gst} sauvage, chaque banque étant composée de 192 clones, soit 2 microplaques 96-puits (utilisation de codons dégénérés NNS), c'est-à-dire environ deux fois plus que la valeur théorique de 94 clones nécessaires pour la représentation d'au moins 95 % des mutations possibles [146] (Tableau 17).

Dénomination de la banque	Type de codon dégénéré	Position(s) mutée(s)	Nombre de clones
L382X	NNS	L382	192 (2 plaques 96-puits)
D470X	NNS	D470	192 (2 plaques 96-puits)
L382X/D470X	NNS	L382/D470	3456 (36 plaques 96-puits)

Tableau 17 : Caractéristiques des banques de TK_{gst} mutées L382X, D470X et L382X/D470X

Les lysats cellulaires ont ensuite été criblés vis-à-vis du L-glycéraldéhyde. Ces deux banques seront notées respectivement L382X et D470X dans la suite du manuscrit. Une analyse globale indique que 32% et 12% des TK_{gst} mutées issues respectivement des banques L382X et D470X ont une A_{rel} supérieure ou égale à la TK_{gst} sauvage.

Dans l'optique d'obtenir un effet de coopération, ces deux positions ont ensuite été mutées simultanément lors d'un second cycle de mutagenèse. Une nouvelle banque de TK_{gst} mutées a été conçue et construite. 3456 clones, soit 36 microplaques 96-puits (utilisation de codons dégénérés NNS) ont été sélectionnés, au lieu des 3066 préconisés [146]. Cette banque sera référencée sous le nom L382X/D470X par la suite (Tableau 17).

Remarque : La qualité des banques L382X, D470X et L382X/D470X a été évaluée antérieurement à ces travaux de thèse [228], [237].

La banque L382X/D470X a ensuite été criblée vis-à-vis du L-glycéraldéhyde. Les résultats sont indiqués dans la Figure 50.

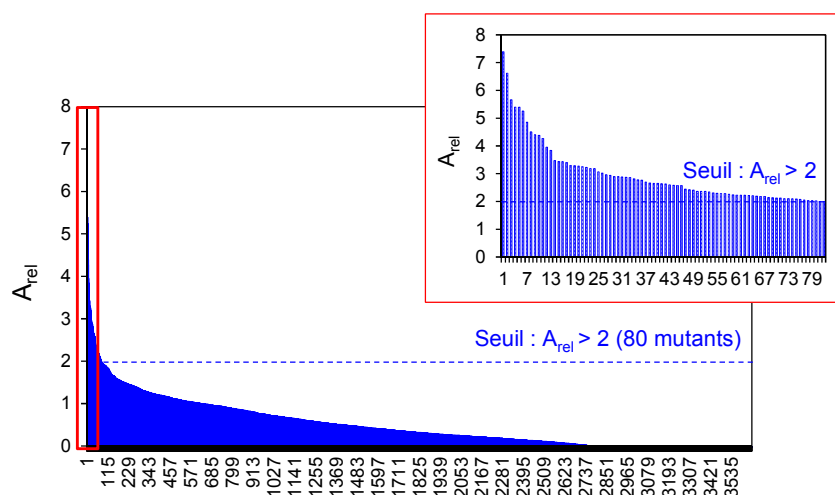


Figure 50 : Absorbances relatives A_{rel} des TK_{gst} mutées issues de la banque L382X/D470X vis-à-vis du L-glycéraldéhyde à 25°C. Dans l'encadré rouge : lysats présentant une A_{rel} supérieure à 2. Pour la TK_{gst} sauvage, l' A_{rel} vaut 1.

Environ 80% des TK_{gst} mutées ont subi une perte d'activité notable par rapport à la TK_{gst} sauvage. Un profil similaire sera observé pour toutes les banques générées dans le cadre de ces travaux. En effet, les études décrites dans la littérature montrent que les banques obtenues selon des approches rationnelles conduisent à un faible pourcentage d'enzymes mutées plus actives que l'enzyme sauvage [243].

Les TK_{gst} mutées au moins deux fois plus actives ($A_{rel} > 2$) que la TK_{gst} sauvage ont été sélectionnées (80 mutants), puis de nouveau cultivées et criblées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde. Parmi elles, quatre mutants ont été sélectionnés et séquencés pour leurs activités plus élevées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde par rapport à la TK_{gst} sauvage (résultats estimés à partir des lysats cellulaires). Il s'agit des mutants L382D/D470S, L382D/D470T, L382G/D470S et L382N/D470S. Pour ces quatre mutants sélectionnés, un résidu polaire Ser ou Thr remplace l'Asp en position 470. De plus, sur trois d'entre eux, le résidu hydrophobe Leu est remplacé par un résidu polaire ou chargé (Asn ou Asp). Nos hypothèses de départ semblent vérifiées dans le sens où un résidu chargé ou polaire à la place de la leucine en position 382 permettrait d'interagir avec le groupement hydroxyle du C2 de configuration (S) de l'aldéhyde. Ces interprétations seront étudiées par modélisation moléculaire à la fin de ce paragraphe.

Les clones correspondants ont été cultivés à plus grande échelle, de manière à purifier ces quatre TK_{gst} mutées. Leurs activités spécifiques ont ensuite été déterminées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde, mais également vis-à-vis de son analogue non hydroxylé en position 3, le L-

lactaldéhyde. Enfin, les énantiomères D correspondants, le D-glycéraldéhyde et le D-lactaldéhyde ont également été testés, en vue d'étudier l'énantiopréférence des TK_{gst} mutées. Le D- et le L-lactaldéhyde ont été synthétisés par voie chimique en une étape, selon un protocole décrit dans la littérature [244] et décrit dans la *Partie Expérimentale*.

2.3.1.3. Etude des TK_{gst} mutées purifiées les plus performantes : L382D/D470S, L382D/D470T, L382G/D470S et L382N/D470S

Les travaux présentés dans ce paragraphe ont fait partie du stage de Master 1 de J. Ariztia que j'ai encadré. Durant ce stage, il a participé à l'étude et à la caractérisation de ces TK_{gst} mutées. Le Dr. S. Thangavelu, ancien post-doctorant dans l'équipe du Pr. W.-D. Fessner, a également participé à cette étude, durant une mission scientifique réalisée au sein de l'Equipe BioMéta de l'ICCF, dans le cadre d'échanges entre les deux laboratoires partenaires.

Purification par IMAC

Après culture des souches d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS exprimant les TK_{gst} mutées L382D/D470S, L382D/D470T, L382G/D470S et L382N/D470S puis lyse des cellules, leur purification a été réalisée par chromatographie d'affinité en présence de cations métalliques (IMAC), selon le même principe que pour la purification de la TK_{gst}, présenté dans le paragraphe 1.2.2., page 72 de ce manuscrit, à température ambiante. Les masses de TK_{gst} mutées lyophilisées, obtenues à partir de 600 mL de culture contenant 2 g de cellules humides en moyenne, sont récapitulées ci-dessous (Tableau 18). Les concentrations en protéines (mg.mL⁻¹) ont été déterminées par le test de Bradford [230].

TK	Volume de culture [mL]	Masse de cellules [g]	Protéines purifiées [mg]
TK _{gst} sauvage	1000	3,73	160
L382D/D470S	600	1,99	132
L382D/D470T	600	2,35	116
L382G/D470S	600	1,96	115
L382N/D470S	600	1,86	133

Tableau 18 : Bilan de la purification par IMAC des TK_{gst} mutées L382D/D470S, L382D/D470T, L382G/D470S et L382N/D470S

Cette étape de purification a permis l'obtention d'environ 120 mg de chaque TK_{gst} mutée purifiée à partir de 600 mL de culture. De même que dans le cas de la TK_{gst} sauvage, ces mutants peuvent être lyophilisés et conservés à -18°C sans perte d'activité durant plusieurs mois.

La surexpression des TK_{gst} mutées et la pureté des extraits purifiés ont été vérifiées par électrophorèse « SDS-PAGE » en présence de 15% d'acrylamide [229]. Pour chaque TK_{gst} mutée, l'électrophorégramme présente une bande unique à environ 74 kDa, correspondant au poids moléculaire d'un monomère de la TK. La TK_{gst} sauvage a également été ajoutée, à titre de comparaison (Figure 51).

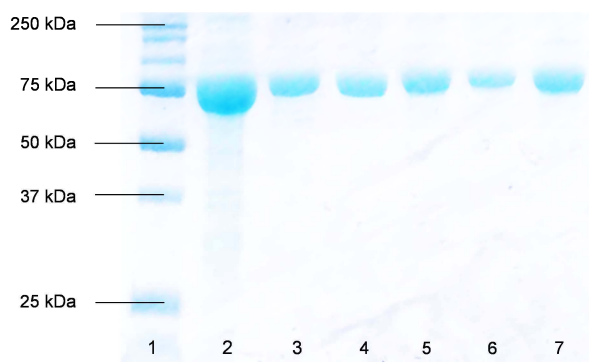


Figure 51 : Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE - Acrylamide : 15%) de la TK_{gst} et des TK_{gst} mutées L382D/D470S, L382D/D470T, L382G/D470S et L382N/D470S. 1 : All Blue Prestained Protein Standards, Bio-Rad ; 2 : TK_{gst} sauvage (lysate cellulaire, 40 µg) ; 3 : TK_{gst} sauvage (enzyme purifiée, 5 µg) ; 4 : L382G/D470S (enzyme purifiée, 5 µg) ; 5 : L382D/D470S (enzyme purifiée, 5 µg) ; 6 : L382N/D470S (enzyme purifiée, 5 µg) ; 7 : L382D/D470T (enzyme purifiée, 5 µg).

Activités spécifiques vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du L-lactaldéhyde

Les activités spécifiques des TK_{gst} mutées L382D/D470S, L382D/D470T, L382G/D470S et L382N/D470S ont été déterminées à l'aide du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} », vis-à-vis de l'aldéhyde α-hydroxylé (2S) « modèle », le L-glycéraldéhyde mais également vis-à-vis du L-lactaldéhyde. Les énantiomères D correspondants, le D-glycéraldéhyde et le D-lactaldéhyde, ont également été testés comme substrats accepteurs, afin d'examiner l'énantiopréférence de ces mutants (Figure 52).

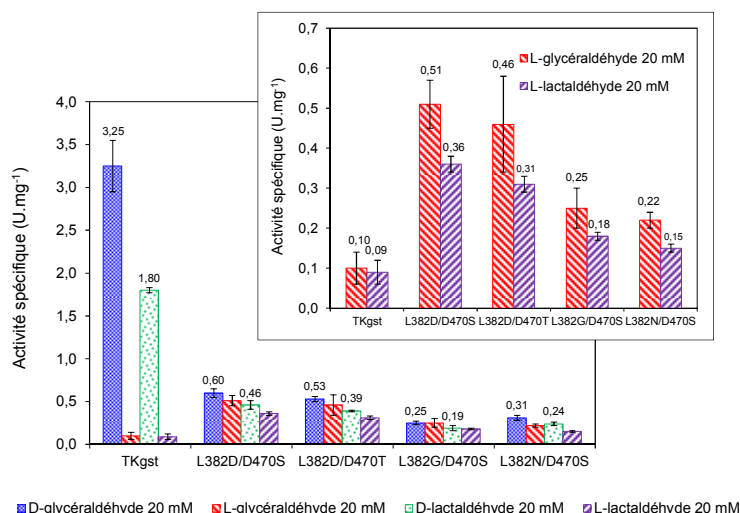


Figure 52 : Activités spécifiques de la TK_{gst} sauvage et des TK_{gst} mutées L382D/D470S, L382D/D470T, L382G/D470S et L382N/D470S déterminées à l'aide du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} » vis-à-vis du Li-HPA (50 mM), du D- et L-glycéraldéhyde (20 mM) et du D- et L-lactaldéhyde (20 mM) à 25°C. La figure encadrée est un agrandissement des activités obtenues en présence du L-glycéraldéhyde et du L-lactaldéhyde.

Un gain d'activité par rapport à l'enzyme sauvage est observé pour chacun des mutants vis-à-vis des deux aldéhydes α -hydroxylés (2S) testés. En effet, l'activité des TK_{gst} mutées L382D/D470S, L382D/D470T, L382G/D470S et L382N/D470S est respectivement, 5 fois, 4,6 fois, 2,5 fois et 2,2 fois plus élevée vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et respectivement, 4 fois, 3,4 fois, 2 fois et 1,7 fois supérieure, vis-à-vis du L-lactaldéhyde. Par ailleurs, ces mutants présentent une activité significativement inférieure à celle de la TK_{gst} sauvage vis-à-vis des deux aldéhydes α -hydroxylés (2R) testés. Leur activité est en effet 5 à 10 fois plus faible vis-à-vis du D-glycéraldéhyde et 4 à 9 fois plus faible vis-à-vis du D-lactaldéhyde. En conséquence, ces quatre mutants présentent une activité similaire vis-à-vis des deux énantiomères du glycéraldéhyde et du lactaldéhyde. Ils ont donc perdu leur énantiopréférence vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2R).

De plus, en présence de la TK_{gst} sauvage ou des quatre TK_{gst} mutées, le D- et le L-lactaldéhyde conduisent à des activités globalement plus faibles par rapport à celles obtenues avec leurs analogues hydroxylés en position 3. Ces résultats corroborent ceux de la littérature, montrant que des substrats polyhydroxylés conduisent toujours à des activités plus élevée de la TK.

Il apparaît que la TK_{gst} mutée L382D/D470S présente l'activité la plus élevée vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du L-lactaldéhyde par rapport à la TK_{gst} sauvage, respectivement 0,51

$U \cdot mg^{-1}$ et $0,36 U \cdot mg^{-1}$. Il semble donc qu'un résidu Asp à la place de la leucine en position 382 vienne renforcer l'effet bénéfique d'un résidu polaire Ser ou Thr (résidu polaire présent chez les quatre mutants) en position 470.

Interprétation des résultats obtenus par analyse du modèle du site actif de la TK_{gst} mutée L382D/D470S en présence du L-glycéraldéhyde

Dans le but d'interpréter l'activité accrue du mutant L382D/D470S vis-à-vis du L-glycéraldéhyde par rapport à la TK_{gst} sauvage, nous nous sommes intéressés aux interactions entre ce substrat et les résidus du modèle du site actif de la TK_{gst} mutée. Pour cela, un modèle de la TK_{gst} mutée L382D/D470S a été construit à partir du modèle précédemment obtenu pour la TK_{gst} sauvage (Voir paragraphe 2.2.1., page 89). Dans ce modèle, le cofacteur est représenté sous sa forme DHE-ThDP (dihydroxyéthyle-ThDP), dans laquelle le C2 du cycle thiazolium est lié de façon covalente au groupe carbonyle du groupement « céto » du substrat donneur.

Ensuite, le L-glycéraldéhyde a été ajouté à la structure et placé de manière à ce que sa position soit favorable à la réaction de transfert du groupement « céto » sur le carbone électrophile de l'aldéhyde (C1) du substrat, c'est-à-dire dans une position telle que l'oxygène de la fonction aldéhydique soit stabilisé par les résidus H263 et H28. La nouvelle structure a ensuite été traitée à l'aide du logiciel Sybyl 2.1, afin de réaliser une minimisation d'énergie. Les résultats montrent que les deux mutations L382D et D470S apportées à la TK_{gst} n'entraîneraient pas de modification de la structure tertiaire du site actif (Figure 53).

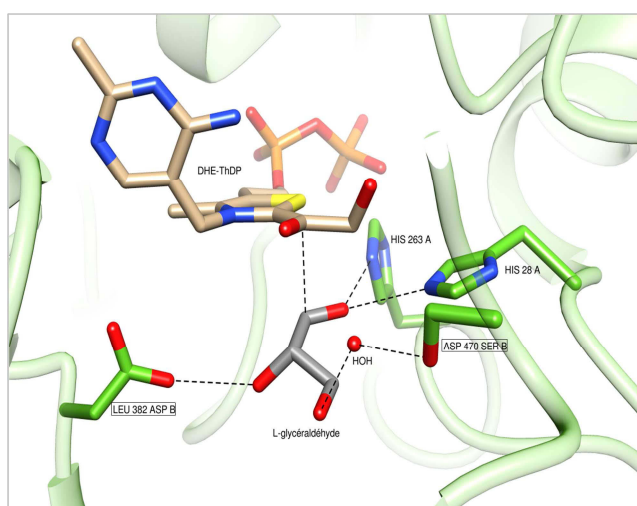


Figure 53 : Modèle du site actif de la TK_{gst} mutée L382D/D470S en présence du L-glycéraldéhyde. Notation : exemples : HIS 263 A : résidu His appartenant à la sous-unité A ; ASP 470 SER B : résidu Asp appartenant à la sous-unité B substitué par un résidu Ser.

Dans la structure de la TK_{gst} sauvage, la présence du résidu hydrophobe L382 aurait pour rôle de « repousser » les substrats porteurs de fonctions hydroxyles (hydrophiles) vers la partie du site actif occupée par le résidu D470. Comme nous l'avons vu précédemment, seuls les aldéhydes α -hydroxylés de configuration (2*R*) peuvent alors établir une interaction directe avec cet acide aminé et ainsi être positionnés de façon favorable à la réaction de transfert du groupement « cétole » sur la face *ré* de la fonction aldéhyde. Ceci explique l'énantiosélectivité des TKs de type sauvage en faveur des aldéhydes α -hydroxylés de configuration de (2*R*).

Dans le cas de la TK_{gst} mutée L382D/D470S, une interaction directe serait possible entre la fonction hydroxyle portée par le C2 de configuration (S) du L-glycéraldéhyde et l'Asp en position 382, tout en autorisant une position favorable de cet aldéhyde pour la réaction de transfert du « cétole ». De plus, la fonction hydroxyle portée par le C3 du substrat serait stabilisée grâce à une interaction possible avec le résidu Ser en position 470 *via* une molécule d'eau cristallographique.

Ainsi, ces considérations permettraient de formuler des hypothèses quant à l'activité plus élevée du mutant L382D/D470S vis-à-vis du L-glycéraldéhyde, que celle obtenue avec l'enzyme sauvage.

Remarque : des interprétations similaires peuvent être formulées avec un résidu thréonine en position 470 à la place de la sérine. En effet, ces deux résidus portent une fonction hydroxyle dont la position par rapport au substrat est similaire. Ceci expliquerait que la TK_{gst} mutée L382D/D470T présente une activité vis-à-vis du L-glycéraldéhyde comparable à celle de la TK_{gst} mutée L382D/D470S.

Etude de la thermostabilité du mutant L382D/D470S

En vue de l'utilisation de la TK_{gst} mutée L382D/D470S en synthèse, pour accéder efficacement à haute température à des cétoles L-*érythro* (3*S*, 4*S*) à l'échelle préparative, sa stabilité thermique a été examinée. Sa température optimale se situe à 50°C, au lieu de 70°C pour la TK_{gst} sauvage. De plus, son activité est maintenue à cette température durant seulement 2,5 jours et durant uniquement 7 heures à 60°C. Nous avons ainsi envisagé son utilisation en biocatalyse à 50°C, pour la réalisation des synthèses du L-ribulose et du 5-désoxy-L-ribulose, à partir respectivement du L-glycéraldéhyde et du L-lactaldéhyde, décrites dans le chapitre suivant (Voir paragraphe 3.2.3., page 153 de ce manuscrit).

2.3.1.4. Conclusions

Les résultats obtenus lors du criblage de la banque de TK_{gst} mutées L382X/D470X, ont permis d'identifier une TK_{gst} mutée plus performante, qui présente les deux mutations L382D et D470S. Son activité est respectivement 5 et 4 fois supérieure à celle de la TK_{gst} sauvage vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du L-lactaldéhyde. Cette dernière sera utilisée en biocatalyse, pour accéder à des cétooses L-érythro (3S, 4S) à l'échelle préparative en présence d'aldéhydes α -hydroxylés (2S), dans le chapitre suivant.

2.3.2. Seconde approche

Suite aux résultats obtenus présentés précédemment, il est à noter que l'activité de la TK_{gst} mutée L382D/D470S vis-à-vis du L-glycéraldéhyde est environ 6 fois plus faible par rapport à celle de la TK_{gst} sauvage vis-à-vis du D-glycéraldéhyde. Notre objectif est ici d'augmenter encore plus significativement l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis du L-glycéraldéhyde, afin de se rapprocher de l'activité de la TK_{gst} sauvage vis-à-vis du D-glycéraldéhyde. A cet effet, nous avons envisagé de concevoir de nouvelles banques de TK_{gst} mutées.

2.3.2.1. Choix des positions clés au niveau du site actif par modélisation moléculaire

Le choix des positions qui pourraient permettre d'augmenter plus significativement l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis du L-glycéraldéhyde est capital. Globalement, 80% des TK_{gst} mutées issues de la banque D470X présentent une activité inférieure à celle de la TK_{gst} sauvage, d'un facteur 2 ou plus, contre seulement 40%, dans le cas de la banque L382X. De plus, l'apport individuel de chaque mutation L382D et D470S en terme de gain d'activité peut être analysé en comparant les activités de chaque mutant ponctuel vis-à-vis du L-glycéraldéhyde. Il apparaît que la TK_{gst} mutée L382D conduit à une activité 3 fois supérieure à celle de la TK_{gst} mutée D470S vis-à-vis de cet aldéhyde.

Dans le but de concevoir une nouvelle banque, susceptible de conduire à des TK_{gst} mutées plus performantes vis-à-vis d'aldéhydes α -hydroxylés (2S), nous avons fait le choix de conserver le résidu Asp en position 470 présent dans la séquence de la TK_{gst} sauvage et de muter le résidu L382.

L'étude *in silico* du modèle du site actif de la TK_{gst} en présence du L-glycéraldéhyde comme substrat accepteur nous a permis de cibler deux autres résidus situés à proximité de la leucine en position 382, qui pourraient conduire, une fois mutés, à l'amélioration de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2S) à 3 et 4 carbones (Figure 54).

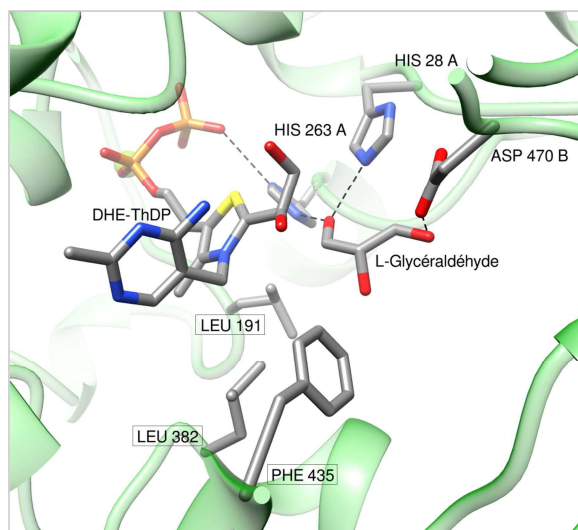


Figure 54 : Modèle du site actif de la TK_{gst} en présence du L-glycéraldéhyde
 Notation : exemples : HIS 263 A : résidu His appartenant à la sous-unité A ; ASP 470 : résidu Asp appartenant à la sous-unité B.

Deux acides aminés hydrophobes, proches du résidu L382 et situés du côté de la fonction hydroxyle du C2 des aldéhydes de configuration (S) que nous souhaitons utiliser comme substrats, ont attiré notre attention. Dans le site actif de la TK_{gst} sauvage, ils pourraient avoir pour rôle, de même que la leucine en position 382, de « repousser » les fonctions hydroxyles des substrats aldéhydiques (2R) vers les résidus du site actif capable d'établir des interactions avec eux, notamment le résidu D470, expliquant ainsi l'énantiosélectivité des TK_{gst}, TK_{sce} et TK_{eco}, en faveur des aldéhydes α -hydroxylés (2R).

Ces trois résidus apolaires L191, L382 et F435, remplacés par des résidus polaires ou chargés, laissent envisager une ou plusieurs interaction(s) avec la fonction hydroxyle portée par le C2 des aldéhydes (2S). De surcroît, un réseau de liaisons hydrogènes du côté du C2(S) de l'aldéhyde pourrait s'établir, favorisant ainsi la stabilité de ce dernier au sein du site actif de l'enzyme durant la réaction catalytique. Ainsi, la modification des résidus L191 et F435 pourrait avoir un effet complémentaire à la mutation du résidu L382. D'après ces considérations, nous avons choisi de muter les résidus L382, L191 et F435.

2.3.2.2. Obtention et criblage des banques L191X/F435X, L191X/L382X et L382X/F435X

Obtention des banques L191X/F435X, L191X/L382X et L382X/F435X

Trois banques distinctes de TK_{gst} mutées simultanément sur deux de ces trois positions ont été conçues à l'aide de codons dégénérés NDT. Notre objectif est de créer des banques de petite taille, exigeant un effort de criblage moindre, en comparaison du criblage d'une seule banque de TK_{gst} mutées sur les trois positions simultanément, composée d'au moins 5000 clones. Cette stratégie nous permettra, après analyse des résultats, d'en déduire les positions les plus bénéfiques. Ces banques sont composées de 465 clones chacune, soit 5 microplaques 96-puits et seront référencées sous les noms : L191X/F435X, L191X/L382X et L382X/F435X par la suite (Tableau 19).

Dénomination de la banque	Type de codon dégénéré	Position(s) mutée(s)	Nombre de clones
L191X/F435X	NDT	L191/F435	465 (5 plaques 96-puits)
L191X/L382X	NDT	L191/L382	465 (5 plaques 96-puits)
L382X/F435X	NDT	L382/F435	465 (5 plaques 96-puits)

Tableau 19 : Caractéristiques des banques de TK_{gst} mutées L191X/F435X, L191X/L382X et L382X/F435X

Selon cette méthode, pour obtenir un taux de représentation d'au moins 95 % des mutations possibles, chaque banque devra contenir 430 clones, chaque clone exprimant une TK_{gst} mutée [146]. 465 clones ont été sélectionnés pour chaque banque, c'est-à-dire légèrement plus que la valeur théorique.

L'analyse des trois banques de plasmides obtenues, correspondant aux trois banques de TK_{gst} mutées L191X/F435X, L191X/L382X et L382X/F435X, a montré des résultats très satisfaisants : les codons originaux ont été remplacés avec succès par des codons dégénérés NDT. En effet, les résultats du séquençage montrent des pics superposés correspondants aux bases A/T/G/C à la position N avec des proportions proches de 25% et un mélange A/G/T à la position D, dans des proportions proches de 33%. Enfin, une thymine est exclusivement présente en position T. Les chromatogrammes obtenus sont présentés en *Annexe 5*.

Premier cycle de criblage

Trois aldéhydes α -hydroxylés (2S) ont été initialement envisagés, le L-glycéraldéhyde (C3), le D-thréose (C4) et le L-érythrose (C4) (Figure 55).

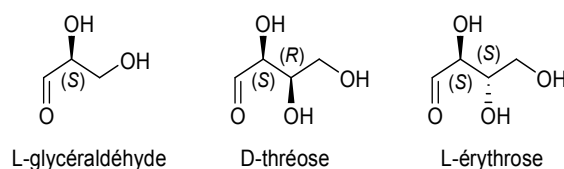


Figure 55 : Structures développées des aldéhydes α -hydroxylés (2S) envisagés comme substrats accepteurs pour le criblage des banques L191X/L382X, L191X/F435X et L382X/F435X

En effet, ce sont les substrats d'intérêt que nous souhaitons utiliser ensuite en biocatalyse, pour obtenir les cétooses L-érythro (3S, 4S) correspondants. Cependant, compte-tenu du coût élevé du L-érythrose commercial et de la quantité requise de cet aldéhyde pour le criblage des banques, seuls le L-glycéraldéhyde (20 mM) et le D-thréose (50 mM) ont été utilisés pour cribler les trois banques de TK_{gst} mutées L191X/L382X, L191X/F435X et L382X/F435X. Le D-thréose a été synthétisé à l'échelle du gramme avec un rendement de 75%, à partir du glycolaldéhyde et en présence du mutant A129G de la D-fructose-6-phosphate aldolase d'*E. coli* ou FSA_{eco} A129G, dont l'utilisation est décrite dans le chapitre suivant (Voir paragraphe 3.4.3.2., page 202 du manuscrit). Le L-érythrose est également accessible à partir du glycolaldéhyde en présence du mutant A165G/S166P de cette même enzyme. Néanmoins, étant donné la cinétique très lente de cette réaction, nous n'avons pas envisagé de synthétiser cet aldéhyde à l'échelle du gramme (Voir paragraphe 3.4.3.3., page 204 du manuscrit).

Pour chacune des banques L191X/F435X, L191X/L382X et L382X/F435X et pour chaque aldéhyde testé, les absorbances relatives A_{rel} ont été déterminées à 25°C, grâce aux équations (1) et (2) (Figure 56).

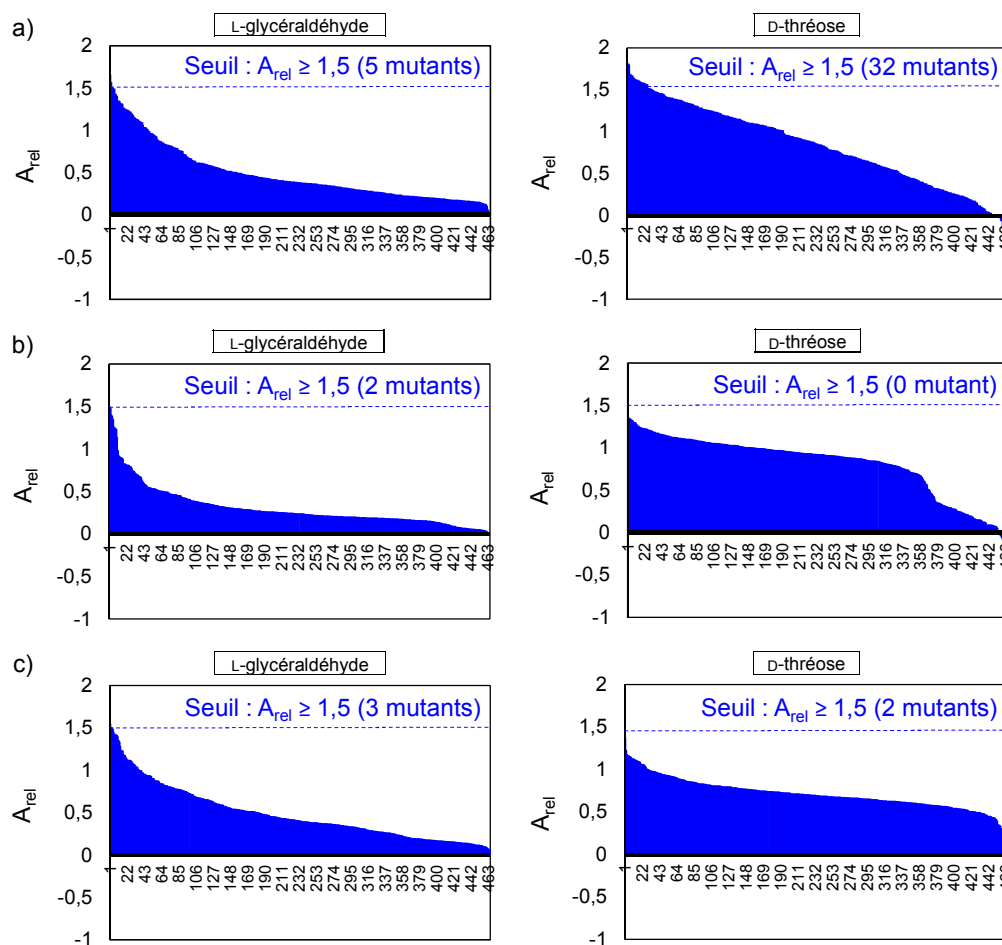


Figure 56 : Absorbances relatives A_{rel} des TK_{gst} mutées issues des banques L191X/F435X, L191X/L382X et L382X/F435X à 25°C. a) Banque L191X/F435X. b) Banque L191X/L382X. c) Banque L382X/F435X. Seuil de sélection : $A_{rel} \geq 1,5$. Pour la TK_{gst} sauvage, l' A_{rel} vaut 1.

L'analyse des résultats a été effectuée en considérant comme candidates potentielles, les TK_{gst} mutées présentes dans les lysats conduisant à une A_{rel} supérieure ou égale à 1,5 (seuil de sélection).

Ainsi, en présence du L-glycéraldéhyde, le criblage des banques L191X/F435X, L191X/L382X et L382X/F435X conduit respectivement à cinq, deux et trois TK_{gst} mutées présentant une A_{rel} supérieure ou égale à 1,5, soit 1 %, 0,4 % et 0,6 % de chaque banque. En présence du D-thréose, le criblage des banques L191X/F435X et L382X/F435X nous a permis de mettre en évidence respectivement 32 et 2 TK_{gst} mutées présentant une A_{rel} supérieure ou égale à 1,5, soit 7 % et 0,4 % de chaque banque. En présence de ce substrat, aucun mutant issu de la banque L191X/L382X et répondant à ce critère n'a été identifié. D'après ces résultats, les mutations simultanées des résidus L191 et F435, puis L382 et

F435, semblent plus bénéfiques pour l'amélioration de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des substrats (2S) testés.

Compte-tenu des résultats du criblage des trois banques en présence du L-glycéraldéhyde, les 10 TK_{gst} mutées présentant une A_{rel} supérieure ou égale à 1,5, ont été séquencées. Les A_{rel} obtenues pour chaque « hit » sont mentionnées dans le Tableau 20.

Banque de TK _{gst} mutées	TK _{gst} mutées	Séquence			A _{rel}
		Position	191	382	435
	Plaque - Puits				
	Puits H12 - Témoin*	L	L	F	1
L191X/F435X	1 - D7	I	L	F	2
	5 - D1	I	L	F	1,7
	3 - A11	I	L	N	1,6
	3 - H1	Y	L	N	1,7
	5 - G1	L	L	L	1,8
L191X/L382X	3 - C12	I	V	F	1,5
	4 - H2	L	H	F	2
L382X/F435X	2 - F1	L	L	N	1,5
	1 - G1	L	C	L	1,8
	3 - H2	L	F	Y	2

Tableau 20 : Séquences des TK_{gst} mutées les plus actives (A_{rel} ≥ 1,5) des banques L191X/F435X, L191X/L382X et L382X/F435X vis-à-vis du L-glycéraldéhyde. Cases colorées en vert : TK_{gst} mutées les plus actives. *Puits H12 témoin : lysat correspondant à la TK_{gst} sauvage (A_{rel} = 1).

Globalement, les résidus mutés sont substitués majoritairement par des acides aminés hydrophobes, par rapport aux acides aminés chargés ou polaires. En revanche, la position 435 est celle qui comporte le plus d'acides aminés polaires (trois résidus Asn) et un résidu Tyr. Parmi les mutants dont les absorbances relatives A_{rel} sont les plus élevées, *i.e.* 1-D7/5-D1, 5-G1, 4-H2 et 3-H2, deux, *i.e.* 4-H2 et 3-H2, présentent un résidu non hydrophobe, respectivement une histidine en position 382 (4-H2) et une tyrosine en position 435 (3-H2).

Compte-tenu des résultats du criblage réalisé en présence du D-thréose, 8 TK_{gst} mutées présentant une absorbance relative A_{rel} supérieure ou égale à 1,5 ont été séquencées (Tableau 21). Il est à noter que dans le cas de la banque L191X/F435X, seules les six meilleurs TK_{gst} mutées ont été sélectionnées pour être séquencées, parmi les 32 présentant une A_{rel} ≥ 1,5.

Banque de TK _{gst} mutées	TK _{gst} mutées	Séquence			A _{rel} D-thréose
		Position	191	382	435
	Plaque - Puits				
	Puits H12 - Témoin*	L	L	F	1
	2 - D1	I	L	C	1,8
	3 - D12	L	L	S	1,9
L191X/F435X	3 - E3	G	L	H	1,7
	3 - H8	L	L	V	1,6
	4 - H8	L	L	C	1,6
	5 - H8	F	L	F	1,6
	3 - G1	L	D	G	1,5
L382X/F435X	4 - H1	L	F	Y	1,9

Tableau 21 : Séquences des TK_{gst} mutées les plus actives (A_{rel} ≥ 1,5) des banques L191X/F435X, L191X/L382X et L382X/F435X vis-à-vis du D-thréose. Cases colorées en vert : TK_{gst} mutées les plus actives. *Puits H12 témoin : lysat correspondant à la TK_{gst} sauvage (A_{rel} = 1).

A la différence des résultats précédents obtenus en présence du L-glycéraldéhyde, la présence de résidus chargés ou polaires est plus fréquente, notamment sur la position 435, une tendance précédemment observée dans cette position. Les deux mutants les plus actifs ont pour référence : 3-D12 et 4-H1, présentant chacun un résidu polaire ou chargé en position 435, respectivement une sérine et une tyrosine. Il est à noter que ce dernier a également conduit à la plus forte A_{rel} en présence du L-glycéraldéhyde.

En conclusion, cinq TK_{gst} mutées présentant les absorbances relatives A_{rel} les plus élevées en présence du L-glycéraldéhyde et du D-thréose ont été sélectionnées pour un deuxième cycle de criblage. Parmi elles, une seule TK_{gst} mutée comportant les deux mutations L382F/F435Y (code 3-H2 avec le L-glycéraldéhyde ; code 4-H1 avec le D-thréose), a conduit à une A_{rel} plus élevée en présence du L-glycéraldéhyde et du D-thréose. Les quatre autres TK_{gst} mutées sélectionnées comportent une seule mutation. Il s'agit du mutant L191I, identifié deux fois en présence du L-glycéraldéhyde (codes 1-D7 et 5-D1), du mutant F435L (code 5-G1 avec le L-glycéraldéhyde), du mutant L382H (code 4-H2 avec le L-glycéraldéhyde) et du mutant F435S (code 3-D12 avec le D-thréose). Ainsi, d'après ces résultats, il semble que la présence de résidus polaires ou chargés en position L191, L382 et F435 ne soit pas essentielle pour permettre une augmentation de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes α-hydroxylés (2S).

Second cycle de criblage

Les souches d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS exprimant les cinq TK_{gst} mutées sélectionnées ont de nouveau été cultivées et les lysats cellulaires résultants ont été testés en présence du L-glycéraldéhyde et du D-thréose. Les expériences ont été réalisées en triplicata à 25°C (Figure 57).

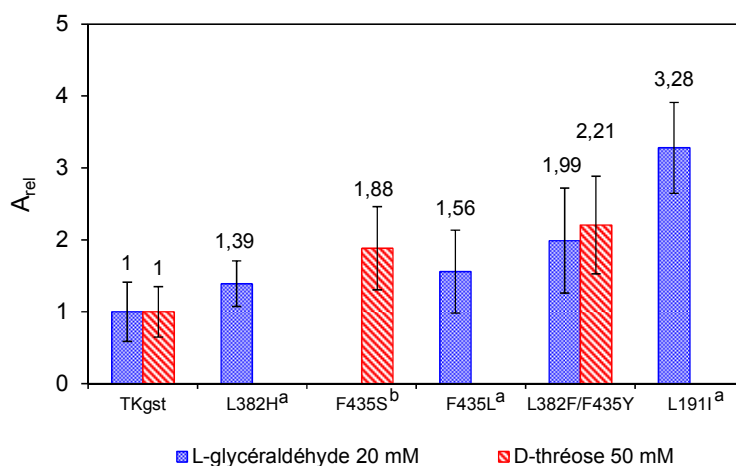


Figure 57 : Absorbances relatives A_{rel} des mutants L191I, L382H, F435S, F435L et L382F/F435Y déterminées à l'aide du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} » en présence du Li-HPA (10 mM), du L-glycéraldéhyde (20 mM) et du D-thréose (50 mM), à 25°C. ^a TK_{gst} mutées dont l'activité a été déterminée uniquement vis-à-vis du L-glycéraldéhyde. ^b TK_{gst} mutées dont l'activité a été déterminée uniquement vis-à-vis du D-thréose. Pour la TK_{gst} sauvage, l' A_{rel} vaut 1.

Les résultats présentés dans la Figure 57 permettent de confirmer les résultats obtenus lors du premier cycle de criblage. En effet, les mutants L191I, L382H, F435S, F435L et L382F/F435Y présentent une absorbance relative A_{rel} supérieure à celle de la TK_{gst} sauvage vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et/ou du D-thréose, à 25°C. La TK_{gst} mutée L382F/F435Y est la seule conduisant à une A_{rel} supérieure à celle de l'enzyme sauvage en présence à la fois du L-glycéraldéhyde et du D-thréose, qui est d'environ 2. En présence du L-glycéraldéhyde, la TK_{gst} mutée L191I est la plus active (A_{rel} de 3,3) ; vient ensuite le mutant, F435L, dont l' A_{rel} est de 1,6.

Ainsi, ces trois TK_{gst} mutées L191I, F435L et L382F/F435Y ont été sélectionnées pour la suite de l'étude.

2.3.2.3. Etude des TK_{gst} mutées purifiées les plus performantes : L191I, F435L et L382F/F435Y

Purification par IMAC

La purification des TK_{gst} mutées L191I, F435L et L382F/F435Y, exprimées avec une étiquette 6-His en position N-terminale, a été réalisée par chromatographie d'affinité en présence de cations métalliques (IMAC), selon le même principe que pour la purification de la TK_{gst}, présenté dans le paragraphe 1.2.2., page 72 de ce manuscrit), à température ambiante. Les masses de TK_{gst} mutées lyophilisées, obtenues à partir de 600 mL de culture, contenant 1,3 g de cellules humides en moyenne, sont récapitulées ci-dessous (Tableau 22). Les concentrations en protéines (mg.mL⁻¹) ont été déterminées par le test de Bradford [230].

TK	Volume de culture [mL]	Masse de cellules [g]	Protéines purifiées [mg]
TK _{gst} sauvage	1000	3,73	160
L191I	600	1,46	97
F435L	600	1,25	102
L382F/F435Y	600	1,27	110

Tableau 22 : Bilan de la purification par IMAC des TK_{gst} mutées L191I, F435L et L382F/F435Y

Cette étape de purification a permis l'obtention d'environ 100 mg de chaque TK_{gst} mutée à partir de 600 mL de culture. De même que dans le cas de la TK_{gst}, ces mutants peuvent être lyophilisés et conservés à -18°C sans perte d'activité durant plusieurs mois.

Détermination de l'activité spécifique vis-à-vis d'aldéhydes α -hydroxylés (2S)

L'activité spécifique des mutants L191I, F435L et L382F/F435Y purifiés a été déterminée à l'aide du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} » à 25°C, en présence du Li-HPA comme substrat donneur et vis-à-vis de trois aldéhydes α -hydroxylés (2S) : les deux substrats testés précédemment, le L-glycéraldéhyde et le D-thréose, mais également le L-érythrose, qui n'a pas été utilisé lors du criblage des banques (Figure 58).

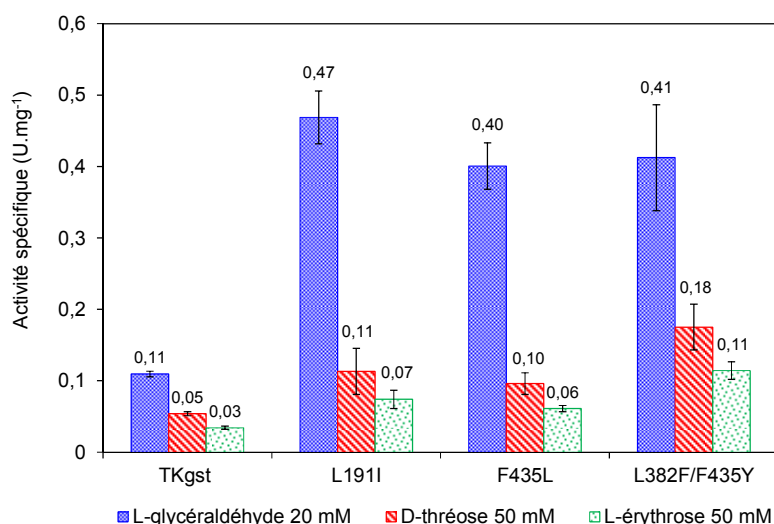


Figure 58 : Activités spécifiques de la TK_{gst} et des mutants L191I, F435L et L382F/F435Y déterminées à l'aide du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} » en présence du Li-HPA (10 mM) et du L-glycéraldéhyde (20 mM), du D-thréose (50 mM) ou du L-érythrose (50 mM) à 25°C

Les résultats obtenus précédemment à partir des lysats cellulaires contenant les TK_{gst} mutées L191I, F435L et L382F/F435Y, sont confirmés ici en présence de ces trois enzymes purifiées. La TK_{gst} mutée L191I conduit à la meilleure activité en présence du L-glycéraldéhyde (activité améliorée d'un facteur 4 par rapport à la TK_{gst} sauvage). De plus, la TK_{gst} mutée L382F/F435Y conduit aux meilleures activités en présence du D-thréose et du L-érythrose. Ce mutant est en effet 3,6 fois et 3,7 fois plus actif que la TK_{gst} vis-à-vis de ces aldéhydes respectifs (Figure 58). Ainsi, les paramètres cinétiques apparents de ces deux TK_{gst} mutées présentant les meilleures activités vis-à-vis des aldéhydes α-hydroxylés (2S) ont été déterminés.

Détermination des paramètres cinétiques apparents de la TK_{gst} mutée L191I vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et de la TK_{gst} mutée L382F/F435Y vis-à-vis du D-thréose

Les paramètres cinétiques apparents du mutant L191I vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du mutant L382F/F435Y vis-à-vis du D-thréose (le L-érythrose n'a pas été utilisé ici car nous n'en avons pas eu une quantité suffisante pour réaliser ces tests) ont été déterminés à 25°C, à l'aide du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} », en présence de 50 mM de Li-HPA. En raison du nombre important de réactions enzymatiques, ce test a été effectué en microplaques 96-puits et n'a pas pu être réalisé à 60°C, le lecteur de microplaques permettant un contrôle de la température jusqu'à 40°C (Tableau 23).

Aldéhyde	TK	K_M^{app} [mM]	V_{max}^{app} [U.mg ⁻¹]	V_{max}^{app}/K_M^{app} [U.mg ⁻¹ .mM ⁻¹]
L-glycéraldéhyde	TK _{gst} sauvage	> 300	2,3 ± 0,6	< 0,008
	L191I	170,2 ± 30,5	3,3 ± 1,7	0,02
D-thréose	TK _{gst} sauvage	nd	nd	nd
	L382F/F435Y	> 100	0,3 ± 0,1	< 0,004

Tableau 23 : Paramètres cinétiques apparents de la TK_{gst} mutée L191I vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et de la TK_{gst} mutée L382F/F435Y vis-à-vis du D-thréose déterminés à l'aide du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} » en présence du Li-HPA (50 mM) à 25°C. nd = non détecté.

Un K_M^{app} de 170,2 ± 30,5 mM est obtenu avec le mutant L191I en présence du L-glycéraldéhyde, une valeur au moins 1,8 fois inférieure à celle de la TK_{gst}, traduisant une meilleure affinité de ce mutant pour ce substrat (2S), en comparaison de l'enzyme sauvage. La V_{max}^{app} de 3,3 ± 1,7 U.mg⁻¹ est légèrement supérieure à celle obtenue avec la TK_{gst} sauvage. Le rapport V_{max}^{app}/K_M^{app} résultant, de 0,02, est au moins trois fois supérieur à celui déterminé avec la TK_{gst}. Ce résultat illustre une meilleure efficacité de la réaction catalysée par la TK_{gst} mutée L191I en présence du L-glycéraldéhyde, par rapport à celle de la TK_{gst} sauvage.

La comparaison des paramètres cinétiques apparents du mutant L382F/F435Y et de la TK_{gst} sauvage en présence du D-thréose n'a pas pu être réalisée car les pentes détectées en présence de la TK_{gst} sauvage (UA.min⁻¹) sont trop faibles, souvent en dessous de la LOQ du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} ». Les résultats obtenus avec la TK_{gst} L382F/F435Y conduisent à un K_M^{app} supérieur à 100 mM et une V_{max}^{app} de 0,3 ± 0,1 U.mg⁻¹. Il ne s'agit ici que d'estimations car certaines pentes mesurées se situent en dessous de la LOQ du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} ».

Interprétation des résultats obtenus par analyse du modèle du site actif des TK_{gst} mutées L191I et L382F/F435Y

Dans le but d'interpréter les activités plus élevées des mutants L191I et L382F/F435Y vis-à-vis respectivement du L-glycéraldéhyde et du D-thréose par rapport à la TK_{gst} sauvage, observées expérimentalement, nous avons analysé les interactions possibles entre ces substrats et les résidus des modèles des sites actifs de ces deux TK_{gst} mutées.

Des modèles du site actif de la TK_{gst} mutée L191I et de la TK_{gst} mutée L382F/F435Y ont été construits, en présence, respectivement, du L-glycéraldéhyde et du D-thréose, à partir du

modèle précédemment obtenu pour la TK_{gst} sauvage (Voir paragraphe 2.2.1., page 89) et de la même manière que pour la construction du modèle de la TK_{gst} mutée L382D/D470S, présentée précédemment (Voir paragraphe 2.3.1.3., page 101). Les résultats montrent que les mutations L191I et L382F/F435Y apportées à la TK_{gst}, n'entraîneraient pas de modification de la structure tertiaire du site actif (Figure 59).

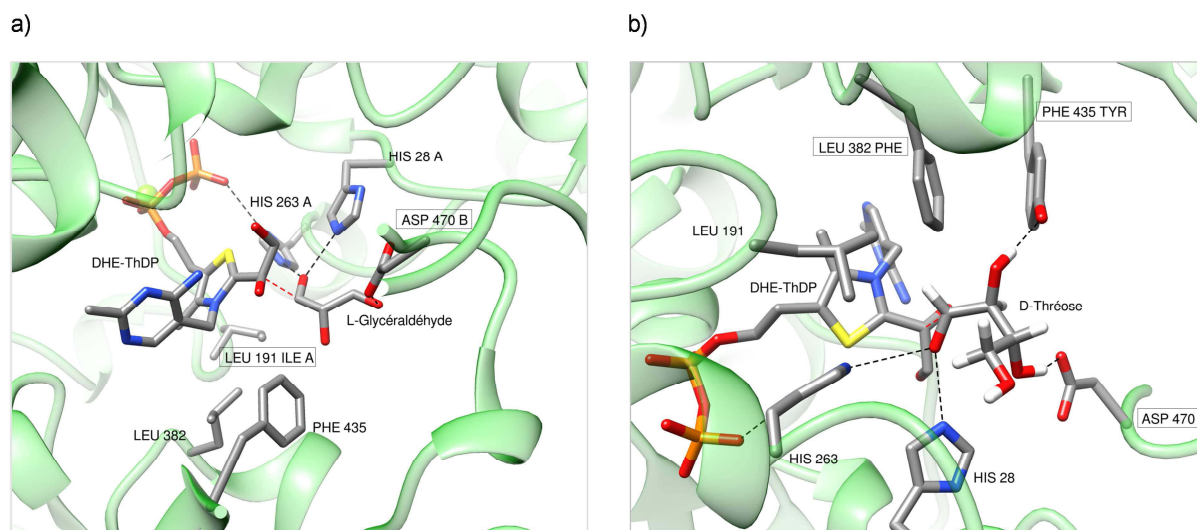


Figure 59 : Modèles des sites actifs des TK_{gst} mutées L191I et L382F/F435Y en présence d'aldéhydes α -hydroxylés (2S) accepteurs. a) Modèle du site actif de la TK_{gst} mutée L191I en présence du L-glycéraldéhyde. b) Modèle du site actif de la TK_{gst} mutée L382F/F435Y en présence du D-thréose. Notation : exemples : HIS 263 A : résidu His appartenant à la sous-unité A ; LEU 191 ILE A : résidu Leu appartenant à la sous-unité A substitué par un résidu Ile.

La présence d'un résidu Ile à la place de la leucine en position 191 pourrait avoir pour rôle de « repousser » plus fortement le L-glycéraldéhyde vers la partie opposée du site actif, qui elle, est plus hydrophile et notamment vers le résidu D470. Ce substrat serait alors stabilisé par ce dernier résidu *via* une liaison hydrogène avec le groupement hydroxyle du C3 du substrat (Figure 59 a)).

Dans le cas de la TK_{gst} mutée L382F/F435Y, une liaison hydrogène pourrait s'établir entre la fonction hydroxyle du résidu Tyr en position 435 et le groupement hydroxyle porté par le C2 du D-thréose de configuration (S). De plus, la Phe substituant la leucine en position 382, pourrait contribuer au positionnement adéquat du résidu Y435 *via* des interactions « π -stacking » entre les deux résidus aromatiques. Enfin, comme pour le L-glycéraldéhyde, la fonction hydroxyle portée par le C3 du D-thréose pourrait être stabilisée par liaison hydrogène avec le groupement carboxylate du résidu D470. L'ensemble de ces interactions permettrait ainsi de favoriser la stabilisation du D-thréose au sein du site actif de la TK_{gst}

mutée L382F/F435Y, conduisant à une augmentation de son activité vis-à-vis de cet aldéhyde α -hydroxylé (2S) (Figure 59 b)).

Etude de la thermostabilité des mutants L191I et L382F/F435Y

En vue de l'utilisation des mutants L191I et L382F/F435Y en biocatalyse, pour la synthèse à haute température de cétooses L-érythro (3S, 4S) à l'échelle préparative, leur stabilité à 60°C a été examinée sur une durée de six jours. Les activités de ces deux mutants sont parfaitement conservées durant quatre jours puis chutent d'un facteur 2 après six jours à 60°C, un résultat semblable ayant été obtenu en présence de la TK_{gst} sauvage.

Par conséquent, la thermostabilité des mutants L191I et L382F/F435Y durant quatre jours à 60°C permettra d'envisager leur utilisation en biocatalyse à cette température, en présence du L-glycéraldéhyde et du D-thréose, pour la synthèse des cétooses L-érythro (3S, 4S) correspondants, le L-ribulose et le D-tagatose (Voir paragraphe 3.2.3. du chapitre suivant).

2.3.3. Conclusions

Les deux approches de mutagenèse semi-rationnelle utilisées, basées sur la mutation simultanée de deux résidus identifiés d'après le modèle structural de la TK_{gst}, ont permis d'obtenir des banques de TK_{gst} mutées, qui, après criblage, ont conduit à la sélection de trois TK_{gst} mutées plus performantes que la TK_{gst} sauvage vis-à-vis d'aldéhydes α -hydroxylés (2S).

La première approche a révélé la TK_{gst} mutée L382D/D470S comme étant, après purification, 5 fois plus active vis-à-vis du L-glycéraldéhyde, utilisé comme substrat (2S) « modèle » et 4 fois plus active vis-à-vis du L-lactaldéhyde, par rapport à la TK_{gst} sauvage. La seconde approche a permis de sélectionner après purification, deux TK_{gst} mutées : le simple mutant L191I, quatre fois plus actif que l'enzyme sauvage vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et le double mutant L382F/F435Y, dont les activités spécifiques sont respectivement 3,7 fois et 3,6 fois plus élevées que celles de l'enzyme sauvage vis-à-vis du D-thréose et du L-érythro. Les synthèses catalysées par ces trois TK_{gst} mutées thermostables seront présentées dans le chapitre suivant (Voir paragraphes 3.2.3.).

2.4. Augmentation de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6)

2.4.1. Introduction

L'étude du spectre de substrats accepteurs de la TK_{gst}, réalisée à l'échelle analytique et présentée précédemment dans la paragraphe 1.3.3.1., page 78 de ce manuscrit, nous a montré que les activités de cette enzyme vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6) étaient très faibles. Par exemple, les activités spécifiques de la TK_{gst} vis-à-vis du D-ribose (C5) et du D-xylose (C5) (200 mM) représentent respectivement 7% et 2% de celle mesurée en présence du glycolaldéhyde (C2) (20 mM), le substrat accepteur de référence. Quant au D-glucose (C6), il n'est pas converti par la TK_{gst} sauvage. Par conséquent, notre objectif est d'améliorer l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis de ces aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6) par Evolution *in vitro*, afin d'accéder plus efficacement aux cétooses de configuration D-*thréo* (3S, 4R) correspondants, comportant 7 et 8 atomes de carbone : le D-sédoheptulose (C7), le D-*ido*-heptulose (C7) et le D-*glycéro*-D-*ido*-octulose (C8). Ces derniers présentent en effet de nombreuses applications, notamment dans le domaine pharmaceutique, comme indiqué précédemment (Voir paragraphe 2.1., page 86). Cet aspect a été abordé dans la littérature, en présence des TK_{sce} et TK_{eco} [106], [171]. Les TKs mutées identifiées comme étant les plus performantes présentent une activité environ deux fois supérieure à l'enzyme sauvage vis-à-vis du D-ribose (C5), du L-arabinose (C5) et du D-glucose (C6). Néanmoins, leur intérêt en biocatalyse, pour la synthèse des produits correspondants avec l'obtention de meilleurs rendements que ceux déterminés en présence de l'enzyme sauvage, n'a pas été démontré.

Afin de construire les banques de TK_{gst} mutées, l'étape préliminaire est l'identification des résidus clés du site actif de la TK_{gst} à muter par modélisation moléculaire.

2.4.2. Choix des positions clés du site actif par modélisation moléculaire

Grâce à l'étude *in silico* du modèle du site actif de la TK_{gst} en présence du D-E4P (aldéhyde accepteur naturel) et à l'analyse des résultats décrits dans la littérature, portant sur l'étude du site actif des TK_{sce} et TK_{eco} et leur modification par ingénierie, plusieurs acides aminés clés ont été ciblés, qui pourraient mener, une fois mutés, à une amélioration de l'activité de

la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (*2R*) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6) (Figure 60).

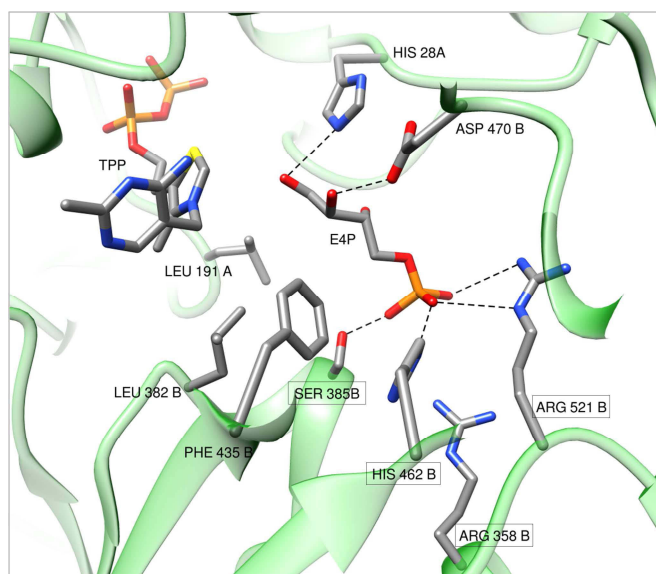


Figure 60 : Modèle du site actif de la TK_{gst} en présence du D-E4P. Notation : exemples : HIS 263 A : résidu His appartenant à la sous-unité A ; ASP 470 B : résidu Asp appartenant à la sous-unité B.

Comme nous l'avons vu au cours de l'étude bibliographique, les acides aminés R528, S386, H469 et R359 de la TK_{sce}, correspondant respectivement aux résidus R520, S385, H461 et R358 de la TK_{eco}, interagissent avec le groupement phosphate des substrats accepteurs naturels *via* des liaisons de faible énergie, apportant une flexibilité au site actif de la TK, en fonction de la longueur de la chaîne carbonée. En effet, les aldéhydes phosphorylés naturels comportant de 3 à 7 atomes de carbone sont acceptés par la TK [86].

Ces observations peuvent être combinées aux résultats déjà décrits dans la littérature. Deux études récentes menées en présence d'aldéhydes α -hydroxylés (*2R*) non phosphorylés et à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6) [106], [171], ont montré que la mutation du résidu R528, conjointement avec la mutation du résidu S527, conduit à des améliorations d'un facteur 2,6 à 2,1 vis-à-vis respectivement du D-ribose et du D-glucose, chez la TK_{sce} (mutant R528Q/S527T) [106]. La mutation du résidu R520 semble être plus bénéfique car la TK_{eco} mutée R520Y est décrite comme étant 2,1 fois plus active que la TK_{eco} sauvage vis-à-vis du L-arabinose [171].

Compte-tenu de ces données, quatre positions clés ont été sélectionnées d'après la séquence de la TK_{gst} : R521 (R520 pour la TK_{eco}, R528 pour la TK_{sce}), S385 (S385 pour la

TK_{eco}, S386 pour la TK_{sce}), H462 (H461 pour la TK_{eco}, H469 pour la TK_{sce}) et R358 (R358 pour la TK_{eco}, R359 pour la TK_{sce}). Ces positions seront utilisées afin de construire les banques de TK_{gst} mutées.

La stratégie que nous avons envisagée ici est basée sur la méthode « CAST », selon un processus itératif. Chaque position sera tout d'abord mutée individuellement puis les TK_{gst} mutées les plus actives seront combinées deux à deux, afin de réduire les efforts de criblage. Nous avons souhaité expérimenter cette nouvelle approche en espérant obtenir des résultats plus rapidement. En effet, dans les cas présentés précédemment, deux positions ont été d'emblée soumises simultanément à la mutagenèse par saturation de site, ce qui se traduit par un temps important consacré au criblage, compte-tenu de la taille des banques.

2.4.3. Obtention et criblage des banques R521X, S385X, H462X et R358X

2.4.3.1. Obtention des banques

Des codons dégénérés NNS ont été utilisés pour la construction des banques de TK_{gst} mutées notées : R521X, S385X, H462X et R358X, dans la suite du manuscrit. Après séquençage, l'analyse des quatre banques de plasmides obtenues a montré des résultats très satisfaisants : les codons originaux ont été remplacés avec succès par des codons dégénérés NNS. En effet, les résultats du séquençage montrent des pics superposés correspondants aux bases A/T/G/C aux positions N avec des proportions proches de 25% et un mélange G/C à la position S, dans des proportions proche de 50% (Voir *Annexe 5*).

Après transformation de la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS par les mélanges de plasmides obtenus, 188 clones (soit 2 microplaques 96-puits) ont été sélectionnés pour chaque banque (R521X, S385X, H462X et R358X), c'est-à-dire environ deux fois plus que la valeur théorique de 94 clones nécessaires pour la représentation d'au moins 95 % des mutations possibles [146] (Tableau 24).

Dénomination de la banque	Type de codon dégénéré	Position(s) mutée(s)	Nombre de clones
R521X	NNS	R521	188 (2 plaques 96-puits)
S385X	NNS	S385	188 (2 plaques 96-puits)
H462X	NNS	H462	188 (2 plaques 96-puits)
R358X	NNS	R358	188 (2 plaques 96-puits)

Tableau 24 : Caractéristiques des banques de TK_{gst} mutées R521X, S385X, H462X et R358X

2.4.3.2. Criblage des banques

Après culture et lyse des cellules, les quatre banques de TK_{gst} mutées R521X, S385X, H462X et R358X ont été criblées vis-à-vis de trois aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6) : le D-ribose (C5), le D-xylose (C5) et le D-glucose (C6). Ces aldéhydes ont été utilisés à une concentration finale de 200 mM (Figure 61).

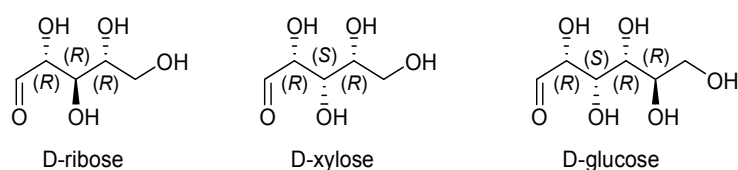


Figure 61 : Structures développées des aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6) utilisés comme substrats accepteurs pour le criblage des banques R521X, S385X, H462X et R358X

Pour chacune des banques R521X, S385X, H462X et R358X et pour chaque aldéhyde testé, les absorbances relatives A_{rel} ont été déterminées à 25°C, grâce aux équations (1) et (2) (Figure 62).

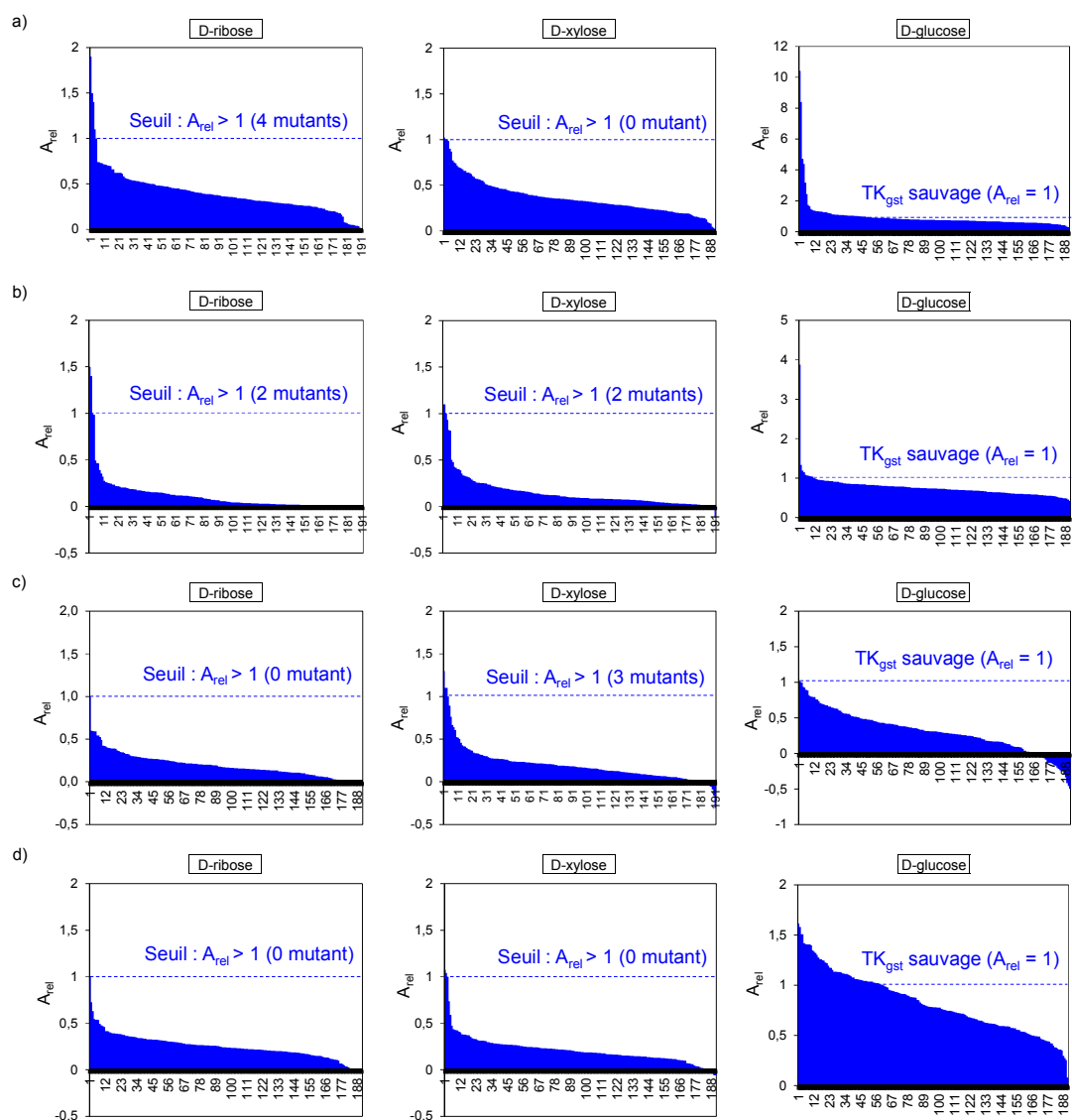


Figure 62 : Absorbances relatives A_{rel} des TK_{gst} mutées issues des banques R521X, S385X, H462X et R358X à 25°C. a) Banque R521X. b) Banque S385X. c) Banque H462X. d) Banque R358X. Pour la TK_{gst} sauvage, l' A_{rel} vaut 1.

En présence du D-glucose, les TK_{gst} mutées issues des quatre banques présentent des valeurs d'absorbances (UA) très faibles et aucun changement de couleur significatif du milieu n'a malheureusement été observé, malgré l'obtention d' A_{rel} supérieures à 1, notamment dans le cas des banques R521X et S385X. Pour expliquer ce résultat, il est à rappeler le mode de calcul de l' A_{rel} . Cette grandeur est obtenue *via* la comparaison de la différence d'absorbance obtenue pour chaque TK_{gst} mutée (ΔA_{560} (TK_{gst} mutée)) et la moyenne de la différence d'absorbance obtenue pour la TK_{gst} sauvage (ΔA_{560} moyenne (TK_{gst} sauvage)), vis-à-vis d'un substrat donné, selon l'équation (2) suivante :

$$A_{rel} = \frac{\Delta A_{560} (TK_{gst} \text{ mutée})}{\Delta A_{560} \text{ moyenne } (TK_{gst} \text{ sauvage})} \quad (2)$$

En présence de lysat contenant la TK_{gst} sauvage, une ΔA_{560} moyenne très faible est obtenue : 0,021 UA, correspondant à une pente de 0,0007 UA.min⁻¹. Les différences d'absorbances ΔA_{560} obtenues pour les TK_{gst} mutées constituant les banques R521X, S385X, H462X et R358X sont elles aussi très faibles. Ainsi, par exemple, dans le cas d'une TK_{gst} mutée ayant une A_{rel} de 3, la ΔA_{560} associée sera de 0,063 UA, correspondant à une pente de 0,0021 UA.min⁻¹, en dessous de la LOD du « test $TK_{ROUGE \text{ DE PHENOL}}$ ». Ainsi, les données en présence de cet aldéhyde n'ont pas été exploitées par la suite.

En présence du D-ribose et du D-xylose, les A_{rel} ont généralement des valeurs proches de celles obtenues avec la TK_{gst} sauvage. Aussi, nous avons fixé un seuil de sélection supérieur à 1.

Les A_{rel} des TK_{gst} mutées les plus actives ($A_{rel} > 1$) sont regroupées dans la Figure 63.

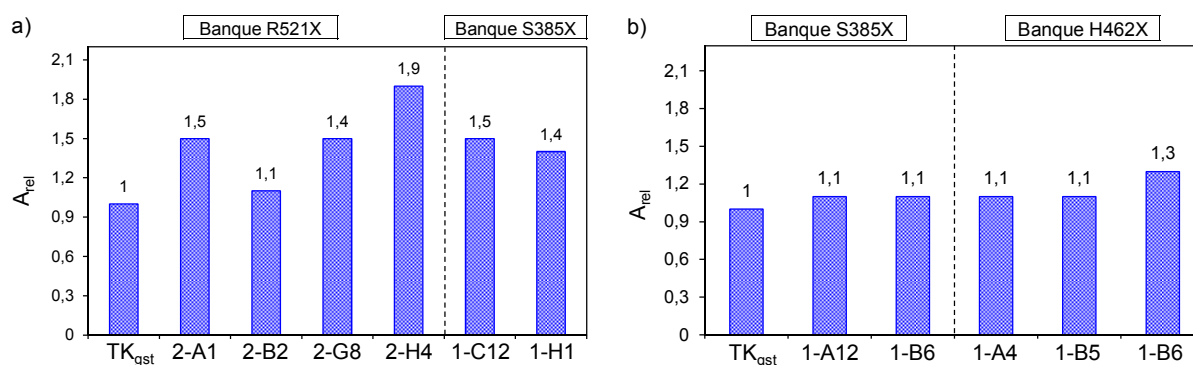


Figure 63 : Absorbances relatives A_{rel} des TK_{gst} mutées les plus actives ($A_{rel} > 1$) vis-à-vis du D-ribose et du D-xylose issues des banques R521X, S385X et H462X à 25°C.

a) D-ribose. b) D-xylose. Pour la TK_{gst} sauvage, l' A_{rel} vaut 1.

En présence du D-ribose, les mutations en position 521 semblent être plus influentes que celles en position 385 : 4 mutants, soit 2% de la banque R521X, présentent en effet une A_{rel} comprise entre 1,1 et 1,9, contre 2 mutants, soit 1% de la banque S385X, présentant une A_{rel} comprise entre 1,4 et 1,5. Les deux autres banques H462X et R358X ne présentent aucun candidat (Figure 63 a)).

En présence du D-xylose, les effets des mutations sur une position particulière sont moins marqués. Le criblage des banques S385X et H462X conduit respectivement à l'obtention de 2 et 3 mutants ayant des A_{rel} comprises entre 1,1 et 1,3, soit 1% de chaque banque (Figure 63 b)).

Les séquences des onze TK_{gst} mutées les plus actives vis-à-vis du D-ribose et du D-xylose issues des banques R521X, S385X et H462X, précédemment identifiées, ont ensuite été analysées (Tableau 25).

Banque de TK_{gst} mutées	TK_{gst} mutées	Séquence			A_{rel}	A_{rel}
		Position	521	385	D-ribose	D-xylose
Plaque - Puits						
	Puits H12 - Témoin*	R	S	H	1	1
R521X	2 - A1	T	S	H	1,5	-
	2 - B2	S	S	H	1,1	-
	2 - G8	L	S	H	1,4	-
	2 - H4	V	S	H	1,9	-
S385X	1 - C12	R	T	H	1,5	-
	1 - H1	R	V	H	1,4	-
	1 - A12	R	R	H	-	1,1
	1 - B6	R	D	H	-	1,1
H462X	1 - A4	R	S	H	-	1,1
	1 - B5	R	S	L	-	1,1
	1 - B6	R	S	T	-	1,3

Tableau 25 : Séquences des TK_{gst} mutées les plus actives ($A_{rel} > 1$) des banques R521X, S385X et H462X vis-à-vis du D-ribose et du D-xylose. Cases colorées en vert : TK_{gst} mutées les plus actives. *Puits H12 témoin : lysat correspondant à la TK_{gst} sauvage ($A_{rel} = 1$).

Les résidus des positions 521, 385 et 462 de la séquence sauvage sont tous polaires ou chargés. Pour les trois positions mutées, les TK_{gst} mutées sélectionnées font apparaître de nouveaux résidus. Dans aucune de ces positions, le résidu de la séquence sauvage est conservé. Les nouveaux acides aminés sont chargés ou polaires pour la majorité des mutants (Thr, Ser, Asp, Arg, His). De plus, pour trois mutants, des résidus hydrophobes sont présents (Val, Leu). Les quatre mutants R521T (code : 2-A1), R521V (code : 2-H4), S385T (code : 1-C12) et S385V (code : 1-H1) sont les plus actifs par rapport à la TK_{gst} sauvage vis-à-vis du D-ribose : ils conduisent en effet à des gains d'activité respectifs de 1,5, 1,9, 1,5 et 1,4.

Dans le but de créer un effet de coopération entre ces mutations et ainsi, d'améliorer plus significativement l'activité de la TK_{gst} sauvage vis-à-vis du D-ribose, nous avons envisagé de combiner deux à deux ces mutations, qui apparaissent comme les plus bénéfiques. Pour cela, quatre mutants ponctuels de la TK_{gst} ont été créés : R521V/S385T, R521V/S385V, R521T/S385T, R521T/S385V, dont les activités seront de nouveau déterminées vis-à-vis du D-ribose (C5) mais également vis-à-vis du D-xylose (C5) et du D-glucose (C6).

2.4.4. Obtention et caractérisation des doubles mutants R521V/S385T, R521V/S385V, R521T/S385T et R521T/S385V

Obtention des quatre mutants ponctuels

L'analyse de chaque plasmide obtenu, correspondant aux mutants R521V/S385T, R521V/S385V, R521T/S385T, R521T/S385V, a montré des résultats très satisfaisants : les codons originaux ont été remplacés avec succès par un codon GTT, codant pour une valine, dans le cas du mutant R521V, par un codon ACG, codant pour une thréonine, dans le cas du mutant S385T et par un codon GTG, codant pour une valine, dans le cas du mutant S385V (Voir *Annexe 5*).

Remarque : Les mutants R521T/S385T et R521T/S385V ont été conçus à partir du mutant R521T, obtenu *via* la construction de la banque R521X, présentée précédemment. Il n'a donc pas été nécessaire d'effectuer la substitution de l'arginine par une thréonine à l'aide d'une paire d'amorces nucléotidiques. Ces dernières ne figurent donc pas dans le Tableau 53 de la *Partie Expérimentale* et le chromatogramme présentant la substitution de l'arginine en thréonine ne figure donc pas en *Annexe 5*. La présence de cette substitution a été vérifiée en amont.

Après culture des clones correspondants aux mutants R521V/S385T, R521V/S385V, R521T/S385T, R521T/S385V et lyse des cellules, les lysats cellulaires ont été criblés en présence du D-ribose, du D-xylose et du D-glucose, utilisés à une concentration finale de 200 mM. Les expériences ont été réalisées en triplicata.

Détermination de l'activité des doubles mutants

Le D-glucose a également été testé, afin d'évaluer l'effet de ces mutations sur l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis d'un aldéhyde α -hydroxylé (2R) à longue chaîne polyhydroxylée à 6 atomes de carbone (Figure 64).

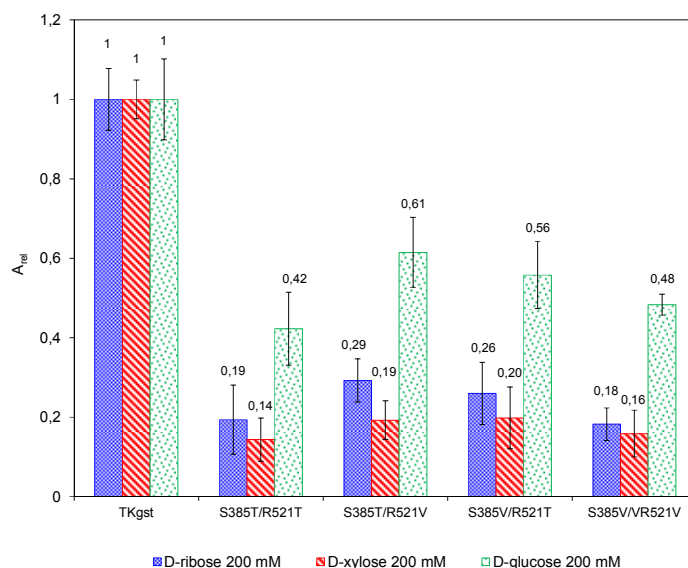


Figure 64 : Absorbances relatives A_{rel} des TK_{gst} mutées R521V/S385T, R521V/S385V, R521T/S385T et R521T/S385V déterminées à l'aide du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} » vis-à-vis du Li-HPA (10 mM) et du D-ribose (200 mM), du D-xylose (200 mM) ou du D-glucose (200 mM) à 25°C
 Pour la TK_{gst} sauvage, l' A_{rel} vaut 1.

La Figure 64 montre que les combinaisons deux à deux des mutations R521V, R521T, S385T et S385V, ne conduisent pas à une amélioration de l'activité par rapport à celles obtenues avec les mutants simples et semble, de surcroît, délétère pour l'activité de l'enzyme. En effet, les mutants R521V/S385T, R521V/S385V, R521T/S385T et R521T/S385V présentent une A_{rel} d'environ 0,2 vis-à-vis du D-ribose et du D-xylose. De plus, une A_{rel} aux environs de 0,5 est obtenue pour ces derniers vis-à-vis du D-glucose.

En conclusion, à l'issue du criblage des banques de TK_{gst} mutées R521X, S385X, H462X et R358X vis-à-vis d'aldéhydes α -hydroxylés (2R) comportant 5 et 6 atomes de carbone, les mutations R521V, R521T, S385T, S385V apparaissent comme les plus bénéfiques, même si elles conduisent à des améliorations modérées, ces mutants étant en effet de 1,1 à 1,9 fois plus actifs que la TK_{gst} sauvage vis-à-vis du D-ribose. Dans le but de créer un effet de synergie entre les mutations de ces résidus, la stratégie que nous avons envisagée a été de combiner les quatre mutations deux à deux, *via* la création des quatre mutants ponctuels suivants : R521V/S385T, R521V/S385V, R521T/S385T et R521T/S385V. Cependant, les résultats n'ont pas été concluants.

Par conséquent, une seconde stratégie a été adoptée. Celle-ci consiste à muter simultanément les résidus R521, S385 et H462, dont la mutation individuelle a conduit à

l'obtention des meilleurs résultats, afin d'obtenir, *in fine*, des gains d'activité plus significatifs par rapport à la TK_{gst} sauvage vis-à-vis des aldéhydes ciblés.

2.4.5. Obtention et criblage de la banque R521X/S385X/H462X

2.4.5.1. Obtention de la banque

Des codons dégénérés NDT ont été employés, afin de réduire la taille de la banque. L'analyse de la banque de plasmides obtenue, correspondant à la banque de TK_{gst} mutées notée R521X/S385X/H462X dans ce manuscrit, a montré des résultats très satisfaisants : les codons originaux ont été remplacés avec succès par des codons dégénérés NDT. En effet, les résultats du séquençage montrent des pics superposés correspondants aux bases A/T/G/C à la position N avec des proportions proches de 25% et un mélange A/G/T à la position D, dans des proportions proches de 33%. Enfin, une thymine est exclusivement présente en position T (Voir *Annexe 5*).

Après transformation dans la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS par le mélange de plasmides obtenus, 5022 clones (soit 54 microplaques 96-puits) ont été sélectionnés, au lieu des 5175 préconisés [146]. Néanmoins, compte-tenu du nombre total conséquent d'enzymes mutées à tester, nous avons jugé qu'une banque composée d'environ 5000 enzymes mutées serait suffisamment représentative des différentes mutations possibles (Tableau 26).

Dénomination de la banque	Type de codon dégénéré	Position(s) mutée(s)	Nombre de clones
R521X/S385X/H462X	NDT	R521/S385/H462	5022 (54 plaques 96-puits)

Tableau 26 : Caractéristiques de la banque de TK_{gst} mutées R521X/S385X/H462X

2.4.5.2. Premier cycle de criblage

La banque de TK_{gst} mutées R521X/S385X/H462X est constituée de 5022 clones, répartis sur 54 microplaques 96-puits. Compte-tenu du nombre important de lysats à tester, deux aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée ont été choisis comme « modèles » : le D-ribose (C5) et le D-glucose (C6). Les résultats obtenus sont indiqués dans la Figure 65.

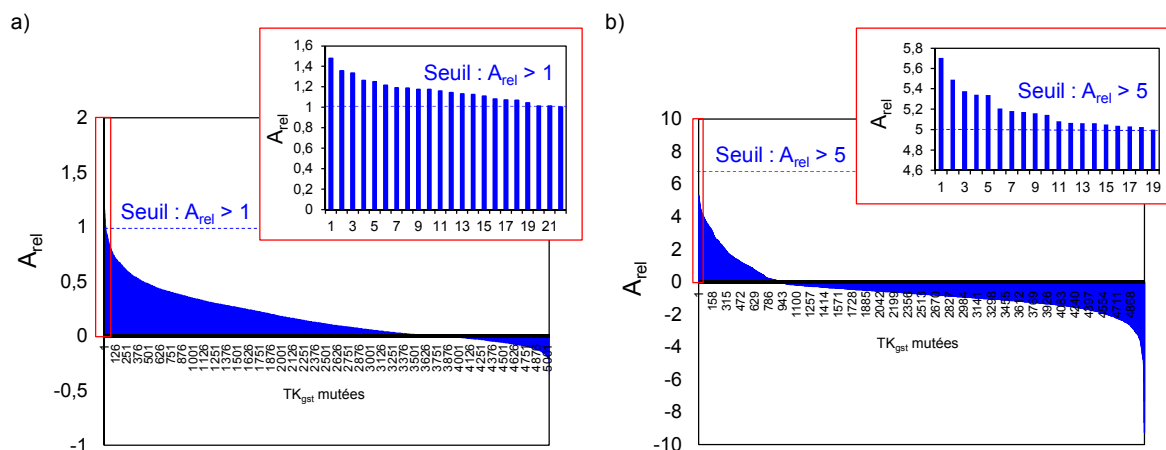


Figure 65 : Absorbances relatives A_{rel} des TK_{gst} mutées issues de la banque R521X/S385X/H462X à 25°C. a) D-ribose. b) D-glucose. Dans l'encadré rouge : lysats présentant une A_{rel} supérieure au seuil de sélection indiqué. Pour la TK_{gst} sauvage, l' A_{rel} vaut 1.

Les mutants ont été classés dans différentes catégories en fonction de leurs absorbances relatives A_{rel} , pour chaque aldéhyde testé (Tableau 27).

a)			b)		
A_{rel} D-ribose	Nombre de mutants	%	A_{rel} D-glucose	Nombre de mutants	%
> 0 - 0,2	3099	62	> 0 - 0,5	4497	89,5
0,2 - 0,5	1474	29	0,5 - 1	26	0,5
0,2 - 1	427	8,5	1 - 5	480	9,6
> 1	22	0,5	> 5	19	0,4
Total	5022	100	Total	5022	100

Tableau 27 : Répartition des TK_{gst} mutées issues de la banque R521X/S385X/H462X selon leurs absorbances relatives A_{rel} . a) D-ribose. b) D-glucose. Pour la TK_{gst} sauvage, l' A_{rel} vaut 1.

En présence du D-ribose, une vingtaine de TK_{gst} mutées parmi les 5022 testées (soit 0,5% de la banque) indiquent une A_{rel} supérieure à 1.

En présence du D-glucose, environ 500 TK_{gst} mutées présentent des A_{rel} supérieures à 1, soit 10 % de la totalité de la banque. Ces chiffres sont les plus élevés parmi ceux obtenus pour toutes les banques criblées dans le cadre de ces travaux de thèse. Cependant, les A_{rel} calculées pour chaque TK_{gst} mutée résultent d'absorbances qui sont majoritairement faibles (Voir paragraphe 2.4.3.2., page 122).

Ainsi, différents seuils de sélection ont été attribués pour chaque aldéhyde testé (Tableau 28). Pour le D-ribose, les TK_{gst} mutées présentant une A_{rel} supérieure à 1 ont été sélectionnées ; pour le D-glucose, les mutants présentant des A_{rel} supérieures à 5 ont été choisis. Le nombre de TK_{gst} mutées répondant à ces critères est indiqué dans le Tableau 28.

Aldéhyde	Seuil de sélection	Nombre de TK_{gst} sélectionnées	% par rapport à la banque R521X/S385X/H462X
D-ribose	$A_{rel} > 1$	22	0,5
D-glucose	$A_{rel} > 5$	19	0,4

Tableau 28 : TK_{gst} mutées les plus performantes issues de la banque R521X/S385X/H462X vis-à-vis du D-ribose et du D-glucose à 25°C. Pour la TK_{gst} sauvage, l' A_{rel} vaut 1.

Les activités de ces 41 TK_{gst} mutées ont de nouveau été déterminées lors d'un second cycle de criblage, afin de confirmer les résultats obtenus lors du premier cycle.

2.4.5.3. Second cycle de criblage

Les souches exprimant les TK_{gst} mutées les plus actives ainsi sélectionnées ont été remises en culture sur une même microplaque 96-puits, afin de pouvoir comparer les absorbances relatives A_{rel} à partir des lysats cellulaires obtenus dans des conditions strictement identiques (Figure 66).

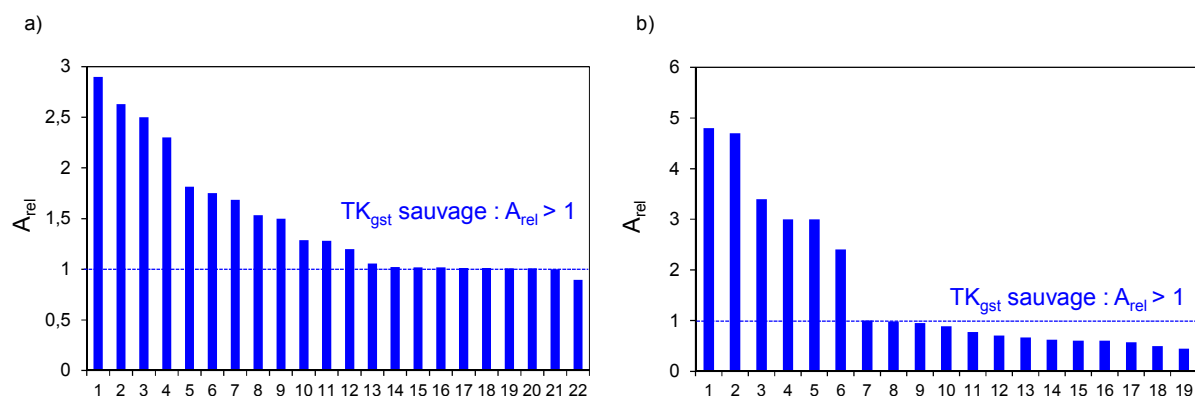


Figure 66 : Absorbances relatives A_{rel} des TK_{gst} mutées les plus performantes issues de la banque R521X/S385X/H462X à 25°C. a) D-ribose. b) D-glucose. Pour la TK_{gst} sauvage, l' A_{rel} vaut 1.

Analyse des résultats à l'issue du second cycle de criblage en présence du D-ribose

Le second cycle de criblage réalisé en présence du D-ribose confirme que les 22 mutants sélectionnés précédemment (à une exception près), ont des activités supérieures ou égales à celles de la TK_{gst} sauvage. Parmi celles-ci, les quatre TK_{gst} mutées les plus actives, présentant les gains les plus élevés, supérieurs à 2 par rapport au témoin (lysate contenant la TK_{gst} sauvage), ont été séquencées (Tableau 29).

TK _{gst} mutées	Séquence			A _{rel} D-ribose
	Position	521	385	462
Plaques - Puits				
Puits H12 - Témoin*	R	S	H	1
6 - H2	C	D	G	2,6
21 - A8	C	D	S	2,3
18 - H1	V	S	G	2,5
49 - A2	Y	S	N	2,9

Tableau 29 : Séquences des TK_{gst} mutées les plus actives (A_{rel} > 2) vis-à-vis du D-ribose
Cases colorées en vert : TK_{gst} mutées les plus actives. *Puits H12 témoin : lysate correspondant à la TK_{gst} sauvage (A_{rel} = 1).

Chaque position mutée comporte majoritairement un acide aminé différent de celui présent dans la séquence sauvage, sauf dans deux cas (code 18-H1 : S385S ; code 49-A2 : S385S). Les nouveaux acides aminés sont très majoritairement polaires ou chargés (seuls 3 acides aminés hydrophobes apparaissent, un résidu Val (code 18-H1) et deux résidus Gly (codes 6-H2 pour 18-H1)). Il est à noter une récurrence de certains résidus dans chaque position : un résidu Cys est présent en position 521 dans deux cas ; un résidu Asp est retrouvé en position 385 dans deux cas ; un résidu Gly est présent en position 462 dans deux cas. Finalement, les TK_{gst} mutées R521YH462N (code 49-A2) et R521C/S385D/H462G (code 6-H2), présentant les A_{rel} les plus élevées, respectivement 2,9 et 2,6, ont été sélectionnées.

Analyse des résultats à l'issue du second cycle de criblage en présence du D-glucose

Le second cycle de criblage réalisé en présence du D-glucose a permis de confirmer les résultats obtenus lors du premier cycle pour six puits seulement. Ce manque de reproductibilité est certainement lié aux très faibles valeurs d'absorbances obtenues en présence de ce substrat, comme indiqué précédemment lors du premier criblage, qui conduit

à une forte incertitude lors des mesures. Ces six mutants présentent des A_{rel} supérieures à 2 (Figure 66). Leur séquence a ensuite été analysée et les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 30.

TK _{gst} mutées	Séquence			A_{rel} D-glucose
	Position	521	385	
Plaqué - Puits				
Puits H12 - Témoin*	R	S	H	1
47 - B11	V	D	S	4,8
52 - H6	F	D	C	4,7
20 - C6	S	S	N	3,4
2 - A11	C	D	G	3
42 - A7**	S	-	N	2,4
45 - C12	S	D	G	3

Tableau 30 : Séquences des TK_{gst} mutées les plus actives ($A_{rel} > 2$) vis-à-vis du D-glucose
 Cases colorées en vert : TK_{gst} mutées les plus actives. *Puits H12 témoin : lysat correspondant à la TK_{gst} sauvage ($A_{rel} = 1$). **Protéine tronquée : délétion de la séquence d'acides aminés 380 à 388.

Chaque position mutée comporte majoritairement un acide aminé différent de celui de la séquence sauvage sauf dans un cas (code 20-C6 : S385S). Les nouveaux résidus sont très majoritairement polaires ou chargés (seuls 4 acides aminés hydrophobes apparaissent : un résidu Val (code 47-B11) ; un résidu Phe (code 52-H6) et deux résidus Gly (codes 2-A11 et 45-C12). De plus, une tendance se dessine, déjà observée lors de l'analyse des séquences des TK_{gst} mutées les plus actives vis-à-vis du D-ribose. En effet, un résidu Asp remplace la sérine en position 385 dans quatre cas sur six ; des résidus Gly ou Asn remplacent l'histidine en position 462, pour quatre mutants, parmi les six (Tableau 30). Il est à souligner un fait particulier : le mutant noté R521S/H462N-Δ380-388 (code 42-A7) présente une délétion de 8 acides aminés consécutifs (de la position 380 à la position 388). Pour la suite de l'étude, la TK_{gst} mutée R521V/S385D/H462S (code 47-B11), présentant l' A_{rel} la plus élevée (4,8), a été sélectionnée.

Dans le paragraphe suivant, les trois clones surexprimant les trois TK_{gst} mutées suivantes : R521Y/H462N et R521C/S385D/H462G, plus actives vis-à-vis du D-ribose et R521V/S385D/H462S, plus active vis-à-vis du D-glucose, ont été cultivés à plus grande échelle, afin de purifier les enzymes mutées correspondantes et de les caractériser plus finement.

**2.4.5.4. Etude des TK_{gst} mutées purifiées les plus performantes :
R521C/S385D/H462G, R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S**

Purification par IMAC

Après culture des souches d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS transformées puis lyse des cellules, les TK_{gst} mutées R521C/S385D/H462G, R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S, exprimées avec une étiquette 6-His en position N-terminale, ont été purifiées par chromatographie d'affinité en présence de cations métalliques (IMAC), selon le même principe que pour la purification de la TK_{gst}, présenté dans le paragraphe 1.2.2., page 72 de ce manuscrit), à température ambiante. Les masses de TK_{gst} mutées lyophilisées, obtenues à partir de 600 mL de culture, contenant en moyenn 1,4 g de cellules humides, sont récapitulées dans le Tableau 31. Les concentrations en protéines (mg.mL⁻¹) ont été déterminées par le test de Bradford [230].

TK	Volume de culture [mL]	Masse de cellules [g]	Protéines purifiées [mg]
TK _{gst} sauvage	1000	3,73	160
R521C/S385D/H462G	600	1,23	115
R521Y/H462N	600	1,58	94
R521V/S385D/H462S	600	1,32	106

Tableau 31 : Bilan de la purification par IMAC des TK_{gst} mutées R521C/S385D/H462G, R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S

Cette étape de purification a permis l'obtention d'environ 105 mg de chaque TK_{gst} mutée purifiée à partir de 600 mL de culture. Ces mutants ont été lyophilisés et conservés à -18°C sans perte d'activité durant plusieurs mois.

Détermination des activités spécifiques vis-à-vis d'aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6) à 25°C

Les activités spécifiques des mutants R521C/S385D/H462G, R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S purifiés ont été déterminées vis-à-vis du D-ribose, de configuration (2R, 3R, 4R), utilisé lors du criblage des lysats, vis-à-vis du D-xylose, qui diffère par la configuration du carbone 3 de configuration (S) et vis-à-vis du D-glucose, de configuration (2R, 3S, 4R, 5R), également utilisé lors du criblage des lysats (Figure 67).

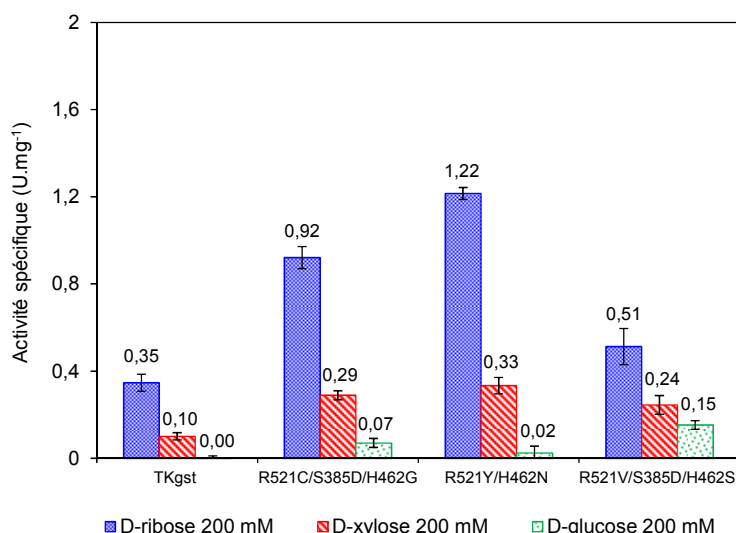


Figure 67 : Activités spécifiques de la TK_{gst} et des mutants R521C/S385D/H462G, R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S déterminées à l'aide du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} » vis-à-vis du Li-HPA (10 mM) et du D-ribose (200 mM), du D-xylose (200 mM) ou du D-glucose (200 mM) à 25°C

En présence du D-ribose, les résultats obtenus précédemment lors du criblage des lysats de la banque de TK_{gst} mutées R521X/S385X/H462X sont confirmés : les mutants R521C/S385D/H462G et R521Y/H462N sont plus actifs que la TK_{gst} sauvage vis-à-vis de ce substrat. Le mutant R521Y/H462N est le plus actif vis-à-vis de cet aldéhyde, avec une activité spécifique 3,5 fois supérieure à celle de l'enzyme sauvage. Ce résultat est plus satisfaisant que ceux décrits dans la littérature. En effet, jusqu'alors, les gains les plus élevés vis-à-vis du D-ribose ont été obtenus en présence de la TK_{eco} mutée R520Y (équivalente à la position R521 chez la TK_{gst}) et de la TK_{sce} mutée R528Q/S527T (équivalente à la position 521 chez la TK_{gst}) : ils sont respectivement de 2,1 et 2,6 par rapport à la TK sauvage. De plus, la TK_{sce} mutée R528Y est seulement 1,5 fois plus active que l'enzyme sauvage vis-à-vis de ce substrat [106], [171]. Ainsi, la présence d'un résidu Tyr à la place de l'Arg en position 521 semble influencer positivement l'activité des TK_{sce} et TK_{eco}, vis-à-vis de cet aldéhyde. Dans notre cas, le gain de 3,5 obtenu avec le mutant R521Y/H462N proviendrait donc de l'effet bénéfique de la mutation R521Y, renforcé par la mutation H462N.

En présence du D-xylose, les mutants R521C/S385D/H462G et R521Y/H462N présentent également une activité spécifique supérieure, d'un facteur 3 et 3,3 par rapport à l'enzyme sauvage, respectivement. Cependant, les activités sont respectivement 3 à 4 fois plus faibles environ qu'en présence du D-ribose.

En présence du D-glucose, la TK_{gst} mutée R521V/S385D/H462S purifiée permet d'obtenir une activité, même si celle-ci est très faible (0,15 U.mg⁻¹). Il faut noter qu'aucune activité

n'est détectée en présence de l'enzyme sauvage. Ces résultats confirment ceux obtenus lors du criblage des lysats de la banque de TK_{gst} mutées R521X/S385X/H462X.

En fonction de ces résultats, les paramètres cinétiques apparents ont été déterminés en présence des substrats et des mutants conduisant aux meilleures activités, soit la TK_{gst} mutée R521Y/H462N vis-à-vis du D-ribose. Le D-glucose ne sera pas envisagé pour l'étude suivante car les valeurs d'activités obtenues sont trop faibles et ne permettraient pas d'obtenir des valeurs fiables compte-tenu de la sensibilité du test utilisé.

Détermination des paramètres cinétiques apparents du mutant R521Y/H462N vis-à-vis du D-ribose

Les paramètres cinétiques apparents K_M^{app} et V_{max}^{app} de mutant R521Y/H462N vis-à-vis du D-ribose ont été déterminés et les résultats sont indiqués dans le Tableau 32.

Aldéhyde	TK	K_M^{app}	V_{max}^{app}	V_{max}^{app}/K_M^{app}
		[mM]	[U.mg ⁻¹]	[U.mg ⁻¹ .mM ⁻¹]
D-ribose	TK _{gst}	302,7±41,1	1,1±0,1	0,0036
	R521Y/H462N	113,3±31,6	0,7±0,2	0,0062

Tableau 32 : Paramètres cinétiques apparents du mutant R521Y/H462N vis-à-vis du D-ribose déterminés à l'aide du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} » en présence du Li-HPA (50 mM) à 25°C

La méthode de Hanes-Woolf a permis de déterminer un K_M^{app} de 113,3 ± 31,6 mM et une V_{max}^{app} de 0,7 ± 0,2 U.mg⁻¹. Le K_M^{app} du mutant R521Y/H462N est nettement inférieur à celui de la TK_{gst} sauvage vis-à-vis du D-ribose, d'un facteur 3 environ, traduisant une meilleure affinité de ce mutant pour cet aldéhyde par rapport à l'enzyme sauvage. En revanche, la V_{max}^{app} déterminée en présence du mutant R521Y/H462N est du même ordre de grandeur que celle mesurée dans le cas de la TK_{gst} sauvage. Il en résulte un rapport V_{max}^{app}/K_M^{app} environ deux fois supérieur pour le mutant R521Y/H462N par rapport à l'enzyme sauvage.

Interprétation des résultats obtenus par analyse du modèle du site actif des TK_{gst} mutées R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S

Dans le but de formuler des hypothèses quant aux activités plus élevées des mutants R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S vis-à-vis respectivement du D-ribose et du D-glucose par rapport à la TK_{gst} sauvage, nous avons analysé les interactions possibles entre ces substrats et les résidus des modèles des sites actifs de ces deux TK_{gst} mutées.

Pour cela, des modèles du site actif de la TK_{gst} mutée R521Y/H462N et de la TK_{gst} mutée R521V/S385D/H462S ont été construits en présence, respectivement, du D-ribose et du D-glucose, à partir du modèle précédemment obtenu pour la TK_{gst} sauvage (Voir paragraphe 2.2.1., page 89) et de la même manière que pour la construction du modèle de la TK_{gst} mutée L382D/D470S, présentée précédemment (Voir paragraphe 2.3.1.3., page 101). Les résultats montrent que les mutations R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S apportées à la TK_{gst}, n'entraîneraient pas de modification de la structure tertiaire du site actif (Figure 68).

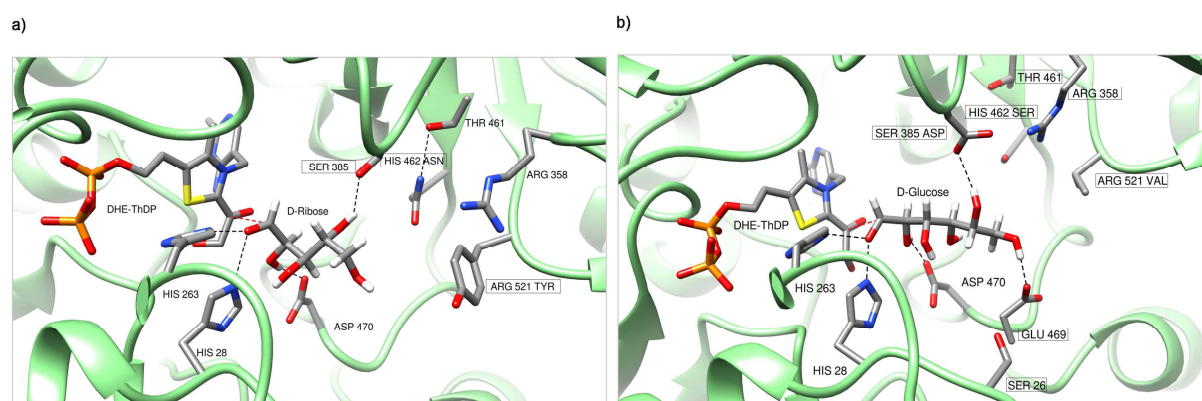


Figure 68 : Modèles des sites actifs des TK_{gst} mutées R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S en présence d'aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6). a) Modèle du site actif de la TK_{gst} mutée R521Y/H462N en présence du D-ribose. b) Modèle du site actif de la TK_{gst} mutée R521V/S385D/H462S en présence du D-glucose. Notation : exemples : ARG 521 VAL : résidu Arg remplacé par un résidu Val en position 521

Dans le cas de la TK_{gst} mutée R521Y/H462N, la fonction hydroxyle portée par le C5 du D-ribose pourrait interagir par liaison hydrogène *via* une molécule d'eau cristallographique, avec d'une part le groupement hydroxyle de la tyrosine en position 521 et d'autre part, l'oxygène du résidu Asn situé en position 462. Une troisième liaison hydrogène directe est envisageable entre la sérine en position 385 et la fonction hydroxyle du C4 du D-ribose. Ce réseau de liaisons hydrogènes serait plus favorable à la stabilisation de ce substrat par

rapport aux interactions présentes dans le site actif de la TK_{gst} sauvage, conduisant à une augmentation de l'activité observée expérimentalement (Figure 68 a)).

Dans le cas du triple mutant R521V/S385D/H462S, la présence d'une valine en position 521 à la place d'un résidu Arg permettrait d'agrandir notablement la poche du site actif, facilitant l'entrée d'un aldéhyde à 6 atomes de carbone. Le groupement hydroxyle porté par le C6 du D-glucose serait alors stabilisé par liaison hydrogène avec le résidu E469, lui-même stabilisé par la sérine en position 26. De plus, une liaison hydrogène directe est également envisageable entre la fonction hydroxyle portée par le C5 du D-glucose et le résidu Asp, substituant la sérine en position 385. Enfin, la sérine en position 462 est trop éloignée du substrat pour établir une interaction avec celui-ci. Ce résidu est stabilisé par la thréonine en position 461 et l'arginine en position 358. En conclusion, ces nouvelles interactions pourraient stabiliser le D-glucose au sein du site actif de cette TK_{gst} mutée et par conséquent, expliquer sa capacité à accepter cet aldéhyde à longue chaîne alors qu'il n'est pas substrat de la TK_{gst} sauvage (Figure 68 b)).

Etude de la thermostabilité des mutants R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S

En vue de l'utilisation des mutants R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S en synthèse, pour l'obtention à haute température de cétooses *D-thréo* (3*S*, 4*R*) à 7 et 8 atomes de carbone à l'échelle préparative, leur stabilité à 60°C a été examinée sur une durée de six jours. Les activités de ces deux mutants sont parfaitement conservées durant quatre jours à 60°C, un résultat similaire ayant été obtenu en présence de la TK_{gst} sauvage.

Par conséquent, la thermostabilité des mutants R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S durant quatre jours à 60°C, nous a permis d'envisager leur utilisation en biocatalyse à cette température, en présence respectivement du D-ribose et du D-glucose, pour la synthèse des cétooses *D-thréo* (3*S*, 4*R*) correspondants à 7 et 8 atomes de carbone, le D-sédoheptulose et le D-*glycéro-D-ido*-octulose, décrite dans le chapitre suivant (Voir paragraphe 3.2.3.).

2.4.6. Conclusions

La stratégie basée sur la mutation simultanée des trois résidus clés identifiés par modélisation moléculaire a été plus bénéfique que la stratégie consistant à muter deux à deux les résidus, pour la recherche de TK_{gst} mutées plus actives que la TK_{gst} sauvage vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6).

Le criblage de la banque R521X/S385X/H462X a permis de mettre en évidence le mutant R521Y/H462N, 3,5 fois et 3,3 fois plus actif que l'enzyme sauvage vis-à-vis respectivement du D-ribose et du D-xylose. Il est à noter qu'un tel gain d'activité n'a jusqu'alors pas été mentionné dans la littérature vis-à-vis du D-ribose [106], [171]. De plus, ce mutant présente un K_M de 113,3 ± 31,6 mM vis-à-vis du D-ribose, trois fois inférieur environ à celui de la TK_{gst} sauvage. Ce résultat confirme la meilleure affinité de ce double mutant pour cet aldéhyde, en comparaison de la TK_{gst} sauvage. Par ailleurs, le mutant R521V/S385D/H462S permet d'obtenir une activité vis-à-vis du D-glucose, tandis qu'aucune activité n'est détectée en présence de l'enzyme sauvage. Finalement, les mutants R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S étant thermostables, ils seront utilisés pour la synthèse des cétooses de configuration D-*thréo* (3S, 4R) correspondants à 7 et 8 atomes de carbone. Les synthèses de ces composés seront présentées dans la suite du manuscrit (Voir paragraphe 3.2.2. du chapitre suivant).

2.5. Augmentation de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes aliphatiques linéaires et aromatiques

Ce projet, réalisé en partenariat avec le Pr. W.-D. Fessner et son équipe, a fait l'objet de deux publications en 2017 dans les journaux *ChemBioChem* et *Green Chemistry* et dans lesquelles je suis co-auteur [238], [239]. Ces articles sont donnés en annexes de ce manuscrit.

2.5.1. Augmentation de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes aliphatiques linéaires

Dans le cadre de cette étude, deux nouvelles banques de TK_{gst} mutées ont été créées : L191X/D470X et F435X/D470X. Le résultat le plus marquant de cette étude est obtenu avec le mutant L191V/D470I, qui se distingue de par son activité environ 6 fois supérieure à celle

de la TK_{gst} vis-à-vis du propanal, mais surtout par une stéréosélectivité inversée par rapport à l'enzyme sauvage. Celui-ci permet en effet d'accéder à la 1,3-dihydroxypentan-2-one avec un rendement de 58% et un ee de 74% en faveur du produit (3*R*), une configuration inaccessible avec la TK_{gst} sauvage [239].

2.5.2. Augmentation de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes aromatiques

La banque de TK_{gst} mutées L382X/D470X, construite et criblée précédemment vis-à-vis du L-glycéraldéhyde, a également été exploitée dans l'optique d'améliorer l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes aliphatiques linéaires [175] et aromatiques [238]. Ma contribution dans ces travaux a porté sur le criblage de cette banque de TK_{gst} mutées vis-à-vis d'un panel d'aldéhydes aromatiques, lors d'une mission que j'ai eu l'opportunité de réaliser dans l'équipe du Pr. W.-D. Fessner (Université Technique de Darmstadt) en Allemagne.

Les doubles mutants L382N/D470S et L382F/D470S présentent des activités spécifiques significativement plus élevées que celles de la TK_{gst} sauvage vis-à-vis du panel d'aldéhydes aromatiques testés, incluant le benzaldéhyde et des analogues du benzaldéhyde (gains d'activité compris entre 4,5 et 19). Ceux-ci ont par la suite été utilisés en biocatalyse, pour la synthèse efficace à haute température des produits correspondants. Ces derniers ont été obtenus avec des rendements compris entre 50% et 73% et des ee supérieurs à 98% [238].

2.6. Augmentation de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis d'un substrat donneur « modèle » : l'acide pyruvique

Comme nous l'avons vu précédemment, la TK_{gst} est capable d'utiliser l'acide pyruvique comme substrat donneur, au contraire des autres TKs microbiennes décrites dans la littérature. Néanmoins, l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis de cet α -cétoacide est très faible, *i.e.* 0,02 U.mg⁻¹). De plus, le 1-désoxy-L-érythrose **12** est obtenu avec un rendement de 20% seulement à l'échelle préparative, à partir de l'acide pyruvique et du glycolaldéhyde, utilisé comme substrat accepteur. Ainsi, dans le cadre du projet ANR ThermoTK, il a été envisagé d'améliorer l'affinité de cette enzyme vis-à-vis de ce nouveau donneur et d'analogues par Evolution dirigée. Le groupe du Pr. W.-D. Fessner a pris en charge cet aspect, qui a donné lieu à une publication en 2017 dans le journal *Angewandte Chemie* à laquelle je suis associée et qui est donnée en annexe de ce manuscrit [234]. J'ai participé au criblage des

banques de TK_{gst} mutées construites à cet effet, durant la visite de M.-L. Reif, doctorante dans le groupe du Pr. W.-D. Fessner, au sein du groupe du Pr. L. Hecquet.

Quatre résidus du site actif de la TK_{gst}, interagissant avec le groupement CH₂OH du Li-HPA, ont été ciblés à cet effet : les acides aminés H68, H102, H474 et G116. Il est important de rappeler que, comme nous l'avons vu précédemment, les résidus correspondants H69, H103, H481 et G116 chez la TK_{sce}, sont impliqués dans la liaison aux cofacteurs, le ThDP et le Mg²⁺ [245]. De plus, les résidus H103 et H481 jouent également un rôle clé dans le mécanisme catalytique de la TK_{sce} [77], [97], [94].

Les deux mutants H102L/H474S et H102T sont les plus actifs vis-à-vis de l'acide pyruvique et de deux de ses analogues, l'acide 2-oxo-butanoïque et l'acide 3-méthyl-2-oxobutanoïque (gains d'activité compris entre 10 et 35). Ils ont ensuite été employés en biocatalyse, pour la synthèse des produits correspondants à l'échelle préparative et à haute température, en présence du glycolaldéhyde comme substrat accepteur. De très bons rendements, compris entre 69% et 88% et d'excellents ee en faveur de la formation du produit (3S) ont été obtenus.

L'élargissement du spectre de substrats donneurs de la TK par Evolution dirigée n'avait jusqu'alors jamais été décrit dans la littérature. Cette étude a conduit à une amélioration significative de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis de l'acide pyruvique, non converti par les autres TKs microbiennes utilisées en biocatalyse. De surcroît, ces travaux ont permis d'étendre le spectre de substrats donneurs de la TK_{gst} sauvage à l'acide 2-oxo-butanoïque et à l'acide 3-méthyl-2-oxobutanoïque. Les cétooses correspondants, innaccessibles avec l'enzyme sauvage, ont été synthétisés à l'échelle préparative avec de très bons rendements et d'excellents ee en faveur du produit (3S).

2.7. Conclusions

Les stratégies que nous avons développées ont permis de mettre en évidence de nouvelles TK_{gst} mutées performantes vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2S) et des aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6). Celles-ci ont été produites, purifiées puis caractérisées à l'échelle analytique (Tableau 33).


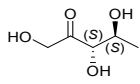

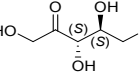

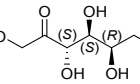

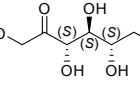

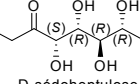

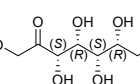

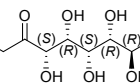
Aldéhydes	Cétooses	Banque de TK _{gst} mutées	TK _{gst} mutées	Gain d'activité*
 L-lactaldéhyde	 5-désoxy-L-ribulose 4	L382X/D470X	L382D/D470S	4
 L-glycéraldéhyde	 L-ribulose 3	L382X/D470X L191X/F435X	L382D/D470S L191I	5 4
 D-thréose	 D-tagatose 5	L382X/F435X	L382F/F435Y	3,6
 L-érythrose	 L-psicose 6	L382X/F435X	L382F/F435Y	3,7
 D-ribose	 D-sédoheptulose 9		R521Y/H462N	3,5
 D-xylose	 D-ido-heptulose 10	R521X/S385X/H462X	R521Y/H462N	3,3
 D-glucose	 D-glycéro-D-ido-octulose 11		R521V/S385D/H462S	Act. spé.: 0,15 U.mg ⁻¹ Non converti par la TK _{gst} sauvage

Tableau 33 : Gains d'activité obtenus avec les TK_{gst} mutées les plus performantes vis-à-vis d'aldéhydes α-hydroxylés (2S) et d'aldéhydes α-hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6). *Gain par rapport à la TK_{gst} sauvage.

Les TK_{gst} mutées indiquées dans le Tableau 33 seront utilisées en présence des substrats appropriés pour synthétiser à haute température les cétooses L-érythro (3S, 4S) et les cétooses de configuration D-thréo (3S, 4R) à 7 et 8 carbones correspondants. Le mutant L382F/F435Y sera employé pour la synthèse du D-tagatose uniquement. En effet, son activité vis-à-vis du L-érythrose est plus faible que celle déterminée vis-à-vis du D-thréose. De même, le mutant R521Y/H462N sera utilisé pour la synthèse du D-sédoheptulose seulement, une activité moindre ayant été mesurée en présence du D-xylose, par rapport au D-ribose. Ces travaux font l'objet du chapitre suivant.

L'ensemble des résultats présentés dans le chapitre intitulé « *Modification de la spécificité de substrats de la TK_{gst} par Evolution dirigée* » et développés dans les paragraphes 2.3. et 2.4, feront l'objet d'une publication, actuellement en cours de rédaction, incluant l'utilisation des TK_{gst} mutées les plus performantes en biocatalyse, décrite par la suite.

Les synthèses en présence des TK_{gst} mutées les plus actives vis-à-vis des aldéhydes aliphatiques et aromatiques mais également vis-à-vis du nouveau substrat donneur, l'acide pyruvique et d'analogues, ne seront pas décrites ni commentées dans ce manuscrit car je n'ai pas participé à leur réalisation. Ces synthèses sont décrites dans les publications correspondantes données en annexe.

3. Applications de la TK_{gst} sauvage et des TK_{gst} mutées à la synthèse de cétooses rares d'intérêt biologique

L'objectif est ici d'utiliser la TK_{gst} sauvage et les TK_{gst} mutées les plus performantes identifiées précédemment, en présence des aldéhydes accepteurs appropriés et du Li-HPA comme substrat donneur, pour obtenir les cétooses correspondants à l'échelle préparative (de l'ordre de la centaine de mg). L'intérêt d'utiliser la TK_{gst}, dont la température optimale se situe aux alentours de 70°C [60], est de pouvoir réaliser les synthèses à haute température, permettant d'augmenter l'activité de cette enzyme vis-à-vis de substrats peu convertis à température ambiante, tout en diminuant les temps réactionnels.

Afin d'optimiser les réactions catalysées par la TK_{gst} à haute température, plusieurs aspects ont été envisagés dans cette partie. L'influence des conditions réactionnelles sur la stabilité des substrats et plus particulièrement celle du substrat donneur, le Li-HPA, a tout d'abord été étudiée, pour ensuite réaliser les synthèses en présence de la TK_{gst} sauvage et des TK_{gst} mutées les plus performantes dans les meilleures conditions.

Puis dans le but d'améliorer les rendements, tout en privilégiant l'utilisation de composés peu coûteux et naturels, des réactions en cascade ont été développées. Les enzymes auxiliaires utilisées ont en effet permis de générer certains substrats. Le HPA a été obtenu à partir de la sérine, dans le but de s'affranchir de sa synthèse chimique toxique et peu efficace, mais également pour limiter son temps de résidence dans le milieu à haute température. De plus, les aldéhydes α -hydroxylés (2S) à 3 et 4 atomes de carbone, des composés commerciaux très coûteux, ont été produits à partir de précurseurs achiraux plus abordables.

3.1. Influence des conditions réactionnelles sur la stabilité des substrats à haute température

3.1.1. Stabilité du Li-HPA

Le Li-HPA est le substrat donneur clé, car il rend la réaction catalysée par la TK_{gst} irréversible. Ainsi, son utilisation est d'un intérêt majeur pour des applications en synthèse. Cependant, le verrou à lever pour que les synthèses à température élevée en présence de ce substrat soient efficaces et transposables à plus grande échelle, concerne sa stabilité. Plusieurs paramètres influençant la stabilité de ce composé à haute température ont été

étudiés : le tampon, le pH, la température et la concentration en cofacteurs, le ThDP et le Mg^{2+} .

3.1.1.1. Etudes antérieures

Depuis les premières applications de la TK en biocatalyse, le HPA, sous forme de sel de lithium, est très majoritairement utilisé par tous les groupes s'intéressant à cette enzyme. En effet, le Li-HPA est commercialisé à moindre coût, en comparaison de la forme acide de ce composé ou des sels de sodium ou de potassium. De plus, il est aisément obtenu par voie chimique à partir de l'acide bromopyruvique, qui est hydrolysé en présence d'hydroxyde de lithium [101]. La quantification du Li-HPA est réalisée à partir de prélèvements du milieu d'incubation effectués au cours du temps. La concentration de ce composé est déterminée *via* le dosage enzymatique en présence de la L-lactate déshydrogénase (L-LDH) et du cofacteur NADH, tel que décrit dans le paragraphe 2.2.4.2. de la *Partie Expérimentale*.

L'instabilité du Li-HPA en milieu tamponné a tout d'abord été décrite à 25°C [112], [113], puis à des températures plus élevées, travaux menés par notre groupe [60] (Figure 69).

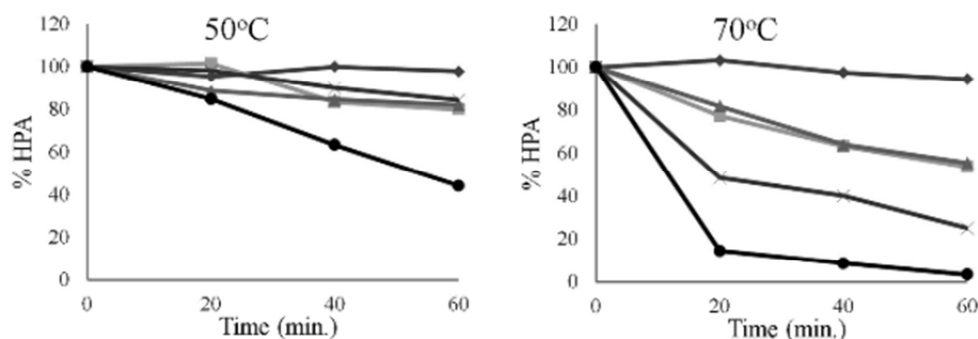


Figure 69 : Etude de la stabilité du Li-HPA dans l'eau et en présence de différents tampons à 50°C et 70°C. ♦ Eau pure ▲ Tampon Gly-gly ■ Tampon TEA x Tampon KH_2PO_4 ● Tampon HEPES
Figures extraites de la littérature [60].

Parmi les tampons testés, le tampon Gly-gly conduit à la plus faible dégradation du Li-HPA. Cependant, après seulement une heure à 50°C et 70°C, 20% et 40% de la quantité initiale de ce composé est dégradée, respectivement.

Compte-tenu de ces résultats, l'utilisation d'un tampon à haute température pour maintenir le pH constant au cours du temps a donc été écartée. Les études de stabilité réalisées dans l'eau pure montrent en revanche une parfaite stabilité du Li-HPA à 50°C et 70°C durant une

heure [60]. Ainsi, les premières synthèses réalisées au laboratoire en présence de la TK_{gst}, du Li-HPA et des aldéhydes accepteurs, ont été réalisées à 50°C, en milieu aqueux non tamponné, le pH étant ajusté en continu à 7,5 grâce à l'utilisation d'un pH-stat. A 50°C, l'activité de la TK_{gst} correspond à 69% de l'activité maximale mesurée à 70°C. De plus, à pH 7,5, l'activité de la TK_{gst} représente 97% de son activité à pH 7, son pH optimal. Enfin, des concentrations respectives en ThDP et Mg²⁺ de 2,4 mM et 9 mM ont été utilisées. Ces concentrations sont en effet les plus souvent employées dans la littérature, pour des applications de la TK en synthèse [139].

Il nous a semblé important d'approfondir ces premières études de stabilité du Li-HPA dans l'eau pure à haute température sur des durées plus longues, en déterminant l'influence de différents paramètres.

3.1.1.2. Etude de la stabilité du Li-HPA dans l'eau pure

Les études réalisées en présence du Li-HPA, de 2,4 mM de ThDP et de 9 mM de Mg²⁺, en l'absence d'aldéhyde et de la TK_{gst} et à pH 7,5, montrent une forte décomposition à 50°C : 30% et 50% environ de la quantité initiale de ce composé sont dégradés après respectivement 4 heures et 8 heures d'incubation (Figure 70). De plus, après 24 heures, le Li-HPA est dégradé en totalité. Il est à noter qu'en présence de la TK_{gst}, un profil similaire est observé. Il s'agirait donc d'une dégradation chimique du Li-HPA, indépendante de la présence de l'enzyme. D'autres contre-ions (sodium et potassium) en remplacement du lithium ont été testés, conduisant à des résultats similaires.

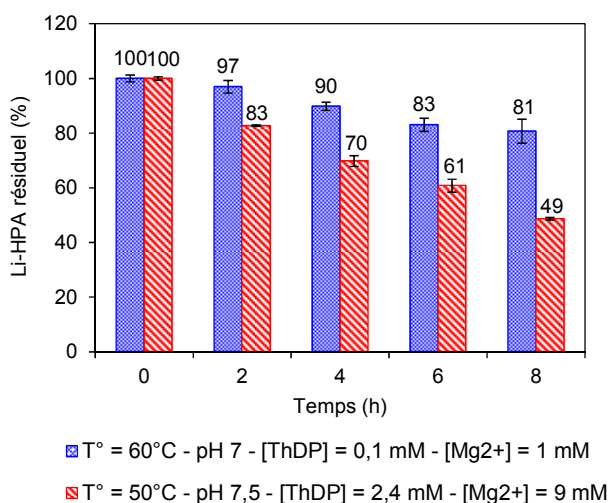


Figure 70 : Stabilité du Li-HPA dans l'eau pure à 50°C ou 60°C, à pH 7 ou 7,5, en présence de 0,1 ou 2,4 mM de ThDP et 1 ou 9 mM de Mg²⁺. 100% du Li-HPA correspond à une concentration initiale de 50 mM.

Afin de minimiser la dégradation du Li-HPA à haute température dans l'eau pure, l'influence de différents paramètres sur la stabilité de cet α -cétoacide ont été étudiés indépendamment : la température, le pH et les concentrations des cofacteurs de la TK_{gst}.

Influence de la température. Pour cette étude, la température a été fixée à 60°C. A cette température, la dégradation du Li-HPA n'est pas significativement plus importante qu'à 50°C. De plus, l'activité de la TK_{gst} à 60°C est supérieure à celle mesurée à 50°C (83% de son activité maximale contre 69 % à 50°C, par rapport à celle mesurée à 70°C) et est parfaitement conservée durant quatre jours. Enfin, une température de 60°C permet de s'affranchir de la chute drastique de l'activité de l'enzyme au-delà de 70°C.

Influence du pH. Une dégradation marquée du Li-HPA à pH basique à haute température a été observée, un résultat similaire ayant été décrit dans la littérature [246], [247]. Ainsi, un pH de 7 a été sélectionné, le pH optimal de la TK_{gst}.

Influence des cofacteurs. Enfin, il apparaît que les cofacteurs ThDP et Mg²⁺ ont une influence négative sur la stabilité du Li-HPA à haute température. Ainsi, leurs concentrations respectives ont été diminuées, tout en s'assurant que l'activité de la TK_{gst} ne soit pas affectée. Une concentration en ThDP de 0,1 mM et une concentration en Mg²⁺ de 1 mM ont été retenues. Dans ces conditions, l'activité de la TK_{gst} est conservée et est même de surcroît légèrement supérieure.

Dans ces nouvelles conditions optimisées, c'est-à-dire à 60°C, à pH 7 et en présence de 0,1 mM de ThDP et 1 mM de Mg²⁺, une amélioration significative de la stabilité du Li-HPA est constatée (Figure 70). Après 8 heures, 81% de la quantité initiale du Li-HPA est présente dans le milieu, contre 49% dans les conditions initiales, soit une dégradation de 2,6%/heure par rapport à 6,2 %/heure avant optimisation. De plus, dans les conditions optimisées, 47% et 24% de la quantité de Li-HPA initialement introduite sont encore en solution après 24 heures et 48 heures, respectivement. Dans ces conditions, l'activité de la TK_{gst} est stable sur une durée de 4 jours et représente 83% de l'activité maximale mesurée à 70°C. Ces conditions expérimentales optimisées ont été employées pour la majorité des synthèses enzymatiques catalysées par la TK_{gst} sauvage et les TK_{gst} mutées, décrites dans la suite de ce manuscrit.

En s'appuyant sur les résultats décrits dans la littérature, plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette dégradation. L'équipe des Pr. D. B. Sprinson et E. Chargaff (Etats-Unis) a observé qu'en milieu basique, l'abstraction du proton acide en position α de la

fonction cétone du Li-HPA conduit à la formation du motif *cis*-ènediolate [248]. D'autres travaux, conduits par le groupe des Pr. F. Dickens et D. H. Williamson (Royaume-Uni), ont montré une décarboxylation du Li-HPA à haute température et en milieu basique, menant à la libération d'ions HCO_3^- et à la formation de glycolaldéhyde, qui se condenserait sur lui-même selon une réaction d'aldolisation, pour conduire au D,L-érythrose comme produit de dégradation majoritaire [247].

Pour notre part, les milieux d'incubation du Li-HPA dans l'eau pure ont été analysés par RMN ^1H dans les conditions optimisées et non optimisées. Dans les deux cas, l'acide glycolique a été identifié comme produit de dégradation majoritaire, sa concentration étant significativement inférieure dans les conditions réactionnelles optimisées. De plus, du D,L-érythrose a également été détecté mais à l'état de traces. Nous avons émis une hypothèse quant à la formation de l'acide glycolique, à pH 7,5, en présence des cofacteurs de la TK_{gst} , le ThDP et le Mg^{2+} et à haute température (Figure 71).

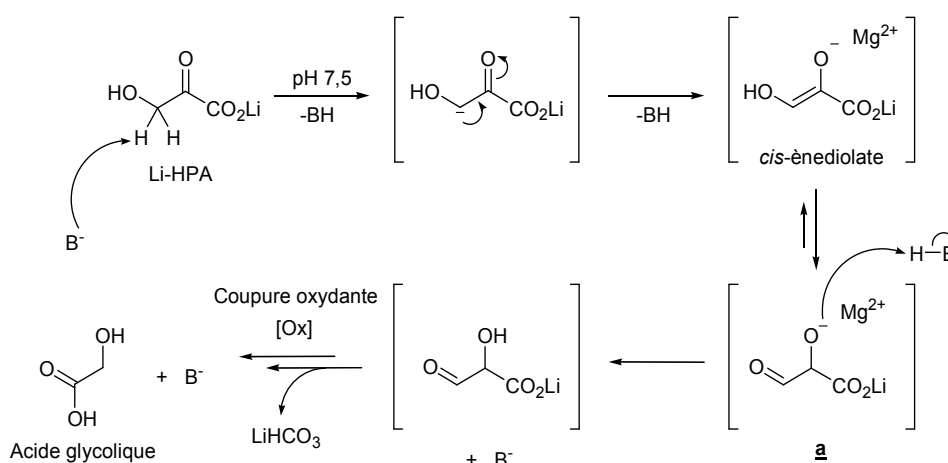


Figure 71 : Proposition d'un mécanisme de formation de l'acide glycolique comme produit de dégradation du Li-HPA dans l'eau pure à pH 7,5 en présence du ThDP et du Mg^{2+} et à haute température

A pH 7,5, le proton acide en α de la fonction carbonyle du Li-HPA pourrait être arraché, pour conduire au motif *cis*-ènediolate, une réaction décrite par l'équipe des Pr. D. B. Sprinson et E. Chargaff [248], potentiellement stabilisé par la présence des ions Mg^{2+} . Le composé intermédiaire a, en équilibre avec la forme *cis*-ènediolate, pourrait ensuite subir une coupure oxydante puis une réaction de décarboxylation à haute température, aboutissant à la formation de l'acide glycolique et des ions HCO_3^- , la formation de ces ions ayant été observée par le groupe des Pr. F. Dickens et D. H. Williamson [247].

3.1.2. Stabilité des aldéhydes accepteurs

La stabilité des aldéhydes à courte chaîne (C2-C3) a été examinée par RMN ^1H dans les conditions expérimentales optimisées et une dégradation inférieure à 10% a été déterminée en 24 heures. De plus, la stabilité des aldoses à 4, 5 et 6 atomes de carbone à haute température a largement été montrée dans le cadre de réactions d'isomérisation enzymatique ou chimique, en présence de bases ou d'acides de Lewis [249], [250], [251].

3.2. Synthèse de cétooses rares catalysée par la TK_{gst} sauvage et les TK_{gst} mutées

3.2.1. Introduction

Les conditions réactionnelles optimales pour la réalisation des synthèses à 60°C ayant été déterminées, l'objectif est ici de synthétiser à l'échelle préparative des cétooses d'intérêt biologique, incluant des cétooses rares (Tableau 34 et Tableau 35), à partir des aldéhydes appropriés comme substrats accepteurs et du Li-HPA comme substrat donneur, en présence de la TK_{gst} sauvage et des TK_{gst} mutées les plus performantes, identifiées précédemment.

Glycolaldéhyde - Aldéhydes α -hydroxylés (2R)	Cétooses (3S) et D-thréo (3S, 4R)	TK	Applications	Ref.
Glycolaldéhyde	L-érythrose 1	TK _{gst} sauvage	Agent autobronzant	Brevet*
D-glycéraldéhyde	D-xylulose 2	TK _{gst} sauvage	Activités thérapeutiques	[211]
D-érythrose	D-fructose 7	TK _{gst} sauvage	Edulcorant	[252], [253]
L-thréose	L-sorbose 8	TK _{gst} sauvage	Précurseur de la vitamine C	[8]
D-ribose	D-sédoheptulose 9	TK _{gst} sauvage R521Y/H462N	Marqueur de pathologies liées aux sucres	[21], [22]
D-xylose	D-ido-heptulose 10	TK _{gst} sauvage	Précurseur du D-ido-heptulose-7-P	[23], [24]
D-glucose	D-glycéro-D-ido-heptulose 11	R521V/S385D/H462S	Propriétés antioxydantes	[25] [26]

Tableau 34 : Applications des cétooses (3S) et D-thréo (3S, 4R) synthétisés avec la TK_{gst} sauvage et/ou les TK_{gst} mutées les plus performantes. * Brevet : US 6451293

Aldéhydes α -hydroxylés (2S)	Cétooses L-érythro (3S, 4S)	TK	Applications	Ref.
L-glycéraldéhyde	L-ribulose 3	TK _{gst} sauvage L382D/D470S L191	Propriétés antivirales et antitumorales	[15], [16]
L-lactaldéhyde	5-désoxy-L-ribulose 4	TK _{gst} sauvage L382D/D470S	Précurseur de monosaccharides rares	[11]
D-thréose	D-tagatose 5	TK _{gst} sauvage L382F/F435Y	Edulcorant, antidiabétique	[254]
L-érythrose	L-psicose 6	TK _{gst} sauvage	Propriété antivirale Précurseur du L-fructose	[8], [240]

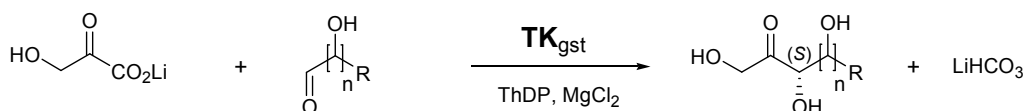
Tableau 35 : Applications des cétooses L-érythro (3S, 4S) synthétisés avec la TK_{gst} sauvage et/ou les TK_{gst} mutées les plus performantes

Dans ce paragraphe, les taux de conversion et les rendements obtenus avec la TK_{gst} sauvage et les TK_{gst} mutées les plus performantes seront comparés. Les conditions réactionnelles, la détermination des taux de conversion des substrats, la purification des produits et la détermination des rendements et enfin, l'étude de la stéréochimie des produits, sont similaires pour toutes les synthèses décrites (Voir *Partie Expérimentale*).

3.2.2. Synthèse de cétooses (3S) et D-thréo (3S, 4R) catalysée par la TK_{gst} sauvage et les TK_{gst} mutées

Les cétooses de configuration (3S) et de configuration D-thréo (3S, 4R), comportant de 4 à 7 atomes de carbone, peuvent être obtenus à partir du glycolaldéhyde et d'aldéhydes α -hydroxylés (2R) polyhydroxylés (C3-C5), identifiés comme substrats accepteurs de la TK_{gst} sauvage à l'échelle analytique. Certains d'entre eux ont déjà été synthétisés avec d'autres sources de TKs. Toutefois, l'intérêt ici est de diminuer les temps réactionnels en travaillant à haute température et d'augmenter les rendements finaux, grâce à l'utilisation de TK_{gst} mutées performantes.

Les résultats obtenus avec la TK_{gst} sauvage et les TK_{gst} mutées en présence du glycolaldéhyde et de six aldéhydes α -hydroxylés (2R) polyhydroxylés (C3-C6) sont indiqués dans le Tableau 36.



Li-HPA $n = 1 - R = H$: Glycolaldéhyde $n = 1 - R = H$: L-érythrose
 $n = 1 - 4 - C_2(R)$: Aldéhydes α -hydroxylés (2R) $n = 1 - 4 - C_4(R)$: Cétoses D-*thréo* (3S, 4R)

Glycolaldéhyde - Aldéhydes α -hydroxylés (2R)	Cétoses (3S) et D- <i>thréo</i> (3S, 4R)	Taux de conversion des aldéhydes [%] ¹		Temps réactionnel [h]		Rendement [%]		ed^2 [%]	
		TK _{gst} sauvage	TK _{gst} mutée	TK _{gst} sauvage	TK _{gst} mutée	TK _{gst} sauvage	TK _{gst} mutée	TK _{gst} sauvage	TK _{gst} mutée
		> 99	-	0,3	-	44	-	> 95	-
		> 99	-	0,5	-	87	-	> 95	-
		> 99	-	1	-	77	-	> 95	-
		> 99	-	5	-	57	-	> 95	-
		66	> 99 ³	24	24 ³	44	67 ³	> 95	> 95 ³
		52	-	35	-	21	-	> 95	-
		-	> 90 ⁴	-	168 ⁴	-	nd	-	> 95 ⁴

Tableau 36 : Synthèses de cétoses (3S) et D-*thréo* (3S, 4R) catalysées par la TK_{gst} sauvage et les TK_{gst} mutées les plus performantes à 60°C. ¹ Déterminés par RMN ¹H *in situ* en présence d'un étalon interne (TSP-d₄). ² Déterminés par RMN ¹³C. ³ Mutant R521Y/H462N. ⁴ Mutant R521V/S385D/H462S.

Analyse des résultats obtenus avec la TK_{gst} sauvage

- Taux de conversion et rendements

Tous les produits attendus ont été obtenus avec des taux de conversion des aldéhydes allant de 52% à 99%. Les aldéhydes à courte chaîne (C2-C4), tels que le glycolaldéhyde, le D-glycéraldéhyde, le L-thréose et le D-érythrose, conduisent aux meilleurs taux de conversion, un résultat en accord avec les études réalisées à l'échelle analytique. Ces aldéhydes sont totalement convertis avec des temps réactionnels compris entre 20 minutes et 5 heures, qui augmentent avec l'allongement de la chaîne carbonée des substrats. Les aldéhydes comportant 5 atomes de carbone, le D-ribose et le D-xylose, ne sont pas totalement convertis après respectivement 24h et 35h de réaction. Ces résultats corroborent ceux obtenus à l'échelle analytique et mettent en relief le rôle non négligeable de la configuration (*R*) du C3 du D-ribose, plus favorable que la configuration (*S*) du C3 du D-xylose. Il est à signaler que les aldéhydes comportant 6 atomes de carbone ayant montré de très faibles, voire aucune activité à l'échelle analytique à 25°C, n'ont conduit effectivement à la formation d'aucun produit correspondant (cas du D-glucose) ou bien à l'état de traces (cas du D-allose), dans les conditions de synthèse utilisées ici, c'est-à-dire à 60°C.

Globalement, les rendements obtenus après purification (de 21% à 87%) suivent l'ordre donné par les taux de conversion. Cependant, un rendement bien supérieur à 44% était attendu pour le L-érythrulose **1**. Ce résultat peut être expliqué par la difficulté à purifier ce produit par chromatographie sur colonne de gel de silice, comparativement aux autres composés. Malgré l'utilisation d'un éluant polaire, il est difficile d'éluer la totalité du composé déposé sur la colonne.

Les six cétooses obtenus sont des composés déjà décrits et synthétisés *via* l'utilisation d'autres sources de TK, mais également selon d'autres voies enzymatiques ou chimiques. La thermostabilité de la TK_{gst} permet ici de conduire à des synthèses plus efficaces compte-tenu de la température élevée. De plus, la quantité d'enzyme utilisée est ici nettement plus faible (6 mg) qu'en présence des autres sources de TK et pour l'obtention des mêmes produits [109], [255].

- Stéréosélectivité

Pour toutes les synthèses réalisées, un seul diastéréoisomère a été identifié par RMN ¹³C (excès diastéréoisomériques ou *ed* supérieurs à 95%) et la mesure des pouvoirs rotatoires

des produits purifiés a permis de confirmer la pureté optique des composés par comparaison avec les valeurs données dans la littérature. La stéréosélectivité conduisant à une configuration (3S) du cétose, déjà démontrée par notre groupe [60], est confirmée ici dans tous les cas.

Analyse des résultats obtenus avec les TK_{gst} mutées

- Taux de conversion et rendements

En présence du D-ribose, le mutant R521Y/H462N, présentant une activité spécifique 3,5 fois supérieure à celle de l'enzyme sauvage, a été utilisé pour synthétiser le D-sédoheptulose **9** à l'échelle préparative à 60°C. Une conversion complète du D-ribose et du Li-HPA a été observée en 24 heures, seulement 66% du D-ribose étant converti sur une même durée avec la TK_{gst} sauvage. Le D-sédoheptulose **9** a été obtenu avec un rendement de 67%, 1,5 fois supérieur à celui déterminé en présence de l'enzyme sauvage.

Le D-glucose a été employé comme substrat accepteur de la TK_{gst} et du mutant R521V/S385D/H462S, pour synthétiser le produit correspondant, le D-glycero-D-ido-octulose **11**, à l'échelle préparative. A l'échelle analytique, aucune activité n'a été détectée en présence de la TK_{gst} sauvage vis-à-vis de cet aldéhyde, alors qu'une activité de 0,15 U.mg⁻¹ a été mesurée en présence du triple mutant. Malgré l'utilisation de quatre équivalents de Li-HPA, aucun nouveau produit n'a été détecté dans le cas de l'utilisation de la TK_{gst} sauvage. En revanche, en présence du mutant R521V/S385D/H462S, l'analyse des spectres de RMN ¹H réalisés au cours du temps a révélé la formation d'un nouveau produit. Une durée de sept jours et l'ajout de quatre équivalents de Li-HPA ont été nécessaires pour convertir en quasi-totalité (>90%) le D-glucose. L'étape de purification ne nous a malheureusement pas permis de séparer le D-glucose non converti du D-glycero-D-ido-octulose **11** formé et donc de calculer un rendement. Néanmoins, les signaux caractéristiques de cet octulose ont été identifiés par RMN ¹³C et notamment le déplacement chimique du carbone anomérique d'une des formes cycliques de ce monosaccharide, aux alentours de 100 ppm (Voir *Partie Expérimentale*). La synthèse et la purification de cet octulose restent toutefois à optimiser.

- Stéréosélectivité

L'obtention d'un *ed* supérieur à 95% et la comparaison des pouvoirs rotatoires expérimentaux et théoriques, ont confirmé une stéréosélectivité du mutant R521Y/H462N

identique à celle de la TK_{gst} sauvage, menant à une configuration (3S) du cétose formé. De plus, l'analyse du spectre de RMN ¹³C du mélange {D-glucose/D-glycéro-D-ido-octulose} a permis de déterminer un *ed* supérieur à 95%.

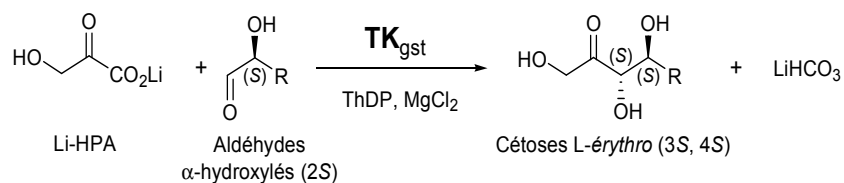
Par conséquent, les résultats obtenus à l'échelle analytique avec les mutants R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S sont confirmés ici à l'échelle préparative. Le mutant R521Y/H462N a permis la synthèse efficace du D-sédoheptulose **9** à l'échelle préparative, *via* la conversion rapide du D-ribose et l'obtention d'un meilleur rendement que celui déterminé en présence de la TK_{gst} sauvage. De plus, le mutant R521V/S385D/H462S permet, au contraire de la TK_{gst} sauvage, de convertir le D-glucose, pour obtenir à l'échelle préparative le produit correspondant, le D-glycéro-D-ido-octulose **11**. Toutefois, l'affinité de ce mutant vis-à-vis du D-glucose reste très faible, conduisant à une cinétique de conversion de cet aldéhyde très lente et la nécessité d'ajouter plusieurs équivalents de Li-HPA pour le convertir en quasi-totalité.

3.2.3. Synthèse de cétooses L-érythro (3S, 4S) catalysée par la TK_{gst} sauvage et les TK_{gst} mutées

Les cétooses L-érythro (3S, 4S) décrits ici n'ont jamais été obtenus avec les TKs communément utilisées en biocatalyse, que ce soit la TK_{eco} ou la TK_{sce}. Celles-ci acceptent en effet exclusivement les aldéhydes α -hydroxylés de configuration (2R). En revanche, nous avons montré précédemment à l'échelle analytique, que les aldéhydes α -hydroxylés (2S) à 3 et 4 atomes de carbone, *i.e* le L-glycéraldéhyde, le L-lactaldéhyde, le D-thréose et le L-érythro, conduisent à des activités de la TK_{gst}, augmentées d'un facteur 4 à 5 à 60°C par rapport à celles obtenues à 25°C. Toutefois, les activités mesurées restent faibles et de nouvelles TK_{gst} mutées ont été identifiées à l'échelle analytique, présentant des gains d'activité significatifs par rapport à la TK_{gst} sauvage vis-à-vis de ces aldéhydes.

L'objectif est ici d'obtenir à 60°C les produits correspondants à l'échelle préparative, soit le L-ribulose **3**, le 5-désoxy-L-ribulose **4**, le D-tagatose **5** et le L-psicose **6**, *via* l'utilisation de la TK_{gst} sauvage et de comparer les résultats à ceux obtenus avec les trois TK_{gst} mutées les plus performantes, identifiées dans le chapitre précédent.

Les résultats obtenus en présence de la TK_{gst} sauvage et des TK_{gst} mutées sont présentés dans le Tableau 37.



Aldéhydes α -hydroxylés (2S)	Cétoses L-érythro (3S, 4S)	Taux de conversion des aldéhydes α -hydroxylés (2S) [%] ¹		Temps réactionnel [h]		Rendement [%]		ed^2 [%]	
		TK _{gst} sauvage	TK _{gst} mutée	TK _{gst} sauvage	TK _{gst} mutée	TK _{gst} sauvage	TK _{gst} mutée	TK _{gst} sauvage	TK _{gst} mutée
		> 99	> 99 ³ > 99 ⁴	24	7 ³ 12 ⁴	11-56	55 ³ 68 ⁴	> 95	> 95 ³ > 95 ⁴
		> 99	> 99 ³	24	17 ³	33-97	63 ³	> 95	> 95 ³
		24	> 95 ⁵	25	48 ⁵	13	62 ⁵	> 95	> 95 ⁵
		20	-	25	-	10	-	> 95	-

Tableau 37 : Synthèses de cétoses L-érythro (3S, 4S) catalysées par la TK_{gst} sauvage et les TK_{gst} mutées les plus performantes à 60°C. ¹ Déterminés par RMN ¹H *in situ* en présence d'un étalon interne (TSP-d₄). ² Déterminés par RMN ¹³C. ³ Mutant L382D/D470S. ⁴ Mutant L191I. ⁵ Mutant L382F/F435Y

Analyse des résultats obtenus avec la TK_{gst} sauvage

- Taux de conversion et rendements

Après environ 24 heures de réaction, les quatre composés attendus ont été obtenus. Une conversion totale du L-glycéraldéhyde et du L-lactaldéhyde (C3) est observée alors qu'en présence du D-thréose et du L-érythro (C4), de plus faibles taux de conversion, respectivement 24 % et 20 %, ont été déterminés. L'observation faite précédemment avec les aldéhydes α -hydroxylés (2R) en présence desquels les taux de conversion chutent avec l'allongement de la chaîne carbonée, est également valable pour les analogues (2S). Les

cétoses à 5 atomes de carbone, le L-ribulose **3** et le 5-désoxy-L-ribulose **4**, sont obtenus avec des rendements respectifs de 56% et 98%. Il est à mentionner que l'obtention du 5-désoxy-L-ribulose **4** avec un rendement quasi quantitatif provient du fait que ce composé, moins polaire que le L-ribulose **3**, est efficacement entraîné par la phase mobile durant la purification sur colonne de gel de silice, au contraire du L-ribulose **3**.

Les cétooses à 6 atomes de carbone, le D-tagatose **5** et le L-psicose **6**, sont synthétisés avec des rendements plus modestes, de l'ordre de 13% et 10%, respectivement, ce qui est en accord avec les taux de conversion des aldéhydes mesurés.

Il est à noter que les aldéhydes α -hydroxylés de configuration (2S) comportant 5 (le D-arabinose et le D-lyxose) et 6 atomes de carbone (le D-mannose), en présence desquels aucune activité n'a été détectée à l'échelle analytique à 25°C, n'ont conduit effectivement à la formation d'aucun produit correspondant, à 60°C.

- Stéréosélectivité

Pour toutes les synthèses réalisées, un seul diastéréoisomère a été identifié par RMN ^{13}C (e.d supérieurs à 95%). De plus, la mesure du pouvoir rotatoire des produits purifiés a permis de confirmer la pureté optique des composés, par comparaison avec les valeurs données dans la littérature. La stéréosélectivité de la TK_{gst} conduisant à une configuration (3S) du cétoose est à nouveau démontrée.

Analyse des résultats obtenus avec les TK_{gst} mutées

- Taux de conversion et rendements

Le double mutant L382D/D470S présente une activité 4 et 5 fois plus élevée que la TK_{gst} sauvage vis-à-vis respectivement du L-lactaldéhyde et du L-glycéraldéhyde. Celui-ci a été employé pour synthétiser à l'échelle préparative les deux cétooses L-érythro (3S, 4S) correspondants, le 5-désoxy-L-ribulose **4** et le L-ribulose **3**. Comme nous l'avons vu précédemment, ce mutant n'est stable que durant 7 heures à 60°C. Néanmoins, à 50°C, son activité est parfaitement conservée durant 2,5 jours. Ainsi, les synthèses de ces composés ont été réalisées à cette température. De plus, celles-ci ayant été réalisées au début de ces travaux de thèse, les conditions non-optimisées ont été utilisées, c'est-à-dire : pH 7,5, [ThDP] = 2,4 mM, [Mg²⁺] = 9 mM. Dans ces conditions, le L-ribulose **3** et le 5-désoxy-L-

ribulose **4** ont été obtenus en présence de la TK_{gst} sauvage avec des rendements respectifs de 11% et 33%, après la conversion totale des substrats en 24 heures. En présence du mutant L382D/D470S, les substrats sont convertis en seulement 7 heures et 17 heures, en présence, respectivement, du L-glycéraldéhyde et du L-lactaldéhyde. Les produits correspondants ont été obtenus avec des rendements de 55% et 63%, 5 fois et 4 fois supérieurs respectivement, à ceux déterminés en présence de l'enzyme sauvage.

Le L-ribulose **3** a également été synthétisé en présence du mutant L191I, sélectionné à l'échelle analytique pour son activité 4 fois supérieure à celle de l'enzyme sauvage vis-à-vis du L-glycéraldéhyde. Ce dernier a permis une conversion complète des substrats en seulement 12 heures, soit deux fois plus rapidement qu'avec l'enzyme sauvage. Le ribulose **3** a été obtenu avec un rendement de 68%, légèrement supérieur à celui déterminé avec la TK_{gst} sauvage (obtenu dans les conditions optimisées, soit 56%) et le mutant L382D/D470S (55%). Il est à noter qu'en présence de la TK_{gst} sauvage, le L-ribulose **3** est obtenu avec un rendement 5 fois plus élevé dans les conditions optimisées, en comparaison du rendement déterminé dans les conditions réactionnelles initiales. Ce résultat met en relief l'importance de limiter la dégradation du Li-HPA à haute température, afin d'augmenter les rendements finaux.

Enfin, le D-tagatose **5** a été synthétisé en présence du mutant L382F/F435Y, sélectionné à l'échelle analytique pour son activité 3,6 fois supérieure à celle de l'enzyme sauvage vis-à-vis du D-thréose. Deux équivalents de Li-HPA ont été employés, afin de convertir en totalité le D-thréose en seulement 48 heures. Le D-tagatose **5** a été obtenu avec un rendement de 62%, environ 5 fois supérieur à celui déterminé avec la TK_{gst}.

- Stéréosélectivité

De même que précédemment, des *ed* supérieurs à 95% ont été obtenus et la mesure du pouvoir rotatoire des produits purifiés a permis de confirmer leur pureté optique par comparaison avec les valeurs mentionnées dans la littérature. La stéréosélectivité des mutants L382D/D470S, L191I et L382F/F435Y est donc similaire à celle de la TK_{gst} sauvage, en faveur de la formation d'une configuration (*S*) du C3 du cétose formé.

Par conséquent, tous les résultats obtenus à l'échelle analytique avec les mutants L382D/D470S, L191I, L382F/F435Y sont confirmés ici à l'échelle préparative. Ceux-ci ont permis la synthèse de trois cétooses L-érythro (3*S*, 4*S*), le L-ribulose **3**, le 5-désoxy-L-ribulose

4 et le D-tagatose **5** à l'échelle préparative, avec des cinétiques réactionnelles plus rapides qu'en présence de la TK_{gst} sauvage et des rendements finaux améliorés.

Il est à noter que l'obtention des cétooses L-érythro (3S, 4S) et notamment celle des trois composés obtenus est délicate en utilisant d'autres voies de synthèse. Par voie chimique, les stratégies développées nécessitent de nombreuses étapes et l'utilisation de groupements protecteurs [11]. Par voie enzymatique, la L-arabinose isomérase utilisée pour la préparation du D-tagatose ou du L-ribulose à partir respectivement du D-galactose ou du L-arabinose, conduit à un équilibre qui n'est pas en faveur des cétooses [256], [257], [258], [259]. Un autre exemple est la synthèse du L-ribulose à partir du ribitol [260], qui n'est que partiellement oxydé par la souche *Gluconobacter oxydans*. Les aldolases ont également été utilisées mais elles ne sont pas complètement stéréosélectives. Ainsi, par exemple, en présence du L-glycéraldéhyde, la réaction conduit à un mélange de L-piscose et L-sorbose [13].

3.2.4. Conclusions

Ainsi, la TK_{gst} sauvage a permis l'obtention de dix cétooses, incluant des cétooses rares à haute valeur ajoutée, à 60°C, *via* la formation stéréosélective d'une liaison C-C. Cette enzyme conduit à la formation d'un diastéréoisomère unique, alors qu'un mélange de plusieurs diastéréoisomères difficilement séparables est souvent obtenu dans le cas de l'isomérisation de monosaccharides catalysée par des isomérases [8], [10] ou de l'emploi d'aldolases présentant une perte de stéréosélectivité au cours du temps [13]. De plus, l'emploi du Li-HPA permet de rendre la réaction irréversible, ce qui n'est pas le cas des procédés catalysés par ces deux dernières enzymes [8], [10], [261].

Afin d'augmenter les taux de conversion et les rendements des synthèses en présence des aldéhydes α -hydroxylés (2S) et des aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6), les TK_{gst} mutées les plus performantes, identifiées précédemment, ont été utilisées comme biocatalyseurs pour synthétiser les cétooses correspondants à l'échelle préparative. Les résultats obtenus à l'échelle analytique ont été confirmés. Celles-ci ont en effet permis la synthèse plus efficace par rapport aux résultats obtenus avec la TK_{gst} sauvage du L-ribulose **3**, du 5-désoxy-L-ribulose **4** et du D-tagatose **5**, trois cétooses L-érythro (3S, 4S) mais également du D-sédoheptulose **9**, un cétoose de configuration D-*thréo* (3S, 4R) à 7 atomes de carbones, *via* des temps réactionnels plus courts et l'obtention de meilleurs rendements. Enfin, le D-glucose, qui n'est pas substrat de la TK_{gst} sauvage, a été converti par le mutant R521V/S385D/H462S en présence du Li-HPA, pour former le produit

correspondant, le D-*glycero-D-ido*-octulose **11**. Néanmoins, ce produit pur n'a pas pu être isolé.

Toutefois, que ce soit en présence de la TK_{gst} sauvage ou des TK_{gst} mutées, malgré l'optimisation des conditions réactionnelles, la dégradation du Li-HPA en acide glycolique dans ces conditions n'est pas négligeable (2,6%/heure). Elle entraîne en effet une baisse des rendements, notamment en présence des aldéhydes α-hydroxylés (2S) et des aldéhydes α-hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6), qui nécessitent des temps de réaction plus longs. Pour lever ce verrou, nous avons envisagé de générer le HPA *in situ* par voie enzymatique, afin de réduire le temps de résidence de ce substrat dans le milieu réactionnel et ainsi, limiter sa dégradation à haute température, tout en évitant la synthèse de ce composé par voie chimique.

3.3. Cascades bi-enzymatiques pour la génération *in situ* du HPA

L'ensemble des résultats présentés dans ce paragraphe a fait l'objet d'une publication dans le journal *Green Chemistry* en 2016, donnée en annexe de ce manuscrit [262]. Ces travaux ont été réalisés avec l'aide de M. De Sousa Lopes Moreira, durant son stage de Master 2 et du Dr. F. Bruna González, durant son contrat post-doctoral.

3.3.1. Stratégies de génération *in situ* du HPA par voie enzymatique

Le HPA est commercialisé par la société Sigma-Aldrich mais est très onéreux. Il peut être préparé à moindre coût sous forme de sel de lithium, de sodium ou de potassium, par voie chimique en une étape, à partir de l'acide bromopyruvique et en présence respectivement de LiOH, NaOH ou KOH (M⁺OH⁻) [101], [115], [263] (Figure 72).

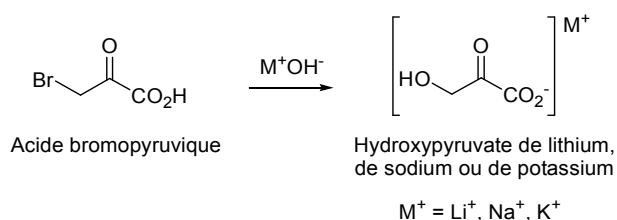


Figure 72 : Synthèse chimique de l'hydroxypyruvate de lithium, de sodium ou de potassium à partir de l'acide bromopyruvique

Cette voie de synthèse est rapide, facile à mettre en œuvre et aisément réalisable à l'échelle du gramme. Cependant, une étape de purification par recristallisation est nécessaire et conduit à une perte importante de produit, entraînant l'obtention de faibles rendements, compris entre 23% et 51% [101], [102], [115]. De plus, l'acide bromopyruvique est un composé relativement coûteux, hautement toxique pour le manipulateur et persistant dans l'environnement.

Par ailleurs, comme nous l'avons montré dans l'étude précédente, malgré l'optimisation des conditions réactionnelles, le Li-HPA se dégrade partiellement à haute température. La génération *in situ* de ce composé à 60°C est alors particulièrement appropriée, afin de le convertir au fur et à mesure de sa formation et de limiter ainsi son temps de résidence dans le milieu. Des stratégies ont été initiées par l'équipe du Pr. L. Hecquet dans les années 1990 à partir de la sérine, acide aminé protéinogène naturel non toxique et très peu coûteux, selon deux voies, l'une catalysée par une transaminase (TA) [264], l'autre par une D-aminoacide oxydase (D-AAO) [265]. Le HPA ainsi généré a été utilisé comme substrat donneur dans des réactions catalysées par la TK_{spi}. Puis les groupes des Pr. P. Dalby et H. E. Hailes [266] et du Pr. H. G. Floss [267] ont plus récemment décrits des procédés similaires, comme présenté plus en détail au cours de l'étude bibliographique.

Nous avons envisagé d'optimiser ces deux procédés avec la TK_{gst}, en présence d'aldéhydes accepteurs α -hydroxylés utilisés précédemment, pour la synthèse des cétones correspondants (Figure 73).

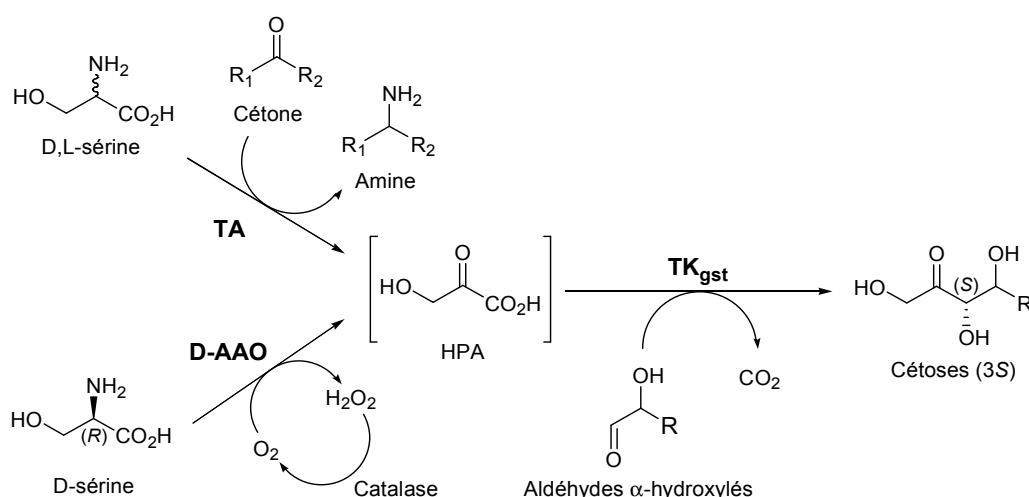


Figure 73 : Cascades bi-enzymatiques pour la génération *in situ* du HPA par voie enzymatique
 TA : Transaminase. D-AAO : D-aminoacide oxydase

L'objectif est ici de rechercher des TAs et des D-AAOs acceptant la sérine comme substrat et si possible thermostables, puis de coupler l'une ou l'autre de ces deux enzymes avec la TK_{gst}, afin de comparer l'efficacité des deux stratégies. Chaque couplage TA/TK_{gst} ou D-AAO/TK_{gst} sera réalisé selon une stratégie « one-pot » et de façon simultanée, pour éviter l'accumulation et la dégradation du HPA, qui sera converti de façon concomitante par la TK_{gst}. De plus, cette stratégie évite l'étape de purification nécessaire dans le cas de la production du HPA par voie chimique.

3.3.2. Couplage TA_{tca}/TK_{gst}

3.3.2.1. Recherche d'une transaminase appropriée

Les transaminases (TAs, EC 2.6.1.-), aussi communément appelées aminotransférases, appartiennent à la famille des enzymes dépendantes du phosphate de pyridoxal ou PLP, la forme biologiquement active de la vitamine B₆ (Figure 74) [268], [269].

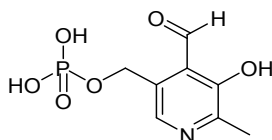


Figure 74 : Structure développée du phosphate de pyridoxal ou PLP, la forme active de la vitamine B₆

Les enzymes PLP-dépendantes constituent une très vaste famille d'enzymes ubiquitaires, impliquées dans de nombreuses réactions métaboliques mettant en jeu des amines, *via* des réactions de racémisation, de réduction, d'élimination, de substitution, de décarboxylation, de phosphorylation et de transamination [268], [269].

Les TAs appartiennent à la classe des transférases et catalysent le transfert réversible d'un groupement amine d'un substrat donneur d'amine sur le groupement carbonyle d'un substrat accepteur (Figure 75) [270].

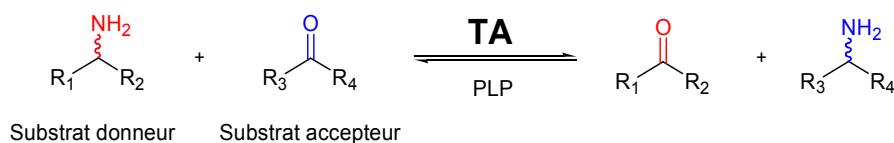


Figure 75 : Réaction de transamination catalysée par les transaminases ou TAs

Les TAs représentent une très large famille d'enzymes, dont les structures et les spécificités de substrats sont très variées. A ce jour, plus de 360 000 séquences annotées en tant que transaminases sont répertoriées dans la banque de données génomiques UniProtKB et plus de 750 structures cristallographiques sont disponibles dans la base de données protéiques, la PDB. La grande diversité des TAs a conduit au développement de différents modes de classification de ces enzymes, basés, soit sur leur structure 3D [270], [271], soit sur leur spécificité de substrat. Seul ce second mode sera développé ici et la nomenclature associée sera utilisée dans ce manuscrit.

D'après cette classification, les transaminases sont divisées en deux grands groupes, les α -TAs et les amine-TAs (Tableau 38).

Groupe	α -TAs		Amines-TAs
	L- α -TAs	D- α -TAs	
Structure générale des substrats donneurs	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{R}_1 - \alpha - \text{CO}_2\text{H} \end{array}$ <p>R₁ = virtuellement illimité en terme de possibilités</p>		$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{R}_2 - \text{C} - \text{R}_3 \end{array}$ <p>R₂, R₃ = virtuellement illimité en termes de possibilités</p>
Substrat donneur préférentiel	Acide-L-glutamique	D-alanine	D- et L-alanine
Substrat accepteur préférentiel	Acide α -cétooglutarique	Acide pyruvique	Acide pyruvique

Tableau 38 : Classification des TAs en fonction de leur spécificité de substrats

Les α -transaminases ou α -TAs sont les transaminases les plus représentées et sont très utilisées en synthèse organique [269]. En effet, elles catalysent le transfert d'un groupement amine d'acides α -aminés sur le groupement carbonyle d' α -cétoacides et sont ainsi particulièrement intéressantes pour la synthèse d'acides aminés rares ou non naturels (Figure 76).

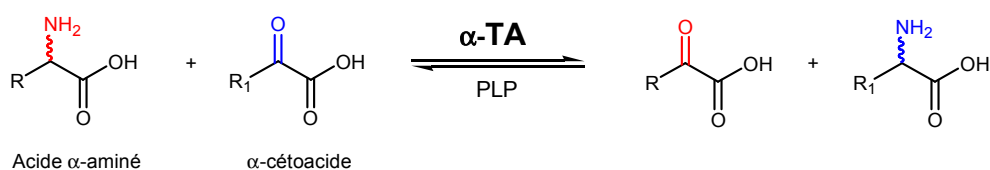


Figure 76 : Transfert d'un groupement amine d'un acide α -aminé sur un α -cétoacide catalysé par les α -transaminases ou α -TAs

L'utilisation d'une α -TA peut donc permettre de catalyser la formation du HPA en une étape, à partir de la D- ou L-sérine comme substrat donneur d'amine et d'un substrat accepteur de type cétone. Le HPA peut alors être généré *in situ* et utilisé comme substrat donneur de la TK_{gst} pour la synthèse de cétooses en présence d'aldéhydes accepteurs appropriés. La réaction catalysée par la TK étant irréversible, l'équilibre de la première réaction catalysée par l' α -TAs est alors déplacé vers la synthèse du HPA. Ce couplage, pour être efficace, doit être réalisé selon une stratégie « one-pot » et de façon simultanée (Figure 77).

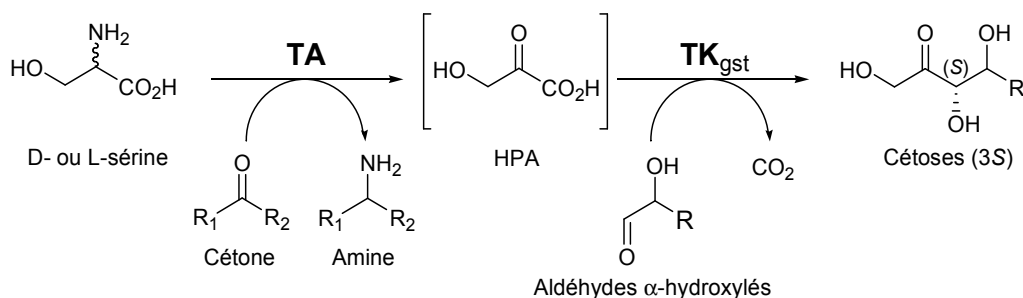


Figure 77 : Génération *in situ* du HPA catalysée par une transaminase à partir de la D- ou L-sérine

Ce procédé a déjà été utilisé à 25°C en présence des TK_{eco} et TK_{spi}. Dans le cadre de ces travaux de thèse, l'objectif est d'exploiter la thermostabilité de la TK_{gst} pour notamment réaliser les synthèses à 60°C, température qui, comme nous l'avons montré, permet de diminuer les temps réactionnels et d'augmenter les activités vis-à-vis de certains substrats. Ainsi, l'utilisation d'une α -TA thermostable pour générer le HPA *in situ* à cette température est nécessaire, afin d'éviter son accumulation dans le milieu et donc sa dégradation.

Par conséquent, notre objectif a été de rechercher une α -TA thermostable capable d'accepter la D- ou L-sérine, ce type de TA étant incapable de réaliser la transamination du produit de la réaction catalysée par la TK_{gst}, à la différence des amines-TAs [205], [210] (Tableau 38).

3.3.2.2. Identification d'une α -TA thermostable issue de la biodiversité

Le Genoscope, CEA à Evry dispose d'environ 8000 gènes clonés, codant pour des enzymes appartenant aux classes des oxydo-réductases, des transférases, des hydrolases, des lyases et des ligases. De larges collections de gènes codant pour des transaminases issues de la biodiversité sont également disponibles et ont été criblées au laboratoire par l'équipe du Pr. T. Gefflaut (Equipe BioMéta, ICCF), dans le cadre d'un autre projet, visant à identifier

de nouvelles transaminases pour la synthèse efficace d'amines chirales. L'une de ces banques, notamment, a fait l'objet de nombreuses investigations [272].

Initialement composée de plusieurs milliers de gènes codant pour des transaminases représentant la variété des activités enzymatiques existant au sein des groupes des α -TAs et des amines-TAs, la taille de cette banque a été significativement réduite, pour ne conserver que les gènes codant pour les transaminases représentatives des deux groupes et présentant un faible pourcentage d'homologie. Parmi les 475 gènes ainsi sélectionnés, seuls 232 ont été correctement clonés dans le plasmide pET22b(+) et insérés dans la souche d'*E. coli* BL21(DE3). Les clones correspondants ont été cultivés en microplaques 96-puits puis chaque protéine a été surexprimée *via* l'addition d'IPTG. Après la lyse des cellules, une analyse par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE) a permis de confirmer la surexpression des 232 enzymes, appartenant toutes aux classes des D- α -TAs et L- α -TAs.

La banque des 232 D- et L- α -TAs a tout d'abord été criblée vis-à-vis de l'acide cystéine-sulfonique en série D et L ou D- et L-ACS, un substrat donneur d'amine permettant de rendre la réaction de transamination irréversible et d'un panel d' α -cétoacides comme substrat accepteur, dont le Li-HPA, à l'aide un test de criblage colorimétrique haut-débit développé au laboratoire [272]. Les 18 α -TAs les plus actives vis-à-vis de cet accepteur ont été sélectionnées. Issues de microorganismes mésophiles, modérément thermophiles ou thermophiles, celles-ci appartiennent toutes à la classe des L- α -TAs et une grande majorité a pour substrat donneur naturel la L-sérine et comme substrat accepteur naturel, l'acide glyoxylique ou l'acide pyruvique. Ces 18 L- α -TAs ont enfin été criblées dans le sens inverse, c'est-à-dire vers la production du HPA, en présence de la L-sérine comme donneur d'amine et de différents α -cétoacides comme substrats accepteurs (Figure 78).

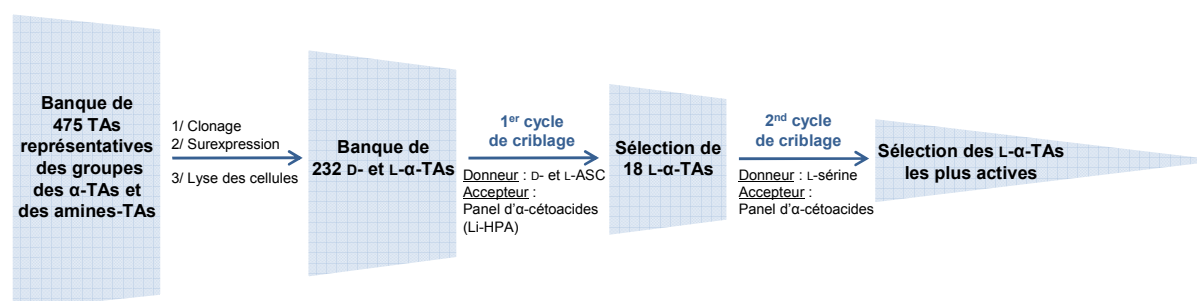


Figure 78 : Etapes de criblage de la banque composée de 475 TAs représentatives des groupes des α -TAs et des amines-TAs

Criblage de la banque des 18 L- α -TAs vis-à-vis de la L-sérine et d'un panel d' α -cétoacides

Le criblage de la banque des 18 L- α -TAs a été réalisé à l'aide d'un test colorimétrique, basé sur l'utilisation d'un sel de tétrazolium, le 2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfophényl)-tétrazolium ou WST-1, de l'anglais « *Water soluble tetrazolium-1* » [273], [274].

Le colorant WST-1 a récemment été utilisé par l'équipe du Pr. J. Littlechild (Royaume-Uni), pour la détermination de l'activité d'une sérine : pyruvate transaminase thermostable de *Sulfolobus solfataricus* [160]. Le test décrit repose sur un procédé séquentiel, que nous avons reproduit au laboratoire, pour le criblage de la banque des 18 L- α -TA (Voir *Partie Expérimentale*). Le colorant WST-1, initialement incolore, oxyde l' α -hydroxycétone du HPA formé au cours de la réaction de transamination. Il est alors lui-même réduit pour conduire à sa forme formazan, un composé soluble dans l'eau, présentant une intense couleur bleue à $\lambda_{\max} \approx 600$ nm. Le mélange résultant est alors chauffé à 60°C durant 10 minutes, afin d'accélérer la réaction de réduction. L'absorbance du milieu, mesurée à 600 nm, est alors directement proportionnelle à la quantité de HPA présent. Une unité de TA (U) correspond à une micromole de L-sérine ou d' α -cétoacide convertie par minute ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$). Ce test sera référencé sous le nom de « test $\text{TA}_{\text{WST-1}}$ » dans la suite du manuscrit (Figure 79).

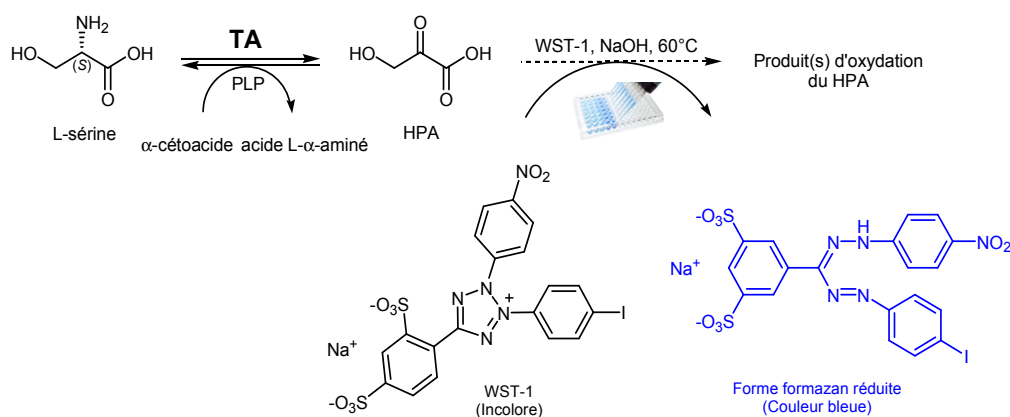


Figure 79 : Test d'activité des TAs (« test $\text{TA}_{\text{WST-1}}$ »)

L'utilisation du WST-1 permet la détermination de l'activité des transaminases avec une excellente sensibilité, bien supérieure à celle d'autres analogues comme le chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT), le violet de tétrazolium (VT) ou le rouge de tétrazolium (chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium, TTC), dont la forme réduite n'est pas soluble dans l'eau [274], le coefficient d'absorption molaire de la forme formazan du WST-1 étant : $\epsilon = 42000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à $\lambda_{\max} = 600$ nm (détermination expérimentale). Ce test étant particulièrement sensible,

l'apparition d'une coloration non-spécifique de la réaction de transamination en présence de chaque composant (substrats, TAs, PLP), testé individuellement, a été évaluée. Une coloration significative a été observée en présence de l'acide glyoxylique, à une concentration supérieure à 5 mM. Ainsi, cet α -cétoacide a toujours été utilisé à une concentration maximale de 5 mM.

L'activité des différentes L- α -TAs a été déterminée à l'aide du « test TA_{WST-1} », vis-à-vis de la L-sérine (5 mM) comme substrat donneur et de trois α -cétoacides comme substrats accepteurs (5 mM) : l'acide α -cétoglutarique ou α -KG, l'acide glyoxylique et l'acide pyruvique, générant respectivement l'acide L-glutamique, la glycine et la L-alanine (Tableau 39). L'acide glyoxylique et l'acide pyruvique ont été sélectionnés puisqu'il s'agit des α -cétoacides accepteurs naturels de la plupart des L- α -TAs testées. L' α -KG a été ajouté au panel puisqu'il constitue l' α -cétoacide préférentiellement accepté par les L- α -TAs [275].

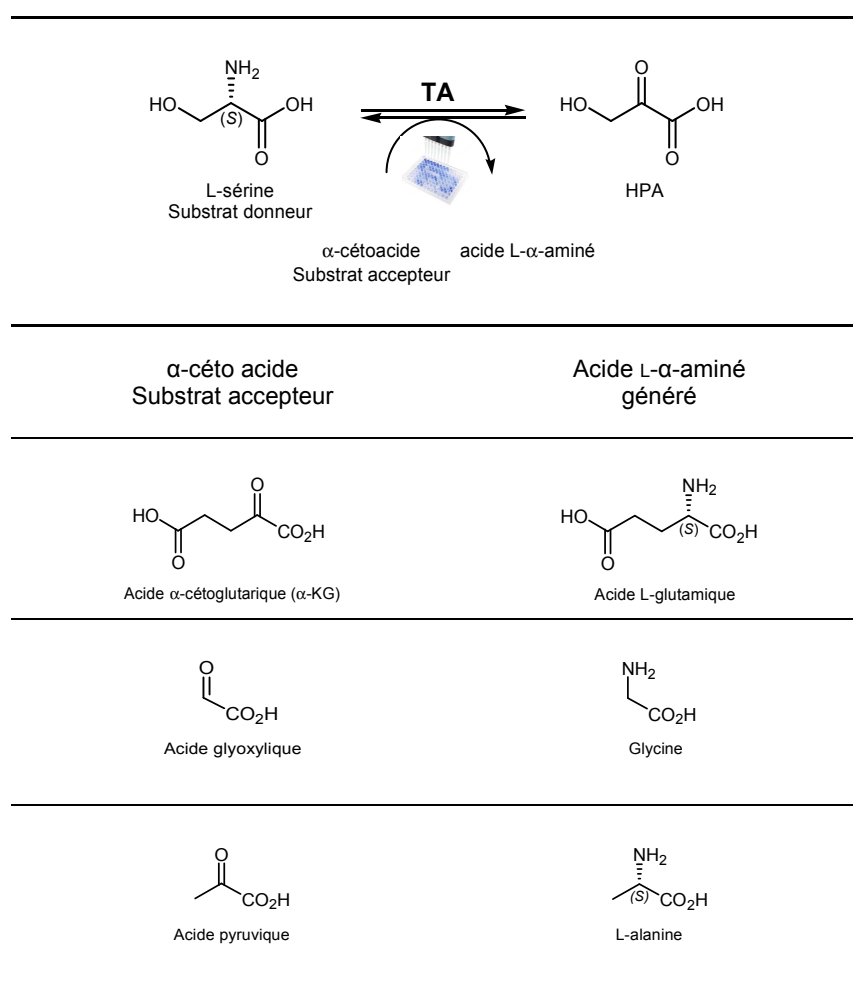


Tableau 39 : Trois α -cétoacides : l' α -KG, l'acide glyoxylique et l'acide pyruvique, utilisés comme substrat accepteur en présence de la L-sérine, utilisée comme substrat donneur, générant respectivement l'acide L-glutamique, la glycine et la L-alanine

Les activités des lysats cellulaires correspondants aux 18 L- α -TAs testées sont présentées dans la Figure 80 a) ci-dessous.

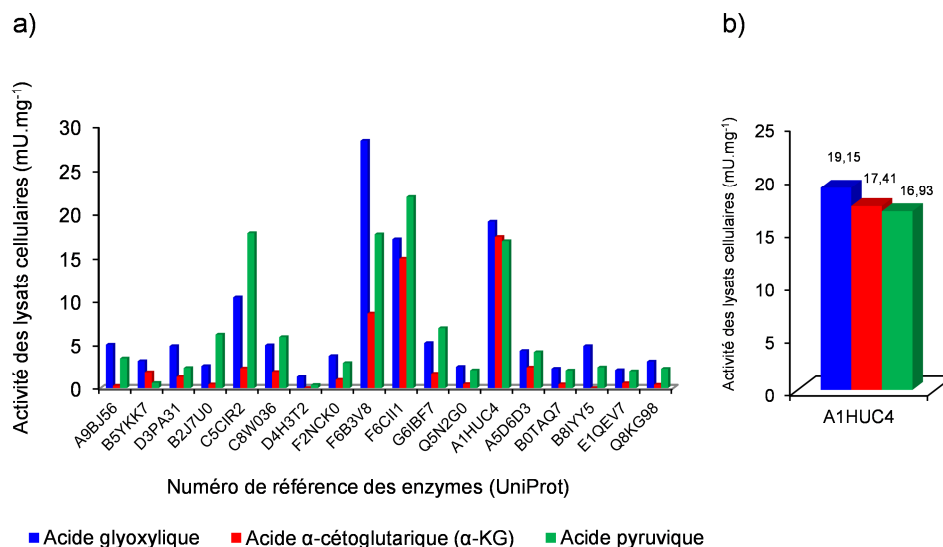


Figure 80 : Activités des lysats cellulaires des 18 L- α -TAs déterminées à l'aide du « test TA_{wst-1} » à 25°C vis-à-vis de la L-sérine (5 mM) et de l'acide glyoxylique (5 mM), de l' α -KG (5 mM) ou de l'acide pyruvique (5 mM). a) Activités des 18 L- α -TAs testées. b) Agrandissement des activités de la L- α -TAs annotée A1HUC4

Parmi les 18 L- α -TAs étudiées, trois se distinguent par leurs activités supérieures ou égales à 10 mU.mg⁻¹ vis-à-vis des trois α -cétoacides testés : il s'agit des enzymes annotées F6B3V8, F6CII1 et A1HUC4 dans la base de données UniProtKB (Figure 80 a)). Tandis que les enzymes annotées F6B3V8 et F6CII1 sont issues de microorganismes modérément thermophiles du genre *Desulfotomaculum* [276], [277], l'enzyme annotée A1HUC4 est issue de la bactérie thermophile à Gram négatif *Thermosinus carboxydivorans* Nor1^T (DSM 14886), très répandue dans les sources chaudes du parc national volcanique du Yellowstone (Etats-Unis), où la température est comprise entre 40°C et 68°C [278]. Celle-ci a donc été sélectionnée pour la suite de l'étude. Son activité est de 19,2 mU.mg⁻¹ vis-à-vis de l'acide glyoxylique, de 17,4 mU.mg⁻¹ vis-à-vis de l' α -KG et de 16,9 mU.mg⁻¹ vis-à-vis de l'acide pyruvique (Figure 80 b)). Cette enzyme est annotée comme étant une L-sérine : glyoxylate α -transaminase (EC 2.6.1.45) et sera notée TA_{tca} dans la suite du manuscrit.

3.3.2.3. Production de la TA de *Thermosinus carboxydivorans* (TA_{tca})

Expression et purification par IMAC

Le gène codant pour la TA_{tca} a été amplifié par PCR, cloné dans le vecteur d'expression pET22b(+) puis transformé dans la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysE. Après culture et lyse des cellules, la purification de la TA_{tca}, exprimée avec une étiquette 6-His en position N-terminale, a été réalisée par chromatographie d'affinité en présence de cations métalliques (IMAC), selon le même principe présenté dans le paragraphe 1.2.2., page 72, à température ambiante. Ici, le PLP est ajouté durant l'étape de purification.

N.B. : Pour les mêmes raisons que celles explicitées précédemment dans le paragraphe 1.2.1., page 71 de ce manuscrit, seule l'ampicilline a été utilisée comme antibiotique pour la réalisation des cultures de la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysE, pour la production de la TA_{tca}.

La surexpression de la TA_{tca} et la pureté de l'extrait purifié ont été vérifiées par électrophorèse « SDS-PAGE » en présence de 15% d'acrylamide [229] (Figure 81). L'électrophorégramme présente une bande unique à environ 41 kDa, correspondant au poids moléculaire d'une sous-unité de la TA_{tca} (Valeur théorique : 40,991 kDa (A1HUC4.UniProt)).

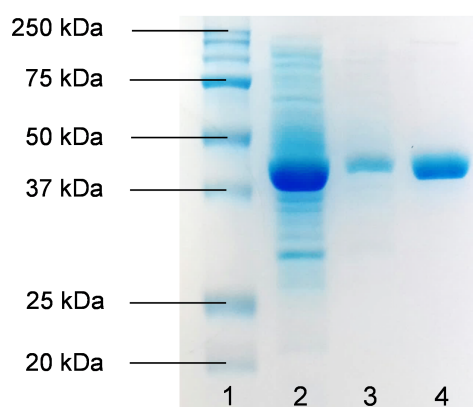


Figure 81 : Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE - Acrylamide : 15%) de la TA_{tca}. 1 : All Blue Prestained Protein Standards, Bio-Rad ; 2 : TA_{tca} (lysate cellulaire, 40 µg) ; 3 : TA_{tca} (lysate cellulaire, 5 µg) ; 4 : TA_{tca} (enzyme purifiée, 5 µg).

L'activité de la TA_{tca} a été déterminée en utilisant le « test TA_{WST-1} », avant et après purification et le rendement de la purification a été calculé pour un litre de culture cellulaire (Tableau 40). Les concentrations en protéines (mg.mL⁻¹) ont été déterminées par le test de

Bradford [230]. La L-sérine a été utilisée comme substrat donneur et l' α -KG, comme substrat accepteur, puisqu'il s'agit de l' α -cétoacide préférentiellement accepté par les L- α -TAs [279].

Fraction	Activité [U]	Protéines [mg]	Activité spécifique [U.mg ⁻¹]	Facteur de purification -	Rendement [%]
Lysat cellulaire	929	572	1,1	-	-
TA _{tca} purifiée	717	203	3,5	3,2	77,2

Tableau 40 : Activité de la TA_{tca} avant et après purification par IMAC déterminée par le « test TA_{WST-1} » en présence de la L-sérine (250 mM) et de l' α -KG (3 mM) à 25°C
Pour 1 L de culture cellulaire (soit 4,45 g. L⁻¹ de cellules humides)

Cette méthode de purification a permis l'obtention de 203 mg de TA_{tca} purifiées à partir de 1 L de culture contenant 4,45 g de cellules humides. L'activité spécifique de la TA_{tca} est relativement faible puisqu'elle a été déterminée à 25°C. La suite de l'étude montrera que, comme attendu, cette enzyme étant issue d'un microorganisme thermophile, son activité augmente avec la température. Après purification, la TA_{tca} peut être conservée à 4°C en suspension dans le sulfate d'ammonium (3 M, pH 8) en présence du PLP, sans perte d'activité durant plusieurs mois.

3.3.2.4. Caractérisation de la TA_{tca}

Les propriétés biochimiques de la TA_{tca} purifiée ont été étudiées selon trois directions : 1) sa spécificité de substrat, 2) ses conditions réactionnelles optimales (température, pH) et 3) sa stabilité à haute température.

Etude de la spécificité de substrats

Différentes concentrations en L-sérine ont été testées, comprises entre 5 et 450 mM. L'activité de la TA_{tca} augmente pour des concentrations comprises entre 5 mM et 250 mM, puis atteint un plateau jusqu'à 450 mM. Ainsi, une concentration en L-sérine de 250 mM a été utilisée pour la réalisation de cette expérience, concentration à laquelle l'activité de l'enzyme est maximale. Ce même travail a été réalisé avec les trois α -cétoacides testés, l' α -KG, l'acide glyoxylique et l'acide pyruvique et une inhibition plus ou moins importante de l'enzyme a été constatée. La TA_{tca} est en effet fortement inhibée par l' α -KG et par l'acide glyoxylique, dès 3 mM et 5 mM, respectivement, tandis qu'elle est inhibée par l'acide pyruvique à partir de 50 mM (Tableau 41).

Substrat donneur	Susbrtat accepteur	Inhibition
	α -KG	≥ 3 mM
L-sérine	Acide glyoxylique	≥ 5 mM
	Acide pyruvique	≥ 50 mM

Tableau 41 : Inhibition de la TA_{tca} par l' α -KG, l'acide glyoxylique et l'acide pyruvique déterminée par le « test TA_{WST-1} » en présence de la L-sérine (250 mM) à 25°C

Il est à noter que les mêmes résultats ont également été obtenus en présence d'une concentration en L-sérine plus faible, preuve que cette inhibition est due uniquement à la présence de ces α -cétoacides. Ce résultat est peu surprenant car de nombreux articles relatent l'inhibition de transaminases par leur substrat donneur et/ou leur substrat accepteur [280], [281].

Ainsi, compte-tenu de la forte inhibition de la TA_{tca} par l' α -KG et l'acide glyoxylique, l'acide pyruvique a été sélectionné comme substrat accepteur pour la suite de l'étude. L'activité spécifique de la TA_{tca} purifiée a été déterminée en présence de 50 mM de cet α -cétoacide et de 250 mM de L-sérine dans le tampon HEPES 0,1 M, pH 7,5, à 25°C à l'aide du « test TA_{WST-1} » : elle est de $6,42 \pm 0,01$ U.mg⁻¹ à 25°C. Les paramètres cinétiques apparents de la TA_{tca} vis-à-vis de ce couple de substrats ont ensuite été déterminés.

Détermination des paramètres cinétiques apparents vis-à-vis de la L-sérine et de l'acide pyruvique

Les paramètres cinétiques apparents K_M^{app} et V_{max}^{app} de la TA_{tca} vis-à-vis de la L-sérine (en présence de l'acide pyruvique comme substrat accepteur) et de l'acide pyruvique (en présence de la L-sérine comme substrat donneur) ont été déterminés à 25°C. Les réactions enzymatiques ont été réalisées en microplaques 96-puits puis des prélèvements ont été effectués au cours du temps et dosés selon le « test TA_{WST-1} ». En raison de l'inhibition de la TA_{tca} par l'acide pyruvique à une concentration de 50 mM ou plus, la détermination du K_M^{app} et de la V_{max}^{app} de l'enzyme vis-à-vis de la L-sérine a été réalisée en présence de 50 mM d'acide pyruvique. De plus, la détermination des paramètres cinétiques apparents de la TA_{tca} vis-à-vis de l'acide pyruvique a été réalisée pour des concentrations comprises entre 0,25 et 50 mM (Tableau 42).

	TA _{tca}		
	K _M ^{app}	V _{max} ^{app}	V _{max} ^{app} /K _M ^{app}
	[mM]	[U.mg ⁻¹]	[U.mg ⁻¹ .mM ⁻¹]
L-sérine ¹	22,4 ± 0,3	3,3 ± 0,1	0,15
Acide pyruvique ²	12,8 ± 0,7	8,1 ± 0,5	0,63

Tableau 42 : Paramètres cinétiques apparents de la TA_{tca} vis-à-vis de la L-sérine et de l'acide pyruvique déterminés à l'aide du « test TA_{WST-1} » à 25°C. ¹ Le milieu contient 50 mM d'acide pyruvique et 1-250 mM de L-sérine. ² Le milieu contient 250 mM de L-sérine et 0,25-50 mM d'acide pyruvique.

La méthode de Hanes-Woolf a permis de déterminer un K_M^{app} de 22,4 ± 0,3 mM et une V_{max}^{app} de 3,3 ± 0,1 U.mg⁻¹ pour la L-sérine et un K_M^{app} de 12,8 ± 0,7 mM et une V_{max}^{app} de 8,1 ± 0,5 U.mg⁻¹ pour l'acide pyruvique. Il est à noter que des valeurs de K_M inférieures à celle déterminée pour la TA_{tca} vis-à-vis de la L-sérine ont été mentionnées dans la littérature pour d'autres α-sérine : glyoxylate transaminases, comprises entre 1,4 et 7 mM [209], [282], [283].

Détermination du pH et de la température optimale

L'effet du pH sur l'activité de la TA_{tca} a été examiné pour des pH compris entre 5 et 9,2. Des tampons de différents pK_a ont été utilisés pour couvrir cette gamme de pH (Figure 82). La TA_{tca} est incubée en présence de l'α-KG et du PLP dans le tampon approprié et au pH étudié à 25°C durant 20 minutes, puis la réaction est initiée par l'ajout de la L-sérine. Des prélèvements sont effectués au cours du temps et dosés selon le « test TA_{WST-1} ».

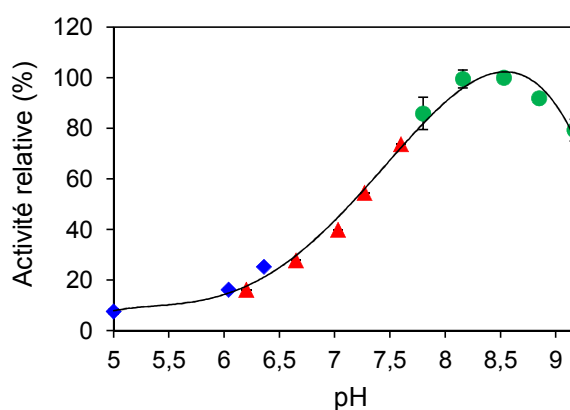


Figure 82 : Profil de l'activité de la TA_{tca} en fonction du pH

◆ Tampon sodium citrate (pK_a 4,8) ▲ Tampon sodium phosphate (pK_a 7,2) ● Tampon sodium borate (pK_a 9,2). L'activité de la TA_{tca} est déterminée à l'aide du « test TA_{WST-1} » en présence de 100 mM de L-sérine et 3 mM d'α-KG, à 25°C. L'activité maximale (100%) obtenue à pH 8,5 correspond à une activité spécifique de 2 U.mg⁻¹. A pH 7, l'activité spécifique est de 0,8 U.mg⁻¹.

L'enzyme présente un maximum d'activité pour un pH autour de 8,5 ; des valeurs similaires, comprises entre pH 8 et 9,2, ayant été déterminées dans la littérature pour d'autres sérine : glyoxylate transaminases, d'origine bactérienne et végétale [282], [283], [284]. A pH 7, l'activité de la TA_{tca} est de 0,8 U.mg⁻¹, soit 40% de son activité maximale à pH 8,5.

L'influence de la température sur l'activité de la TA_{tca} a été mesurée sur un intervalle de températures allant de 20°C à 80°C. Les réactions enzymatiques ont été réalisées en macrocuve, dont la température est contrôlée grâce à un thermostat à effet Peltier (Figure 83). Le HPA est particulièrement instable en milieu tamponné et à haute température [60]. Cependant, ici, cette dégradation est négligeable car la concentration du HPA est déterminée sur des intervalles de temps très courts (de l'ordre de 10 minutes).

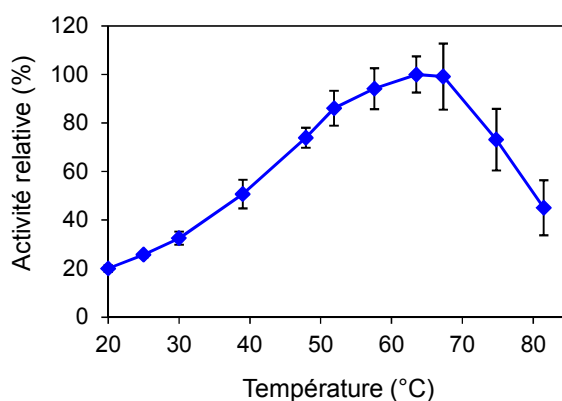


Figure 83 : Profil de l'activité de la TA_{tca} en fonction de la température

L'activité de la TA_{tca} est déterminée à l'aide du « test TA_{WST-1} » en présence de 100 mM de L-sérine et 3 mM d'α-KG. L'activité maximale (100%) obtenue à 63°C, correspond à une activité spécifique de 7,8 U.mg⁻¹. A 20°C, l'activité spécifique est de 1,5 U.mg⁻¹.

La température optimale de la TA_{tca} se situe à 63°C. Le profil d'activité présente une forte augmentation d'un facteur 5 environ entre 20°C (1,5 U.mg⁻¹) et 63°C (7,8 U.mg⁻¹), puis une chute brutale de l'activité au-dessus de 70°C. Ce résultat est en accord avec les propriétés de la bactérie *T. carboxydivorans*, vivant dans un environnement où la température est comprise entre 40°C et 68°C [278].

A 60°C, l'activité de la TA_{tca} est pratiquement maximale (97%). De plus, dans le cas où la température du milieu serait supérieure de quelques degrés à cette température, son activité serait toujours optimale (99% de son activité maximale à 67°C). Ainsi, nous avons étudié l'activité de la TA_{tca} à 60°C sur une durée plus longue.

Etude de la thermostabilité

La stabilité de la TA_{tca} à 60°C a été examinée sur une durée de 10 jours, à l'aide du « test TA_{WST-1} ». A 60°C, la TA_{tca} conserve 100% de son activité durant 4 jours. Après 10 jours, son activité est diminuée de moitié.

Conclusions

Une α -TA jamais décrite dans la littérature et correspondant aux critères initialement fixés a donc été identifiée. Il s'agit d'une L- α -TA issue de la bactérie thermophile *T. carboxydvorans*. Les substrats donneurs et accepteurs les plus appropriés sont respectivement la L-sérine et l'acide pyruvique, ce dernier conduisant à une inhibition de l'enzyme à partir de 50 mM seulement, comparativement aux autres α -cétoacides testés, pour lesquels une inhibition apparaît à des concentrations très basses. La température optimale de la TA_{tca} se situe à environ 60°C et son activité est 5 fois supérieure à cette température qu'à 20°C. Celle-ci présente également une excellente stabilité dans le temps à haute température, puisque son activité est parfaitement conservée durant quatre jours à 60°C. Enfin, cette enzyme présente un maximum d'activité pour un pH aux alentours de 8,5.

3.3.2.5. Synthèse de cétooses L-érythro (3S, 4S) à 60°C

Compte-tenu des résultats de l'étude des propriétés de la TA_{tca} , le couplage de la TA_{tca} et de la TK_{gst} a été réalisé à 60°C, température à laquelle la TA_{tca} et la TK_{gst} présentent une activité quasi-optimale, 97% et 83%, respectivement, température également utilisée pour les synthèses de cétooses présentées précédemment, en présence de la TK_{gst} sauvage et des TK_{gst} mutées. Le pH optimal de la TA_{tca} se situe à environ 8,5. Or, nous avons vu précédemment que le Li-HPA était hautement instable à pH basique et de surcroît à haute température. Ainsi, le couplage a été réalisé à pH 7, pH auquel la dégradation du Li-HPA est limitée et pour lequel l'activité de la TK_{gst} est maximale. En revanche, à ce pH, la TA_{tca} présente seulement 40% de son activité optimale.

La possibilité de réaliser le couplage TA_{tca}/TK_{gst} à haute température nous a permis d'utiliser les quatre aldéhydes α -hydroxylés (2S) identifiés précédemment comme substrats accepteurs de la TK_{gst} sauvage, le L-glycéraldéhyde, le L-lactaldéhyde, le D-thréose et le L-érythro, pour accéder aux cétooses L-érythro (3S, 4S) correspondants, à haute température. La réalisation des synthèses à température ambiante avec ce type d'aldéhydes

n'est pas envisageable, compte-tenu des cinétiques réactionnelles très lentes. Enfin, la L-sérine a été utilisée comme substrat donneur d'amine de la TA_{tca} et l'acide pyruvique, comme substrat accepteur.

Dans un premier temps, l'utilisation de la TA_{tca} pour générer le HPA *in situ* à 60°C en présence de la TK_{gst} a été réalisée avec le glycolaldéhyde, le meilleur substrat accepteur non phosphorylé de la TK_{gst}, comme « preuve de principe » du couplage TA_{tca}/TK_{gst} à haute température (Figure 84).

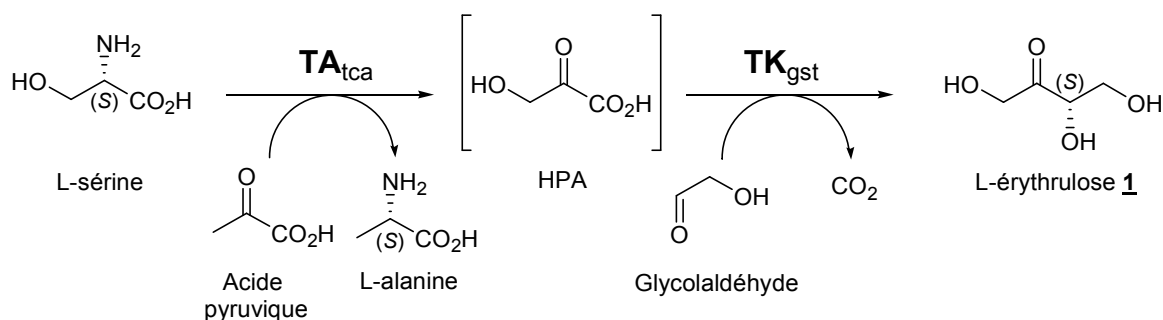
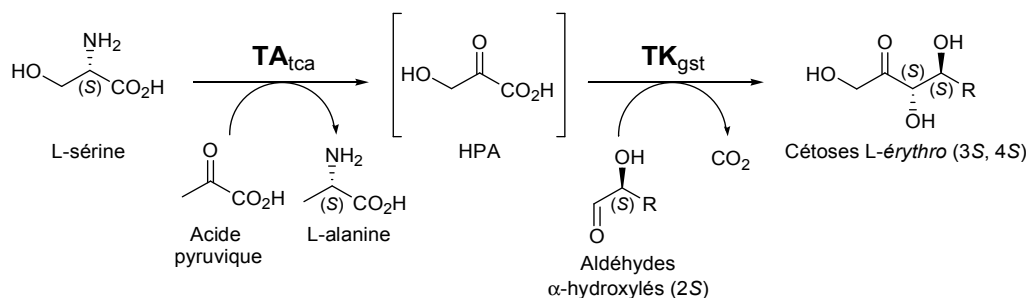


Figure 84 : Couplage TA_{tca}/TK_{gst} à 60°C pour la synthèse du L-érythrose **1 à l'échelle préparative à partir du glycolaldéhyde**

Afin de déplacer l'équilibre de la réaction de transamination vers la formation du HPA, un excès de L-sérine a été utilisé (1,5 mmol, 75 mM) en comparaison de l'acide pyruvique, ce dernier, ainsi que le glycolaldéhyde, ayant été introduits en quantité équimolaire (1 mmol, 50 mM). Les cofacteurs de la TK_{gst} ont été utilisés aux concentrations fixées à la suite de l'étape d'optimisation des conditions réactionnelles pour minimiser la dégradation du Li-HPA, c'est-à-dire [ThDP] = 0,1 mM et [Mg²⁺] = 1 mM. 6 mg de TK_{gst} ont été utilisés, la même quantité employée pour les synthèses réalisées à partir du Li-HPA synthétique présentées précédemment. De plus, une quantité de TA_{tca} de 2,4 mg et une concentration en PLP de 0,2 mM ont été utilisées. Enfin, le couplage a été réalisé dans l'eau pure à 60°C et à pH 7, ce dernier paramètre étant maintenu constant au cours du temps au moyen d'un pH-stat, avec une solution d'HCl 0,1 M. Le couplage TA_{tca}/TK_{gst} réalisé dans ces conditions a été suivi par RMN ¹H *in situ* en présence du TSP-d₄. Après 10 heures de réaction, une conversion complète du glycolaldéhyde et de l'acide pyruvique a été observée. Après purification, le L-érythrose **1** a été obtenu avec un rendement de 44%, un rendement identique ayant été obtenu lors de la synthèse du L-érythrose **1** réalisée dans les mêmes conditions à partir du Li-HPA synthétique.

Forts de ce premier résultat, nous avons, dans un second temps, utiliser le L-glycéraldéhyde comme substrat accepteur de la TK_{gst}, pour synthétiser le L-ribulose **3** à l'échelle préparative. Un premier essai a été réalisé en reproduisant les conditions employées pour la synthèse du L-érythrulose **1** et à partir de 50 mM de L-glycéraldéhyde. 75 % de l'acide pyruvique et 61 % du L-glycéraldéhyde ont été convertis après 17 heures. Ces pourcentages n'ont pas évolué les heures suivantes et la réaction a été stoppée après 24 heures. Après purification, le L-ribulose **3** a été obtenu avec un rendement de 30%. Au regard de ce résultat, nous avons émis l'hypothèse que l'équilibre de la réaction catalysée par la TA_{tca} n'était pas suffisamment déplacé vers la formation du HPA, le L-glycéraldéhyde étant converti beaucoup plus lentement par la TK_{gst} que le glycolaldéhyde. Par conséquent, un second essai a été réalisé en multipliant par deux la concentration en L-sérine (3 mmol, 150 mM) et la masse de TA_{tca} (4,8 mg), dans le but de favoriser la réaction de transamination dans le sens de la synthèse du HPA. Après 24 heures, une conversion complète de l'acide pyruvique et du L-glycéraldéhyde a été mesurée et le L-ribulose **3** a été obtenu avec un rendement de 56 % après purification, similaire au rendement obtenu lors de la synthèse du L-ribulose **3** réalisée dans les mêmes conditions, à partir du Li-HPA synthétique.

Ainsi, ces conditions ont ensuite été appliquées pour la synthèse du 5-désoxy-L-ribulose **4**, du D-tagatose **5** et du L-psicose **6**, à partir, respectivement, du L-lactaldéhyde, du D-thréose et du L-érythrose. Dans le cas de l'utilisation du D-thréose et du L-érythrose, une masse de 10 mg de TK_{gst} et deux équivalents d'acide pyruvique ont été utilisés (Tableau 43).



Aldéhydes α -hydroxylés (2S)	Cétoses L-érythro (3S, 4S)	Taux de conversion [%] ¹		Temps réactionnel [h]	Rendement [%]	ed ² [%]
		Acide pyruvique	Aldéhydes α -hydroxylés (2S)			
L-glyceraldéhyde	L-ribulose 3	> 95	> 99	24	56	> 95
L-lactaldéhyde	5-désoxy-L-ribulose 4	> 95	> 99	24	98	> 95
D-thréose	D-tagatose 5	> 90	> 95	72	52	> 95
L-érythrose	L-psicose 6	> 90	> 95	96	51	> 95

Tableau 43 : Synthèses « one-pot » du L-ribulose **3, du 5-désoxy-L-ribulose **4**, du D-tagatose **5** et du L-psicose **6** catalysées par la TA_{tca} et la TK_{gst} à 60°C.** ¹ Déterminés par RMN ¹H *in situ* en présence d'un étalon interne (TSP-d₄). ² Déterminés par RMN ¹³C.

Dans ces conditions réactionnelles, d'excellents taux de conversion de l'acide pyruvique et des aldéhydes α -hydroxylés (2S) ont été obtenus, supérieurs à 90%. Le L-glyceraldéhyde et le L-lactaldéhyde ont été complètement convertis en 24 heures, tandis que la conversion quasi-totale du D-thréose et du L-érythrose a été réalisée en respectivement 72 heures et 96 heures. Ces deux derniers aldéhydes sont en effet de moins bons substrats de la TK_{gst} par rapport au L-glyceraldéhyde et au L-lactaldéhyde, comme montré précédemment lors des études cinétiques et des synthèses réalisées en présence de la TK_{gst} seule (Voir paragraphes 1.3.3. et 3.2.3. de la *Partie Résultats et Discussions*). Finalement, les quatre cétoses ont été obtenus avec de bons, voire d'excellents rendements, compris entre 51% et

98% et avec de très bons excès diastéréoisomériques ($ed > 95\%$). La mesure des pouvoirs rotatoires a permis de confirmer la pureté optique des produits obtenus.

Par ailleurs, nous n'avons pas constaté de réactions croisées entre les substrats et les produits formés en présence des deux enzymes utilisées. La TA_{tca} appartenant à la classe des α -TAs, aucune réaction secondaire catalysée par cette enzyme entre la L-sérine et un aldéhyde α -hydroxylé (2S)/le cétose formé n'a été observée. De plus, nous avons vu précédemment que la TK_{gst} était capable d'utiliser l'acide pyruvique comme α -cétoacide donneur. Or, ici, aucune réaction entre l'acide pyruvique et l'aldéhyde α -hydroxylé (2S) catalysée par la TK_{gst} n'a été observée, l'affinité de la TK_{gst} pour le HPA étant nettement supérieure à celle pour l'acide pyruvique. Enfin, aucune inhibition de la TA_{tca} par les aldéhydes α -hydroxylés (2S) et de la TK_{gst} par les substrats de la TA_{tca} n'a été constaté sur la durée des réactions et aux concentrations employées.

Comparaison avec la stratégie impliquant le Li-HPA synthétique

Pour confirmer l'intérêt de cette nouvelle approche, les résultats obtenus en utilisant cette stratégie sont à comparer avec celle développée précédemment en présence du Li-HPA synthétique, avec les mêmes quantités de TK_{gst} et les mêmes concentrations d'aldéhydes (Voir paragraphe 3.2.3., page 153 de ce manuscrit). Le L-glycéraldéhyde et le L-lactaldéhyde, les deux meilleurs substrats (2S) parmi les quatre testés, conduisent à une conversion quasiment complète en cétooses. Les rendements sont similaires pour les deux stratégies, pour une même durée de réaction (56% et 97-98% pour le L-ribulose **3** et le désoxy-L-ribulose **4**, respectivement, pour un temps réactionnel de 24 heures). En revanche, en présence des deux aldéhydes moins bien acceptés par la TK_{gst} , le D-thréose et le L-érythrose, la stratégie permettant de générer *in situ* le HPA a permis d'améliorer de façon très significative les résultats obtenus en présence du Li-HPA synthétique. En effet, le D-tagatose **5** et le L-psicose **6** ont été obtenus *via* la stratégie bi-enzymatique avec des rendements respectifs de 52% et 51%, contre 13% et 10% pour la stratégie qui utilise le Li-HPA synthétique, soit une amélioration d'un facteur 4 et 5, respectivement. La génération *in situ* du HPA évite son temps de séjour en solution à 60°C et donc sa dégradation, plus particulièrement en présence de « mauvais » substrats de la TK_{gst} , qui nécessitent des temps réactionnels plus longs.

Détermination du facteur E

Cette nouvelle approche est également une alternative « éco-compatible » à la synthèse chimique du HPA sous forme de sel de lithium. En effet, l'emploi de la L-sérine, un composé naturel et non toxique, permet de s'affranchir de l'utilisation de l'acide bromopyruvique, utilisé comme précurseur dans la synthèse chimique. Pour déterminer le gain de cette stratégie bi-enzymatique sur le plan environnemental, le facteur E , introduit dans les années 1990 par le Pr R. Sheldon (Pays-Bas) [285], est un indicateur de plus en plus utilisé, qui tient compte de la masse de déchets générés ($m_{\text{déchets}}$) incluant les catalyseurs chimiques ou biologiques et la masse de produit désiré formé (m_{produit}). Il à noter que le facteur E est un simple indicateur, car il ne tient pas compte des étapes de purification des produits ou encore de leur toxicité. Il est déterminé selon l'équation suivante :

$$\text{Facteur } E = \frac{m_{\text{déchets}}}{m_{\text{produit}}} \quad (3)$$

Nous avons appliqué cette équation aux deux approches envisagées. Pour l'approche développée à partir du Li-HPA synthétique, nous avons pris en compte la synthèse du Li-HPA à partir de l'acide bromopyruvique et la réaction catalysée par la TK_{gst}. Pour l'approche bi-enzymatique, nous avons également considéré l'étape de formation du HPA à partir de la L-sérine couplée à celle catalysée par la TK_{gst}. Dans les deux cas, la masse de déchets a été évaluée (réactif(s) ou substrat(s) non converti(s), enzymes, produit(s) secondaire(s) non recyclé(s)).

A titre d'exemple, le facteur E a été calculé pour le L-ribulose **3** et le 5-désoxy-L-ribulose **4** obtenus selon les deux approches. Pour la stratégie bi-enzymatique, les valeurs obtenues sont respectivement de 7,04 et de 4,16 ; pour l'approche à partir du Li-HPA synthétique, des valeurs respectives de 73,87 et de 53,45 ont été déterminées. Ces résultats illustrent le net gain sur le plan environnemental de l'approche bi-enzymatique TA_{tca}/TK_{gst} développée.

3.3.3. Conclusions

Cette approche présente donc de nombreux avantages : la production en grande quantité et à moindre coût de la TA_{tca}, la conversion totale des substrats mais également un gain sur le plan environnemental. Cependant, l'obtention du HPA est conditionnée par l'utilisation de deux substrats, la L-sérine et l'acide pyruvique. La L-sérine doit être utilisée en excès et augmente donc la quantité de « déchets ». L'acide pyruvique, quant à lui, ne peut dépasser

la concentration de 50 mM en raison de l'inhibition de la TA_{tca} et génère de plus un sous-produit non recyclé, la L-alanine. Ces paramètres peuvent être autant de facteurs limitant l'application de ce procédé à plus grande échelle. Ainsi, nous avons exploré en parallèle de cette étude, une autre stratégie pour générer le HPA *in situ* par voie enzymatique, basée sur l'utilisation d'une D-aminoacide oxydase, permettant l'obtention du HPA à partir d'un substrat unique : la D-sérine.

3.3.4. Couplage D-AAO_{rgr}/TK_{gst}

L'objectif est ici de générer le HPA *in situ* à partir de la sérine, en présence d'une aminoacide oxydase (AAO, EC 1.4.3.3), qui sera couplée à la TK_{gst}. Il existe deux types d'AAOs, qui se distinguent de part leur énantiosélectivité : les D-AAOs et les L-AAOs. Les études de spécificité de substrats de ces deux types d'enzymes ont montré que les L-AAOs acceptent préférentiellement les acides aminés hydrophobes [286]. Pour cette raison, les D-AAOs, qui elles, acceptent la D-sérine, ont donc été retenues pour l'approche envisagée dans ces travaux. Il est à noter que la D-sérine est commercialisée au même prix que la L-sérine. De plus, l'obtention de la D-sérine est développée à l'échelle industrielle par voie microbiologique (Brevet : US 7186532 B2).

Les travaux présentés dans ce paragraphe ont été réalisés en collaboration avec le Pr. L. Pollegioni et son équipe (Université de l'Insubrie de Lombardie, Italie).

3.3.4.1. Recherche d'une D-aminoacide oxydase

Les D-aminoacide oxydases (D-AAOs, EC 1.4.3.3) appartiennent à la famille des enzymes dépendantes de la flavine adénine dinucléotide ou FAD ((Figure 85 a)), un composé dérivé de la riboflavine ou vitamine B₂ ((Figure 85 b)). Ces enzymes sont communément appelées « flavoenzymes » [287].

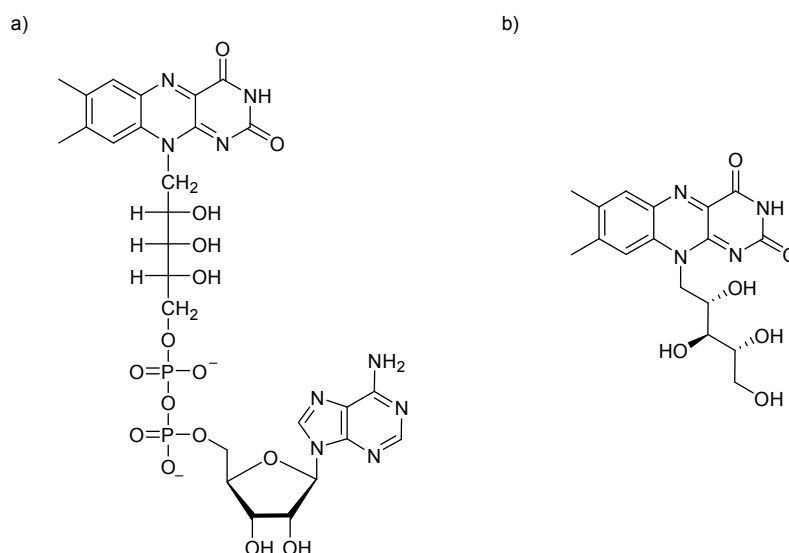


Figure 85 : Structures développées du FAD et de la riboflavine ou vitamine B₂

Les D-AAOs sont exprimées chez les organismes procaryotes et eucaryotes, dans le peroxyosome des cellules [288]. Toutefois, elles semblent être très peu présentes chez les végétaux, seule une D-AAO issue de l'algue *Chlorella vulgaris* ayant été décrite dans la littérature [288]. De plus, il est à noter que la majorité des D-AAOs décrites sont issues d'organismes eucaryotes [288] et c'est très récemment que des D-AAOs issues de bactéries ont été identifiées puis caractérisées [289].

Les D-AAOs appartiennent à la classe des oxydo-réductases et catalysent l'oxydation de la fonction amine d'un acide α -aminé de série D exclusivement, pour former l'imine correspondante, *via* la réduction concomitante du FAD. Ce composé est ensuite ré-oxydé en présence d'O₂, conduisant à la formation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'hydrolyse spontanée de la fonction imine conduit à la formation irréversible de l' α -cétoacide correspondant, accompagnée de la libération d'ions ammoniac NH₃ dans le milieu (Figure 86) [290].

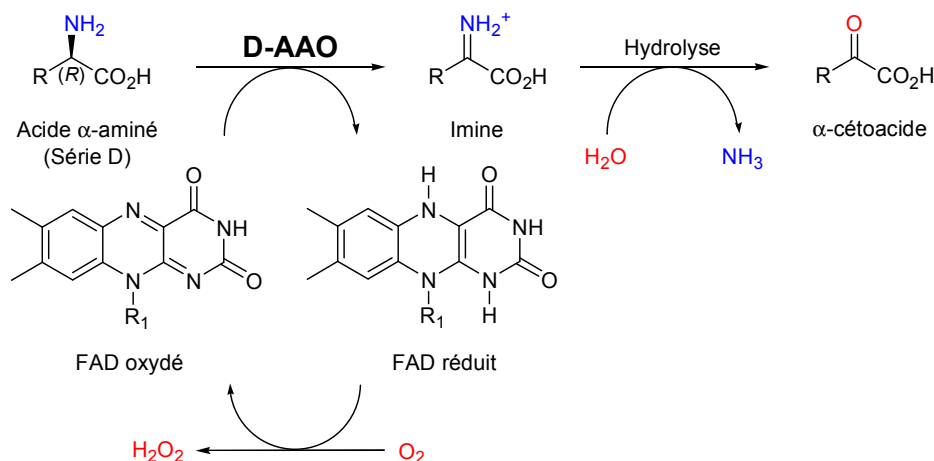


Figure 86 : Réaction catalysée par les D-AAOs

Les D-AAOs catalysent l'oxydation de la fonction amine d'acides α -aminés de série D pour former les α -cétoacides correspondants. Cette réaction est accompagnée de la libération d'ions NH_4^+ et d' H_2O_2 dans le milieu. R_1 = Unité sucre (D-ribose) reliée à l'adénoside par un groupement diphosphate.

Le peroxyde d'hydrogène généré lors de la réaction catalysée par les D-AAOs est un puissant inhibiteur de ces enzymes [291], [292]. L'ajout de catalase (EC 1.11.1.6) (Figure 87 a)), une oxydo-réductase, permet de dismuter le peroxyde d'hydrogène, conduisant à la régénération partielle du dioxygène (50%) (Figure 87 b)).

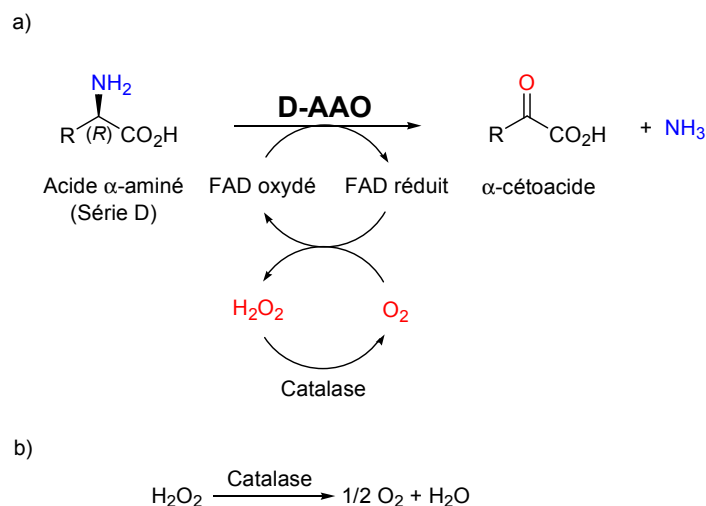


Figure 87 : Dismutation de l' H_2O_2 par la catalase

La D-AAO issue du rein de porc a été la première D-AAO identifiée par l'équipe du Pr. H. A. Krebs en 1935 [293]. Depuis, de nombreuses D-AAOs issues principalement d'organismes eucaryotes (levures, champignons, animaux) ont été identifiées, produites, purifiées puis caractérisées [288]. Celles-ci acceptent un large panel d'acides α -aminés de la série D et

préférentiellement des acides α -aminés aliphatiques linéaires et cycliques (D-valine, D-alanine, D-proline), aromatiques (D-phénylalanine, D-tryptophane) et soufrés (D-méthionine, D-cystéine) [288], [294], [295]. Les acides α -aminés chargés négativement ne sont pas acceptés par les D-AAOs ; le D-aspartate et le D-glutamate sont pris en charge par les D-aspartate oxydases (D-AspO, EC 1.4.3.1) [295].

In vitro, les D-AAOs sont employées comme biocatalyseurs pour la synthèse d' α -cétoacides à partir d'acides α -aminés de la série D, tels que la D-isoleucine et la D-valine mais également pour la préparation d'acides α -aminés de la série L non naturels, *via* le dédoublement de mélanges racémiques d'acides α -aminés [296], [297]. Toutefois, l'application prédominante de cette enzyme en biocatalyse concerne la synthèse de l'acide 7-amino-céphalosporanique ou 7-ACA, utilisé comme précurseur de certains antibiotiques [298].

L'utilisation d'une D-AAO peut donc permettre la synthèse du HPA en une étape, à partir de la D-sérine, un composé non toxique et peu onéreux et en présence d' O_2 , *via* une réaction irréversible. Le HPA ainsi synthétisé serait utilisé comme substrat donneur de la TK_{gst} , pour accéder, en présence d'un aldéhyde α -hydroxylé accepteur, au cétose (3S) correspondant (Figure 88).

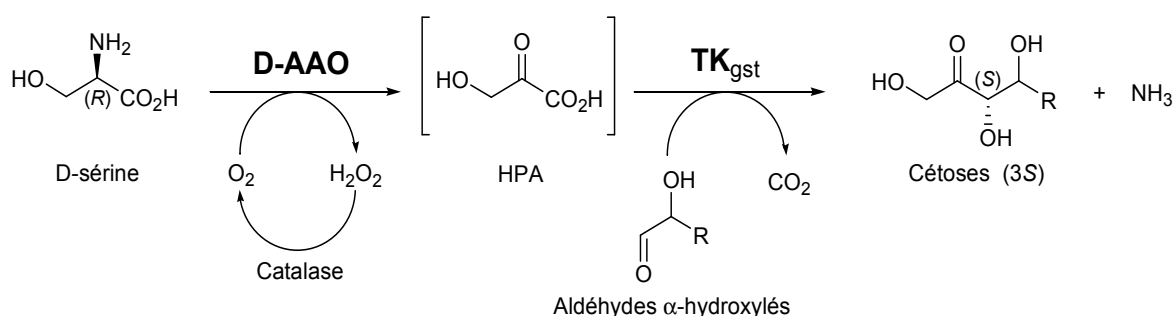


Figure 88 : Génération *in situ* du HPA catalysée par une D-AAO à partir de la D-sérine

L'utilisation d'une D-AAO pour générer le HPA *in situ* est possible seulement si l'affinité de cette enzyme vis-à-vis de la D-sérine est suffisante pour réaliser cette réaction en un temps raisonnable, la D-sérine n'étant pas un acide α -aminé préférentiellement accepté par les D-AAOs. De plus, l'utilisation simultanée de la D-AAO et de la TK_{gst} au sein d'un même réacteur (« one-pot ») nécessite que la D-AAO utilisée soit suffisamment robuste pour conserver son activité à 60°C durant au moins 24 heures.

La D-AAO issue du rein de porc commercialisée par la société Sigma-Aldrich a tout d'abord été envisagée pour générer le HPA. Cependant, sa faible activité spécifique vis-à-vis de la D-sérine n'a pas permis son utilisation pour développer la stratégie envisagée.

Une collaboration a donc été établie avec le Pr. L. Pollegioni et son équipe (Université de l'Insubrie de Lombardie, Italie). Ce groupe étudie en effet les D-AAOs depuis de nombreuses années [288], [290], [299] et plus particulièrement la D-AAO issue de la levure *Rhodotorula gracilis* [300], notée D-AAO_{rgr} dans la suite de ce manuscrit, dont la production, la purification, la caractérisation et l'immobilisation, ont fait l'objet de très nombreuses publications et revues [290]. Cette enzyme n'est pas issue d'un organisme thermophile, mais des études réalisées par ce même groupe en présence de l'enzyme immobilisée ont montré une certaine thermostabilité à température élevée [296]. L'opportunité de pouvoir produire une D-AAO au laboratoire en grande quantité et à moindre coût, afin de l'utiliser pour tester la faisabilité du couplage D-AAO/TK_{gst}, a donc été envisagée. Le groupe du Pr. L. Pollegioni nous a fourni la souche d'expression d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS transformée par le plasmide pT7-HisDAAO contenant le gène codant pour la D-AAO_{rgr}, nécessaire à la production de cette enzyme.

3.3.4.2. Production de la D-AAO de *Rhodotorula gracilis* (D-AAO_{rgr})

Expression et purification par IMAC

Le gène codant pour la D-AAO_{rgr} a été amplifié par PCR, cloné dans le vecteur d'expression pT7-HisDAAO, puis celui-ci a été inséré dans la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS. Après culture et lyse des cellules, la purification de la D-AAO_{rgr}, exprimée avec une étiquette 6-His en position N-terminale, a été réalisée par chromatographie d'affinité en présence de cations métalliques (IMAC), selon le principe présenté dans le paragraphe 1.2.2., page 72 de ce manuscrit. Toutefois, dans ce cas, cette étape a été réalisée en chambre froide à 4°C, la D-AAO_{rgr} n'étant pas une enzyme thermostable. Un protocole adapté de celui développé par le Pr. L. Pollegioni et son équipe [296] a été réalisé. Plusieurs composés tels que le 2-mercaptoéthanol (5 mM), le FAD (0,1 mM) et le glycérol (5% v/v) ont été ajoutés dans les différents tampons utilisés, afin d'assurer la stabilité de l'enzyme durant tout le protocole de purification [296], [301] (Voir *Partie Expérimentale*).

N.B. : Pour les mêmes raisons que celles explicitées précédemment dans le paragraphe 1.2.1., page 71 de ce manuscrit, seule l'ampicilline a été utilisée comme antibiotique pour la réalisation des cultures de la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS, pour la production de la D-AAO_{rgr}.

La surexpression de la D-AAO_{rgr} et la pureté de l'extrait purifié ont été vérifiées par électrophorèse « SDS-PAGE » en présence de 15% d'acrylamide [229] (Figure 89). L'électrophorégramme présente une bande unique à environ 40 kDa, correspondant au poids moléculaire d'un monomère de la D-AAO_{rgr} (Masse théorique de l'homodimère : 76,8 ±6,4 kDa [296]).

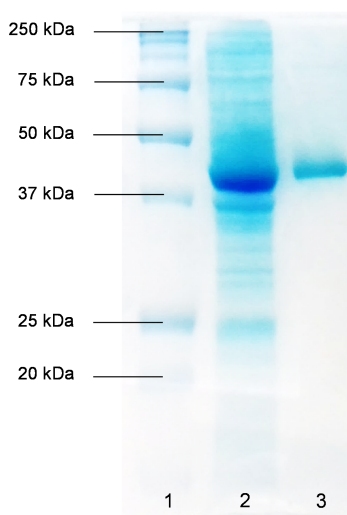


Figure 89 : Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE - Acrylamide : 15%) de la D-AAO_{rgr}. 1 : All Blue Prestained Protein Standards, Bio-Rad ; 2 : D-AAO_{rgr} (lysate cellulaire, 40 µg) ; 3 : D-AAO_{rgr} (enzyme purifiée, 5 µg)

L'activité enzymatique de la D-AAO_{rgr} a été évaluée par un test spectrophotométrique direct, en présence de la D-sérine, d'O₂ et de catalase, dans le tampon Tris 50 mM, pH 7,5, à 25°C, décrit dans la littérature [53], [302] (Figure 90). La formation du HPA au cours de la réaction conduit à la libération d'H₂O₂ dans le milieu, qui est converti en O₂ par la catalase, afin d'éviter une inhibition de la D-AAO_{rgr} [291], [292]. Le HPA formé au cours du temps est réduit en présence d'une enzyme auxiliaire, la L-lactate déshydrogénase (L-LDH) et du cofacteur NADH. La consommation du NADH, H⁺ au cours du temps est suivie par la mesure de son absorbance à 340 nm. Une unité de D-AAO_{rgr} (U) correspond à une micromole de D-sérine (ou de HPA) convertie par minute (µmol.min⁻¹). Ce test d'activité est réalisé à température ambiante en macrocuve et sera référencé par la suite sous le nom de « test D-AAO_{rgr}-L-LDH ».

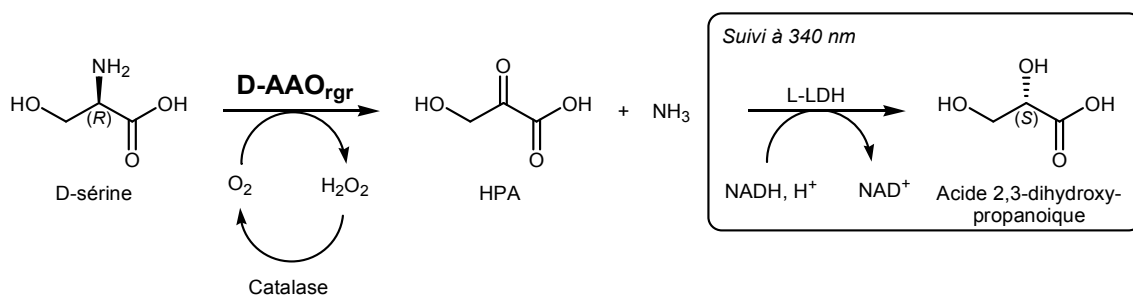


Figure 90 : Test d'activité de la D-AAO_{rgr} (« test D-AAO_{rgr}-L-LDH »)

Les conditions de ce test ont été optimisées afin d'obtenir une réponse maximale, tout en utilisant une quantité minimale de chaque composant. Le tampon Tris a préalablement été saturé en O₂ avant chaque utilisation, une activité 1,5 fois moins élevée ayant été mesurée sans la réalisation de cette étape. La concentration en D-sérine a été fixée à 50 mM, l'activité de la D-AAO_{rgr} n'augmentant plus au-delà de cette valeur. Par ailleurs, l'activité maximale de la D-AAO_{rgr} a été mesurée en présence de 7 U de L-LDH. De plus, la catalase ayant une activité spécifique très élevée, comprise en 2000 et 5000 U.mg⁻¹, l'utilisation de seulement 0,3 mg de cette enzyme a permis son ajout en large excès, afin de régénérer efficacement l'O₂ et ainsi, de ne pas inhiber la D-AAO_{rgr}. Enfin, il est important de mentionner qu'aucun ajout supplémentaire de FAD n'a été effectué pour la réalisation de ce test. En effet, l'holoenzyme est utilisée ici puisque du FAD a été ajouté au cours de l'étape de purification de la D-AAO_{rgr}. De plus, l'ajout exogène de FAD n'a pas conduit à une augmentation de l'activité de l'enzyme, un résultat similaire ayant été décrit dans la littérature [296], [301].

L'activité de la D-AAO_{rgr} a été déterminée en présence de la D-sérine, en utilisant le « test D-AAO_{rgr}-L-LDH » avant et après purification et le rendement de la purification a été calculé pour un litre de culture cellulaire (Tableau 44). Les concentrations en protéines (mg.mL⁻¹) ont été déterminées par le test de Bradford [230].

Fraction	Activité [U]	Protéines [mg]	Activité spécifique [U.mg ⁻¹]	Facteur de purification	Rendement [%]
Lysat cellulaire	6325	576	11	-	-
D-AAO _{rgr} purifiée	5386	144	37,4	3,4	85,1

Tableau 44 : Activité de la D-AAO_{rgr} avant et après purification par IMAC déterminée à l'aide du « test D-AAO_{rgr}-L-LDH » en présence de la D-sérine (50 mM) et d'O₂ à 25°C
Pour 1 L de culture cellulaire (soit 2,45 g. L⁻¹ de cellules humides)

Cette méthode de purification a permis l'obtention de 144 mg de D-AAO_{rgr} purifiées à partir de 1 L de culture contenant 2,45 g de cellules humides. L'activité spécifique de la D-AAO_{rgr},

déterminée à 25°C, est relativement élevée. A cette température, l'activité de l'enzyme représente en effet 76 % de son activité maximale à 35°C, comme présenté par la suite. Après purification, la D-AAO_{rgf} peut être lyophilisée en présence de FAD et conservée à -18°C sans perte d'activité durant plusieurs mois.

3.3.4.3. Caractérisation de la D-AAO_{rgf}

La D-AAO_{rgf} a été caractérisée par le Pr. L. Pollegioni et son équipe mais également par d'autres groupes. Cette enzyme accepte préférentiellement des acides α-aminés soufrés, aromatiques et aliphatiques. L'acide α-aminé en présence duquel son activité est maximale est la D-méthionine (Activité relative = 1). Son activité vis-à-vis de la D-sérine représente 35% de son activité vis-à-vis de cet acide α-aminé (Tableau 45) [294].

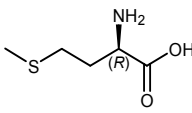
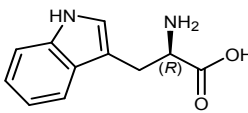
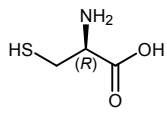
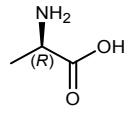
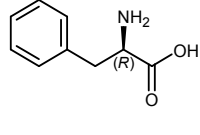
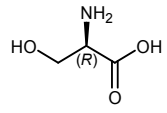
Acide α-aminé	 D-méthionine	 D-tryptophane	 D-cystéine
Activité relative	1	0,86	0,83
Acide α-aminé	 D-alanine	 D-phénylalanine	 D-sérine
Activité relative	0,79	0,76	0,35

Tableau 45 : Spectre de substrats de la D-AAO_{rgf}

Il est à noter que les acides α-aminés chargés sont très peu ou pas acceptés par la D-AAO_{rgf}, une tendance observée chez d'autres sources de D-AAOs [295], [303].

D'après la littérature, la température optimale de la D-AAO_{rgf} se situe entre 40°C [304] ou 50°C [292]. Cependant, cette enzyme conserve 100% de son activité durant 30 minutes à 1 heure dans une gamme de température comprise entre 20°C et 40°C [292] ou entre 20°C et 35°C [296]. Dans un troisième article, il est décrit qu'elle perd 12%, 20% et 30% de son activité après 30 minutes à 20°C, 25°C et 30°C, respectivement. L'hétérogénéité de ces résultats peut provenir de la variation de la température ambiante selon les conditions de réalisation des expériences et/ou du taux d'O₂ dans le milieu tamponné. De surcroît, selon la

température de travail, la dissolution de l'O₂ dans l'eau est plus ou moins efficace. Selon ces mêmes publications, le pH optimal de la D-AAO_{rgr} est de 8 [292] ou de 8,6 [304]. Cette enzyme est stable durant 30 minutes à 1 heure dans une gamme de pH comprise entre 6 et 10 [292] ou entre 7,3 et 8,2 [304].

Ainsi, compte-tenu de ces résultats, nous n'avons pas reproduit l'expérience visant à déterminer le pH optimal de la D-AAO_{rgr} et avons considéré que celui-ci était situé aux environs de 8. De plus, étant donné la disparité des résultats décrits concernant la température optimale de la D-AAO_{rgr} et sa résistance à haute température, nous avons à nouveau réalisé ces expériences au laboratoire. Enfin, la D-sérine étant le substrat d'intérêt de la D-AAO_{rgr} pour accéder au HPA, nous avons déterminé les paramètres cinétiques apparents de l'enzyme vis-à-vis de cet acide α -aminé.

Détermination de la température optimale

L'influence de la température sur l'activité et sur la stabilité de la D-AAO_{rgr} a été étudiée sur un intervalle de températures allant de 20°C à 50°C. Les réactions enzymatiques ont été réalisées à l'aide du « test D-AAO_{rgr}-L-LDH » en macrocuve, dont la température est contrôlée grâce à un thermostat à effet Peltier.

Pour déterminer l'influence de la température sur l'activité de la D-AAO_{rgr}, l'enzyme est incubée en présence de tous les composants du test dans le tampon Tris 50 mM pH 7,5 hormis la D-sérine, à la température étudiée. Lorsque celle-ci est atteinte, la réaction est initiée par l'ajout de la D-sérine.

Pour déterminer l'influence de la température sur la stabilité de la D-AAO_{rgr}, l'enzyme est incubée en présence de tous les composants du test dans le tampon Tris 50 mM pH 7,5 hormis la D-sérine, à la température étudiée durant 1 heure, puis la D-sérine est ajoutée pour initier la réaction (Figure 91).

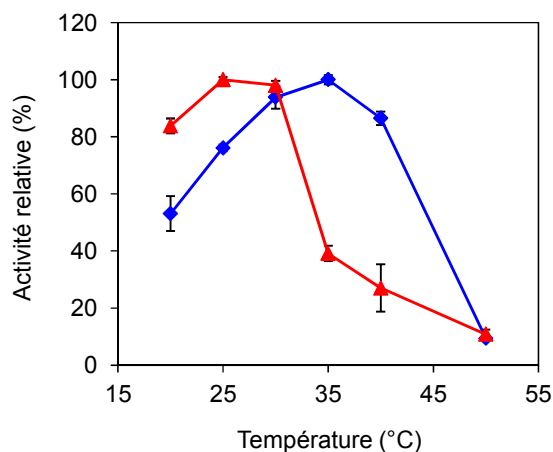


Figure 91 : Profil de l'activité \blacklozenge et de la stabilité après une heure d'incubation \blacktriangle de la D-AAO_{rgr} en fonction de la température. L'activité de la D-AAO_{rgr} est déterminée à l'aide du « test D-AAO_{rgr}-L_{LDH} » en présence de la D-sérine (50 mM) et d'O₂. L'activité maximale (100%) obtenue à 35°C correspond à une activité spécifique de 49,1 U.mg⁻¹. A 20°C, l'activité spécifique est de 26,1 U.mg⁻¹.

La température optimale de la D-AAO_{rgr} se situe à 35°C. L'activité de cette enzyme augmente d'un facteur 2 environ entre 20°C (26,1 U.mg⁻¹) et 35°C (49,1 U.mg⁻¹), puis diminue drastiquement au-dessus de 40°C. En revanche, après 1 heure d'incubation aux différentes températures testées, la D-AAO_{rgr} conserve respectivement 100% (37,5 U.mg⁻¹) et 98% (36,6 U.mg⁻¹) de son activité à 25°C et 30°C, mais seulement 39% (14,6 U.mg⁻¹) et 27% (10,1 U.mg⁻¹) à 35°C et 40°C, respectivement. Les résultats obtenus sont proches de ceux décrits dans la littérature : l'activité optimale de l'enzyme est proche de 40°C. Néanmoins, l'enzyme est peu stable après une heure d'incubation à une température supérieure à 30°C, dans les conditions du test.

Nous avons complété ces expériences par l'étude de la stabilité de la D-AAO_{rgr} à 25°C et 30°C sur une plus longue durée. En effet, la vérification de la stabilité de l'enzyme sur une durée d'au moins 24 heures est nécessaire, en amont de son utilisation en synthèse. De plus, la D-AAO_{rgr} n'étant pas issue d'un organisme thermophile, la conservation de l'activité de cette enzyme à 30°C sur le long terme permettrait la réalisation du couplage D-AAO_{rgr}/TK_{gst} à cette température, plus proche de la température optimale de la TK_{gst}. Enfin, la stabilité de l'enzyme à 40°C et 60°C a également été évaluée sur le long terme, à titre de comparaison.

Etude de la thermostabilité

La stabilité de la D-AAO_{rgr} a été examinée sur une durée de 24 heures, à 30°C, 40°C et 60°C et pendant 72 heures, à 25°C. L'enzyme a été mise en solution dans le tampon Tris 50 mM, pH 7,5 dans un microtube d'1,5 mL, placé sur une table d'agitation thermostabilisée. Des échantillons ont été prélevés au cours du temps et dosés selon le « test D-AAO_{rgr}-L-DH », à 25°C (Figure 92).

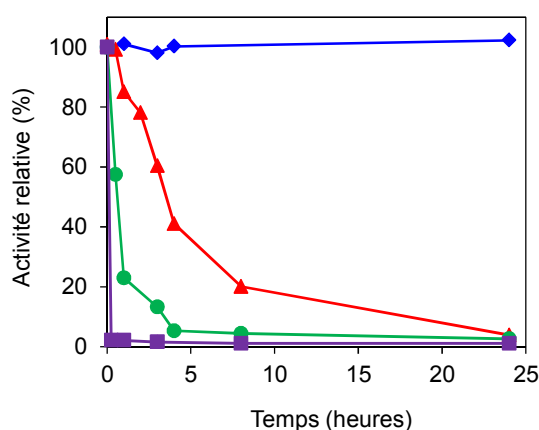


Figure 92 : Thermostabilité de la D-AAO_{rgr}

L'activité de la D-AAO_{rgr} est déterminée à l'aide du « test D-AAO_{rgr}-L-DH » en présence de la D-sérine (50 mM) et d'O₂ à 25°C. 100 % représente l'activité initiale de la D-AAO_{rgr} (37,5 U.mg⁻¹ à 25°C).

Températures d'incubation : ◆ 25°C ▲ 30°C ● 40°C ■ 60°C

La Figure 92 montre que la D-AAO_{rgr} est parfaitement stable durant 24 heures à 25°C. Cependant, à 30°C, 40°C et 60°C, son activité diminue drastiquement en quelques heures. A 30°C, la D-AAO_{rgr} perd 60% de son activité après 4 heures d'incubation et 80% de son activité après 8 heures. Une étude sur une plus longue durée a montré que la D-AAO_{rgr} conserve 100 % de son activité durant 72 heures à 25°C.

Activité spécifique et paramètres cinétiques apparents vis-à-vis de la D-sérine

L'activité spécifique de la D-AAO_{rgr} vis-à-vis de la D-sérine (50 mM) est de $37,4 \pm 2,06$ U.mg⁻¹, à 25°C. Les paramètres cinétiques apparents K_M^{app} et V_{max}^{app} de la D-AAO_{rgr} vis-à-vis de ce substrat ont été déterminés à cette même température, à laquelle l'activité de la D-AAO_{rgr} représente 76 % de son activité à 35°C, en présence d'O₂ et de catalase. Les réactions enzymatiques ont été réalisées en macrocuve et l'activité enzymatique de la D-AAO_{rgr} a été déterminée avec le « test D-AAO_{rgr}-L-DH », pour chaque concentration en D-sérine testée (Tableau 46).

	D-AAO _{rgr}		
	K _M ^{app}	V _{max} ^{app}	V _{max} ^{app} /K _M ^{app}
	[mM]	[U.mg ⁻¹]	[U.mg ⁻¹ .mM ⁻¹]
D-sérine	14,9±2,4	47,9±5,5	3,2

Tableau 46 : Paramètres cinétiques apparents de la D-AAO_{rgr} déterminés vis-à-vis de la D-sérine (2-50 mM) et en présence d'O₂ à l'aide du « test D-AAO_{rgr}-L-LDH » à 25°C

La méthode de Hanes-Woolf a permis de déterminer un K_M^{app} de 14,9 ± 2,4 mM et une V_{max}^{app} de 47,9 ± 5,5 U.mg⁻¹, des valeurs similaires ayant été déterminées par le groupe du Pr. L. Pollegioni [304]. A titre de comparaison, des rapports V_{max}^{app}/K_M^{app} nettement supérieurs ont été déterminés vis-à-vis des acides α-aminés préférentiellement acceptés par la D-AAO_{rgr} (D-méthionine, D-tryptophane, D-alanine, D-phénylalanine) [304]. En revanche, des rapports V_{max}^{app}/K_M^{app} du même ordre de grandeur que celui déterminé pour la D-sérine ont été obtenus vis-à-vis de la D-cystéine et de la D-valine, l'activité de la D-AAO_{rgr} vis-à-vis de ces deux substrats représentant respectivement 83% et 68% de son activité maximale, déterminée en présence de la D-méthionine [294], [304].

En conclusion, la D-AAO issue de la levure *R. gracilis* a été choisie. Celle-ci accepte la D-sérine comme substrat. Les résultats obtenus à des températures supérieures à 25°C montrent une forte diminution de l'activité de l'enzyme en peu de temps, ce qui n'est pas compatible avec les durées des synthèses que nous envisageons de réaliser. A 25°C, la D-AAO_{rgr} conserve 100% de son activité durant 3 jours. A cette température, l'activité de l'enzyme représente 76 % de son activité à 35°C. L'utilisation de cette enzyme pour générer le HPA *in situ* à partir de la D-sérine, couplée à la réaction catalysée par la TK_{gst} peut donc être envisagée, mais à une température de 25°C.

3.3.4.4. Synthèse de cétooses (3S) et D-thréo (3S, 4R) à 25°C

Le couplage de la D-AAO_{rgr} et de la TK_{gst} n'étant pas possible à des températures supérieures à 25°C, l'emploi d'aldéhydes α-hydroxylés (2S) utilisés précédemment avec la TA_{tca} n'est donc pas envisageable, compte-tenu de la très faible activité de la TK_{gst} vis-à-vis de ceux-ci à température ambiante. Ainsi, nous avons utilisé le glycolaldéhyde et deux aldéhydes α-hydroxylés (2R) à 3 et 4 atomes de carbone, le D-glycéraldéhyde (C3) et le L-thréose (C4), afin d'accéder aux cétooses (3S) et D-thréo (3S, 4R) correspondants. De plus, le pH optimal de la D-AAO_{rgr} étant de 8 et celui de la TK_{gst} de 7, les réactions couplées D-AAO_{rgr}/TK_{gst} ont été réalisées à pH 7,5. A ce pH, l'activité de la D-AAO_{rgr} représente 77 % de son activité maximale, mesurée à pH 8 [292] ; l'activité de la TK_{gst} représente 97 % de son

activité à pH 7, son pH optimal. Enfin, il est à noter que même à ce pH légèrement basique, la dégradation du HPA est négligeable à température ambiante.

Dans un premier temps, l'utilisation de la D-AAO_{gr} pour générer le HPA *in situ* à 25°C en présence de la TK_{gst} a été réalisée avec le glycolaldéhyde, le meilleur substrat accepteur non naturel de la TK_{gst}, comme « preuve de concept » du couplage D-AAO_{gr}/TK_{gst} à température ambiante (Figure 93).

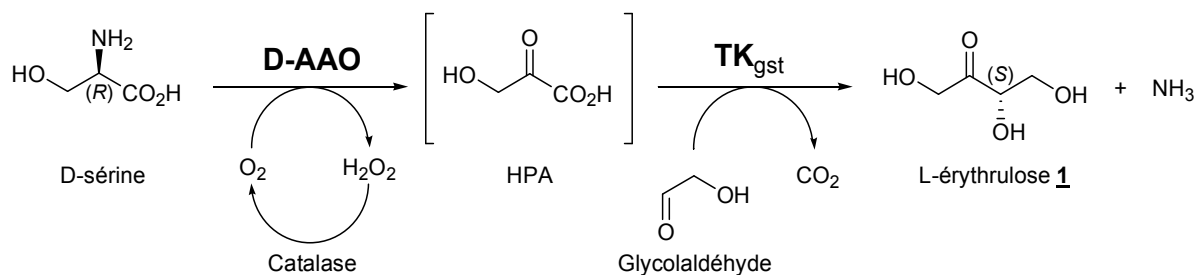
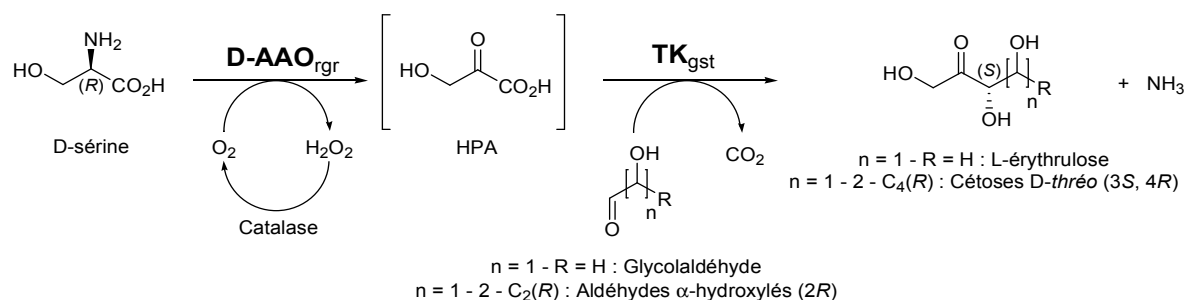


Figure 93 : Couplage D-AAO_{gr}/TK_{gst} pour la synthèse du L-érythrose 1 à l'échelle préparative à partir du glycolaldéhyde à 25°C

La D-sérine et le glycolaldéhyde ont été introduits en quantité équimolaire (1 mmol, 50 mM). Les cofacteurs de la TK_{gst} ont été utilisés aux concentrations fixées à la suite de l'étape d'optimisation des conditions réactionnelles pour minimiser la dégradation du Li-HPA, c'est-à-dire [ThDP] = 0,1 mM et [Mg²⁺] = 1 mM. 6 mg de TK_{gst} ont été utilisés, la même quantité employée pour les synthèses réalisées à partir du Li-HPA synthétique, présentées précédemment. 1 mg de D-AAO_{gr} et 1 mg de catalase ont été employés, correspondant à un nombre d'unités respectif de 37,4 U et 3500 U en moyenne, à 25°C. Le couplage a été réalisé dans l'eau pure à 25°C et à pH 7,5, le pH étant maintenu constant au cours du temps *via* l'addition d'HCl 0,1 M, réalisée par un pH-stat. Le milieu a préalablement été saturé en O₂ avant l'addition des réactifs et un apport constant en O₂ a été effectué durant toute la durée de réalisation de l'expérience, grâce à l'utilisation d'un débitmètre pour gaz. L'activité de la D-AAO_{gr} étant très sensible à la teneur en O₂, le couplage a été réalisé sous un apport d'O₂ constant de 4 mL.min⁻¹, débit minimal autorisé par l'appareillage.

Le couplage D-AAO_{rgf}/TK_{gst} réalisé dans ces conditions a été suivi par RMN ¹H *in situ* en présence du TSP-d₄. Après 24 heures de réaction, la conversion de la D-sérine et du glycolaldéhyde est incomplète. De plus, la présence d'acide glycolique a été détectée. Ce sous-produit résulte d'une dégradation du HPA (mise en évidence précédemment dans le paragraphe 3.1.1.2. de ce chapitre). Cette observation indique qu'une partie du HPA généré *in situ* s'accumule dans le milieu. Compte-tenu de ce premier résultat, nous avons émis l'hypothèse que l'activité de la catalase diminuait au cours du temps, conduisant à une accumulation d'H₂O₂ dans le milieu. La présence de cet oxydant entraînerait d'une part, une dégradation du HPA en acide glycolique et d'autre part, une partielle inhibition de la D-AAO_{rgf}, empêchant une conversion efficace de la D-sérine en HPA et *in fine*, une conversion efficace du glycolaldéhyde pour former le L-érythrulose **1**.

Lors d'un second essai, nous avons utilisé la même quantité de catalase mais celle-ci a été ajoutée progressivement, au début de la réaction puis après 2 heures et 4 heures, la conversion du glycolaldéhyde se produisant durant les premières heures de la réaction. De plus, la D-AAO_{rgf} a également été ajoutée graduellement, une instabilité partielle de cette enzyme ayant été constatée, même sous un débit d'O₂ de 4 mL.min⁻¹. Dans ces nouvelles conditions, une conversion complète de la D-sérine et du glycolaldéhyde a été constatée après 24 heures (taux de conversion supérieur à 99%) et une quantité négligeable d'acide glycolique a été mesurée (3% de la quantité initiale de HPA) (Tableau 47). Après purification, le L-érythrulose **1** a été obtenu avec un rendement de 44%, un rendement identique ayant été obtenu lors de la synthèse du L-érythrulose **1** réalisée dans les mêmes conditions à partir du Li-HPA synthétique. Ainsi, ces conditions ont, dans un second temps, été appliquées pour la synthèse du D-xylulose **2** et du L-sorbose **8**, à partir respectivement du D-glycéraldéhyde et du L-thréose (Tableau 47).



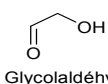
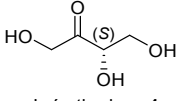
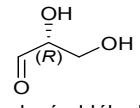
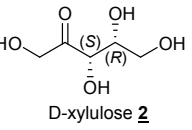
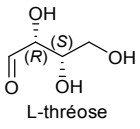
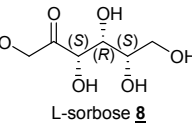
Glycolaldéhyde - Aldéhydes α -hydroxylés (2R)	Cétoses (3S) et D-thréo (3S, 4R)	Taux de conversion [%] ¹		Temps réactionnel [h]	Rendement [%]	ed ² [%]
		D-sérine	Aldéhydes			
 Glycolaldéhyde	 L-érythrose <u>1</u>	> 99	> 99	24	44	> 95
 D-glycéraldéhyde	 D-xylulose <u>2</u>	> 99	> 99	24	65	> 95
 L-thréose	 L-sorbose <u>8</u>	> 99	> 99	24	63	> 95

Tableau 47 : Synthèses « one-pot » du L-érythrose 1, du D-xylulose 2 et du L-sorbose 8 catalysées par la D-AAO_{rgr} et la TK_{gst} à 25°C. ¹Déterminés par RMN ¹H *in situ* en présence d'un étalon interne (TSP-d₄). ²Déterminés par RMN ¹³C

Dans ces conditions réactionnelles, d'excellents taux de conversion de la D-sérine, du D-glycéraldéhyde et du L-thréose ont été obtenus après 24 heures (< 99%). Le D-xylulose 2 a été obtenu avec un rendement de 65%, inférieur à celui déterminé dans le cas de la synthèse du D-xylulose 2, réalisée à 60°C, à partir du Li-HPA synthétique, *i.e.* 87%. En revanche, le L-sorbose 8 a été synthétisé avec un rendement de 63%, légèrement supérieur à celui déterminé dans le cas de la synthèse du L-sorbose 8, réalisée à 60°C, à partir du Li-HPA synthétique, *i.e.* 57%. Nous ne sommes pas parvenus à déterminer la(es) cause(s) de la diminution du rendement du D-xylulose 2 dans le cas du couplage D-AAO_{rgr}/TK_{gst}. Pour les trois synthèses réalisées, un seul diastéréoisomère a été identifié par RMN ¹³C (*ed* supérieurs à 95%) et la mesure des pouvoirs rotatoires des produits purifiés a permis de confirmer la pureté optique des composés par comparaison avec les valeurs données dans la littérature.

Comparaison avec la stratégie impliquant la TA_{tca}

Cette étude a permis de montrer que la D-AAO_{rgr} permet la génération *in situ* du HPA à température ambiante, à partir d'un seul substrat non toxique et très peu coûteux : la D-sérine. Le couplage des réactions catalysées par la D-AAO_{rgr} et la TK_{gst}, réalisé de façon simultanée selon une stratégie « one-pot », a permis de synthétiser le L-érythrose **1**, un cétose de configuration (3S) et deux cétooses de configuration D-thréo (3S, 4R), le D-xylulose **2** et le L-sorbose **3**, à partir des aldéhydes α -hydroxylés (2R) correspondants, avec une conversion totale des substrats et de bons rendements. Cette seconde stratégie bi-enzymatique, alternative à celle présentée précédemment, impliquant la TA_{tca} , présente l'avantage d'utiliser un seul substrat et de ne pas générer de sous-produits. De plus, la D-sérine, totalement convertie, est utilisée en quantité équimolaire avec les aldéhydes, eux-mêmes complètement convertis.

Détermination du facteur E

A titre d'exemple, le facteur E a été déterminé dans le cas de la synthèse du L-sorbose **3** et comparé à celui obtenu dans le cas de la synthèse de ce même composé réalisée à partir du Li-HPA synthétique. Une valeur de 10,31 a été obtenue dans ce dernier cas, tandis qu'une valeur de 1,62 a été calculée dans le cas du couplage D-AAO_{rgr}/TK_{gst}, illustrant une diminution significative de la masse de déchets générés *via* cette cascade bi-enzymatique.

3.3.5. Conclusions

Cette stratégie présente donc de nombreux avantages : la production en grande quantité et à moindre coût de la D-AAO_{rgr}, l'irréversibilité de la réaction et l'absence de sous-produits, entraînant une diminution des déchets et donc, un gain sur le plan environnemental. Cependant, il est impossible de réaliser le couplage D-AAO_{rgr}/TK_{gst} à des températures supérieures à 25°C, la D-AAO_{rgr} n'étant pas stable à de telles températures sur le long terme. Ceci ne permet donc pas d'utiliser de « mauvais » substrats de la TK_{gst}, dont l'emploi nécessite une température de 60°C. Plusieurs options sont envisageables pour améliorer cette approche : 1) la génération du HPA par la D-AAO_{rgr} à 25°C peut être réalisée indépendamment dans un premier temps puis la TK_{gst} peut être introduite ensuite, le milieu pouvant alors être porté à 60°C ; 2) l'immobilisation de la D-AAO_{rgr} pourrait être envisagée pour améliorer sa résistance à la température, ceci ayant déjà été envisagé par le groupe du Pr. L. Pollegioni [296] ; 3) une D-AAO issue d'un microorganisme thermophile pourrait être

recherchée dans la biodiversité. Ces différentes options sont actuellement étudiées dans le cadre d'un projet ayant débuté en septembre 2017 pour 2 ans, financé par la région Auvergne, en partenariat avec BPI France et soutenu par l'entreprise Greentech.

Le développement des cascades bi-enzymatiques D-AAO_{rgt}/TK_{gst} pour la synthèse de cétooses de configuration de configuration (3S) et D-thréo (3S, 4R) fera l'objet d'une publication, actuellement en cours de rédaction.

3.4. Cascades bi-enzymatiques pour la génération des aldéhydes α -hydroxylés (2S)

Comme nous l'avons vu précédemment, la TK_{gst} est capable de convertir les aldéhydes α -hydroxylés (2S) à 3 et 4 atomes de carbone. De surcroît, nous avons identifié de nouvelles TK_{gst} mutées performantes, significativement plus actives que l'enzyme sauvage vis-à-vis du L-glycéraldéhyde, du D-thréose et du L-érythrose. L'emploi de ces aldéhydes permet l'accès, en présence du Li-HPA comme substrat donneur, à des cétooses L-érythro (3S, 4S), des composés à haute valeur ajoutée et présentant de nombreuses applications, notamment dans les secteurs pharmaceutique et agroalimentaire (les applications détaillées de ces composés sont décrites dans le paragraphe 2.1. de la *Partie Résultats et Discussions*).

Les aldéhydes α -hydroxylés (2S) à 3 et 4 atomes de carbone sont commercialisés par les sociétés Sigma-Aldrich et CarboSynth mais sont très onéreux (L-glycéraldéhyde : 844€/1g ; D-thréose : 350€/1g ; L-érythrose : 420€/1g), limitant leur utilisation pour la réalisation de synthèses enzymatiques à grande échelle. L'obtention de ces substrats par voie enzymatique en une étape a été décrite en 2015 par l'équipe du Pr. P. Clapés (Institut de Chimie Avancée de Catalogne, Barcelone, Espagne), *via* une réaction d'aldolisation, catalysée par la D-fructose-6-phosphate aldolase d'*E. coli* (FSA_{eco}, EC 4.1.2.13) sauvage ou mutée, à partir du glycolaldéhyde et/ou du formaldéhyde, deux aldéhydes à très courte chaîne carbonée achiraux, moins coûteux [305].

3.4.1. Les aldolases

La réaction d'aldolisation consiste en une attaque du carbone α (nucléophile) d'un aldéhyde ou d'une cétone sur le carbone (électrophile) du groupement carbonyle d'un autre aldéhyde

ou cétone, générant ainsi un β -hydroxyaldéhyde ou une β -hydroxycétone, respectivement, (Figure 94).

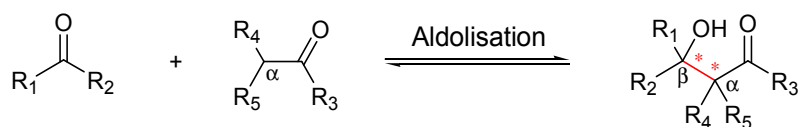


Figure 94 : Schéma général de la réaction d'aldolisation

L'aptitude à former des liaisons C-C et à générer deux nouveaux centres asymétriques fait de l'aldolisation une des réactions les plus utilisées en chimie organique pour la synthèse d'une grande variété de composés polyhydroxylés complexes énantiomériquement purs [306]. La stéréochimie des centres asymétriques formés peut être contrôlée par l'utilisation d'acides de Lewis, d'organocatalyseurs ou encore d'auxiliaires chiraux. Toutefois, ces stratégies nécessitent l'emploi de solvants organiques polluants et la réalisation d'étapes de protection et déprotection [261]. Une alternative efficace consiste à utiliser des catalyseurs chiraux biologiques comme les aldolases, permettant la formation stéréosélective d'une nouvelle liaison C-C, *via* un procédé de synthèse non toxique et plus économique [306].

Les aldolases (EC 4.1.2.-) appartiennent à la classe des lyases et représentent une large famille d'enzymes, qui catalysent *in vivo* une réaction d'addition réversible d'un substrat donneur nucléophile (α -hydroxycétones, aldéhydes, acides aminés) sur un aldéhyde accepteur électrophile. Elles permettant ainsi d'accéder à des composés polyhydroxylés, des acides aminés et des analogues de ces molécules, *via* la formation hautement stéréosélective d'une nouvelle liaison C-C, la stéréochimie des deux centres asymétriques formés étant dépendante de la sous-famille à laquelle appartient l'aldolase [306], [307].

Les aldolases sont généralement regroupées selon leur mécanisme catalytique d'activation du substrat donneur nucléophile. On distingue ainsi les aldolases de classe I, dont le résidu lysine hautement conservé forme une base de Schiff ($R_1R_2C=NR_3$) avec le substrat donneur, générant un intermédiaire de type énamine et les aldolases de classe II, où l'intermédiaire généré est un énolate, obtenu *via* la complexation du substrat donneur (base de Lewis) par un cation métallique tels que Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} ou Mn^{2+} , relié à des résidu His dans le site actif de l'enzyme et jouant le rôle d'acide de Lewis [261], [306].

Si les aldolases sont très tolérantes vis-à-vis d'une large variété d'aldéhydes accepteurs électrophiles non naturels, elles sont au contraire très spécifiques de leur substrat donneur

naturel et n'acceptent quasiment pas de variation structurale de ce dernier. Cette spécificité a conduit au développement d'une seconde classification de ces enzymes en cinq grandes sous-familles d'aldolases, rassemblées en fonction de leur substrat donneur physiologique : les pyruvate/oxaloacétate/2-oxobutyrate aldolases, les DHAP aldolases, les DHA aldolases, les glycine/alanine aldolases et les acétaldéhyde aldolases [306]. Ainsi, leur diversité ainsi que leurs propriétés catalytiques et notamment leurs stéréosélectivités, font des aldolases des biocatalyseurs de choix en synthèse organique, pour l'obtention d'une large variété de composés polyhydroxylés optiquement purs et d'acides aminés [306].

Une nouvelle aldolase issue de la bactérie *E. coli*, notée FSA_{eco} dans la suite de ce manuscrit, a été découverte par l'équipe du Pr G. A. Sprenger en 2001 [308]. Cette enzyme appartient à la sous-famille des DHA aldolases et catalysent l'addition stéréosélective réversible de la dihydroxyacétone ou DHA sur le D-G3P, pour former le D-F6P, d'où son appellation : D-fructose-six-phosphate aldolase (FSA). Il est à noter que le rôle physiologique de cette enzyme est toujours méconnu à ce jour, le D-F6P n'ayant jamais été proposé dans la littérature comme substrat d'une autre aldolase (Figure 95).

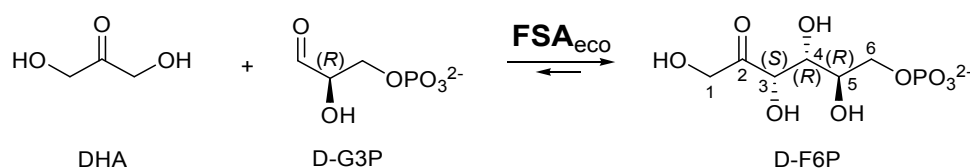


Figure 95 : Réaction d'aldolisation catalysée par la FSA_{eco}

La FSA_{eco} est hautement stéréosélective et conduit à l'obtention de monosaccharides de configuration (3*S*, 4*R*) dans le sens de l'aldolisation. Elle appartient à la classe I des aldolases et ne nécessite donc pas la présence d'un cation métallique pour être active [308]. Bien qu'elle soit issue d'un microorganisme mésophile, la FSA_{eco} est active dans une large gamme de températures, comprises entre 20°C et 75°C et sa stabilité à haute température est comparable à celle des enzymes thermostables : son activité est en effet parfaitement conservée durant 25 jours à 45°C et son temps de demie-vie est de 8 jours, 30 heures et 16 heures, à 55°C, 65°C et 75°C, respectivement. Enfin, la FSA_{eco} est active dans une large gamme de pH, compris entre 6 et 12, avec une activité maximale mesurée à un pH aux environs de 8,5 [308].

Son substrat donneur naturel est le DHA ($K_M = 35$ mM, $V_{max} = 45$ U.mg⁻¹ [308]). Toutefois, elles se distinguent des autres aldolases décrites dans la littérature par sa remarquable

tolérance vis-à-vis d'un large panel de cétones et d'aldéhydes, acceptés comme substrat donneur de façon inédite. Elle est en effet capable de convertir une large gamme de cétones linéaires (hydroxyacétone, hydroxybutanone, propanone, butanone) et cycliques (cyclopentanone) mais également des aldéhydes comme l'acétaldéhyde ou le glycolaldéhyde ($K_M = 0,2 \text{ mM}$, $V_{max} = 0,22 \text{ U.mg}^{-1}$ [309]). De surcroît, le développement récent de simple, double, triple et quadruple mutants de cette enzyme par le groupe du Pr. P. Clapés, en collaboration avec l'équipe des Pr. W.-D. Fessner et M. Lemaire (Equipe BioMéta, ICCF), a permis d'étendre ce panel à des cétones présentant une longue chaîne aliphatique, un groupement isopropyl, une fonction éther, ou encore une insaturation [310], [311].

Ainsi, la faible sélectivité de la FSA_{eco} vis-à-vis de son substrat donneur et l'utilisation de mutants performants de cette enzyme, obtenus par mutagenèse par saturation de site sur les résidus clés du site actif, ont permis d'accéder, en présence d'aldéhydes accepteurs naturels ou non, à un large éventail de monosaccharides et analogues d'une très grande diversité structurale [310], [311].

Notre objectif est d'utiliser la FSA_{eco} et certains de ses mutants pour obtenir les trois aldéhydes α -hydroxylés ciblés, le L-glycéraldéhyde **13**, le D-thréose **14** et le L-érythrose **15**, qui seront utilisés pour la préparation des cétooses L-érythro (3S, 4S) correspondants, le L-ribulose **3**, le D-tagatose **5** et le L-psicose **6**. Des études développées par le Pr. P. Clapés et son équipe ont montré que la FSA_{eco} sauvage permet d'accéder au L-glycéraldéhyde **13**, à partir du glycolaldéhyde comme substrat donneur et du formaldéhyde comme substrat accepteur, avec un bon rendement et une très haute stéréosélectivité [305]. De plus, le D-thréose **14** peut être obtenu avec une très bonne stéréosélectivité à partir du glycolaldéhyde, utilisé à la fois comme substrat donneur et comme substrat accepteur du mutant A129G. Enfin, le double mutant A165G/S166P permet de catalyser la synthèse du L-érythrose **15** par condensation du glycolaldéhyde sur lui-même. Ce mutant présente une stéréosélectivité inversée par rapport à la FSA_{eco} sauvage et conduit ainsi à l'obtention d'une configuration (4S).

Par conséquent, la FSA_{eco} et les mutants A129G et A165G/S166P permettent d'accéder efficacement au L-glycéraldéhyde **13**, au D-thréose **14** et au L-érythrose **15**, respectivement. Nous avons envisagé de coupler ces enzymes à la TK_{gst} pour obtenir les cétooses L-érythro (3S, 4S) correspondants, ces deux réactions en cascade n'ayant jamais été envisagées dans la littérature pour accéder à des cétooses présentant cette configuration. Une collaboration avec le groupe du Pr. P. Clapés a ainsi été établie et j'ai eu l'occasion d'effectuer un stage d'un mois dans son laboratoire, pour effectuer en partie les résultats

présentés ici. Le Pr. P. Clapés nous a ensuite fourni les trois souches d'expression d'*E. coli* M-15 [p-REP-4], transformées chacune par le plasmide pQE40 contenant le gène codant pour la FSA_{eco}, le mutant A129G ou le mutant A165G/S166P, nécessaires à la production de ces enzymes au laboratoire.

3.4.2. Production de la FSA d'*E. coli* (FSA_{eco}) et des mutants A129G et A165G/S166P

Les gènes codants pour la FSA_{eco} et les mutants A129G et A165G/S166P ont été amplifiés par PCR, clonés dans le vecteur d'expression pQE40, puis insérés dans la souche d'*E. coli* M-15 [pREP-4]. La FSA_{eco} et les mutants A129G et A165G/S166G ne sont pas exprimés avec une étiquette 6-His comme les enzymes obtenues précédemment et ne peuvent donc pas être purifiées par chromatographie d'affinité. Une autre stratégie est utilisée dans ce cas, qui est basée sur leur thermostabilité. Ainsi, les trois enzymes ont été purifiées par traitement thermique selon un protocole adapté de celui développé par le Pr. P. Clapés et son équipe [305], une méthode simple et rapide, dont l'efficacité est proche des résultats obtenus par chromatographie d'affinité.

Après culture et lyse des cellules, chaque lysat cellulaire est chauffé durant 30 minutes à 70°C. Les protéines issues de la cellule hôte (*E. coli*) précipitent à cette température, alors que la FSA_{eco} et les mutants A129G et A165G/S166P restent en solution. Après centrifugation, chaque surnageant contient ainsi l'enzyme d'intérêt purifiée, en solution dans le tampon Gly-gly 50 mM, pH 8,5, le tampon dans lequel l'activité et la stabilité de la FSA_{eco} sont maximales [308]. Dans l'optique de coupler ces enzymes à la TK_{gst} à 60°C, il est essentiel que celles-ci soient recueillies en solution dans l'eau, afin de limiter la dégradation du Li-HPA à haute température en milieu tamponné. C'est pourquoi deux étapes de dialyse ont été effectuées pour remplacer ce tampon par de l'eau pure à pH 8,5. Cette méthode de purification alternative a permis l'obtention d'environ 60 mg de chaque enzyme purifiée, à partir de 600 mL de culture, contenant environ 1,1 g de cellules humides (Tableau 48).

FSA _{eco}		A129G		A165G/S166P	
Culot cellulaire	FSA _{eco} purifiée	Culot cellulaire	A129G purifiée	Culot cellulaire	A165G/S166P purifiée
[g]	[mg]	[g]	[mg]	[g]	[mg]
1,01 ¹	61	1,10 ¹	57	1,33 ¹	59

Tableau 48 : Bilan de la purification par choc thermique de la FSA_{eco} et des mutants A129G et A165G/S166P. ¹Pour 600 mL de culture cellulaire (masse du culot cellulaire donnée en masse de cellules humides)

Dans cette étude, l'activité des enzymes n'a pas été déterminée à l'échelle analytique à la suite de l'étape de purification. Celles-ci ont directement été utilisées à plus grande échelle, pour la réalisation des synthèses des aldéhydes α -hydroxylés (2S), présentées par la suite. Toutefois, leur activité spécifique vis-à-vis du DHA comme substrat donneur et du D,L-glycéraldéhyde-3-phosphate (D,L-G3P) comme substrat accepteur a été mesurée par l'équipe du Pr. P. Clapés, via un test d'activité spectrophotométrique décrit dans la littérature [305]. Les activités spécifiques de la FSA_{eco}, du mutant A129G et du mutant A165G/S166P sont respectivement de $0,22 \pm 0,01 \text{ U.mg}^{-1}$, $0,36 \pm 0,1 \text{ U.mg}^{-1}$ et $0,04 \pm 0,01 \text{ U.mg}^{-1}$ [305]. Ces enzymes purifiées, en solution dans l'eau, peuvent être lyophilisées et conservées à -18°C durant plusieurs mois sans perte d'activité.

La surexpression et la pureté des extraits purifiés de la FSA_{eco} et des mutants A129G et A165G/S166P ont été vérifiées par électrophorèse « SDS-PAGE » en présence de 15% d'acrylamide [229] (Figure 96). Pour les trois enzymes, l'électrophorégramme présente une bande unique à environ 22 kDa, correspondant au poids moléculaire d'un monomère de la FSA_{eco} (Masse théorique d'un monomère : 22,998 kDa [308]).

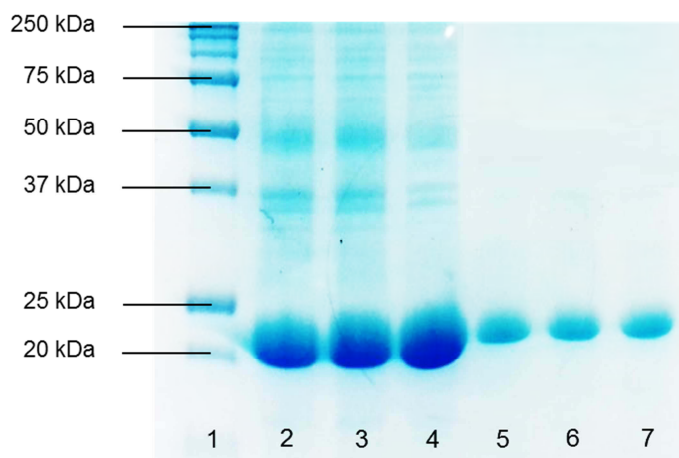
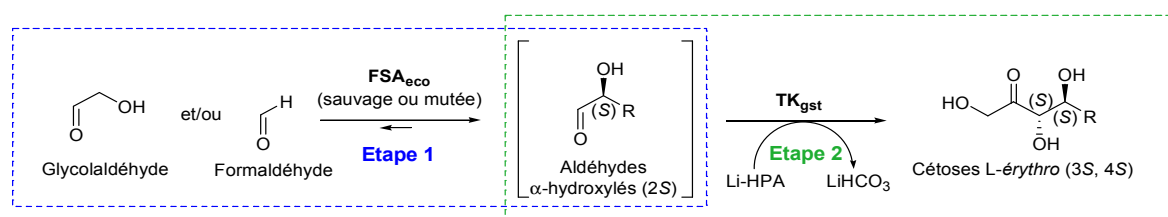


Figure 96 : Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE - Acrylamide : 15%) de la FSA_{eco} et des mutants A129G et A165G/S166P. 1 : All Blue Prestained Protein Standards, Bio-Rad ; 2 : FSA_{eco} (lysate cellulaire, 40 μg) ; 3 : A129G (lysate cellulaire, 40 μg) ; 4 : A165G/S166P (lysate cellulaire, 40 μg) ; 5 : FSA_{eco} (enzyme purifiée, 15 μg) ; 6 : A129G (enzyme purifiée, 15 μg) ; 7 : A129G/S166P (enzyme purifiée, 15 μg) ;

3.4.3. Couplage FSA_{eco} (sauvage ou mutée)/TK_{gst}

La FSA_{eco} sauvage et les mutants A129G et A165G/S166P ont été couplés à la TK_{gst} dans le but d'accéder à des cétooses L-érythro (3S, 4S) par voie enzymatique, à partir du glycolaldéhyde et/ou du formaldéhyde. L'utilisation simultanée de ces deux enzymes selon

une stratégie « one-pot » n'est pas envisageable puisque le glycolaldéhyde et le formaldéhyde réagiraient directement avec le Li-HPA en présence de la TK_{gst} pour former respectivement du L-érythrose et du DHA. Par conséquent, un procédé séquentiel a été développé, dans lequel l'aldéhyde α-hydroxylés (2S) est produit lors d'une première étape, catalysée par la FSA_{eco} sauvage ou mutée, puis est utilisé en solution, sans purification intermédiaire, pour la synthèse du cétose L-érythro (3S, 4S) correspondant, en présence du Li-HPA et de la TK_{gst} à 60°C, dans une seconde étape (Tableau 49).



Aldéhydes α-hydroxylés (2S)	FSA _{eco}	Rendement [%]	Temps réactionnel [h]	Cétoles L-érythro (3S, 4S)	Temps réactionnel [h]	Rendement [%]	ed' [%]
 L-glyceraldéhyde 13	FSA _{eco} sauvage	100	19	 L-ribulose 3	24	55	> 95
 D-thréose 14	A129G	98	24	 D-tagatose 5	96	54	> 95
 L-érythrose 15	A165G/S166P	96	240	 L-psicose 6	96	55	> 95

Tableau 49 : Synthèse du L-ribulose **3, du D-tagatose **5** et du L-psicose **6** catalysée par la TK_{gst} en présence du Li-HPA synthétique à partir respectivement du L-glyceraldéhyde **13**, du D-thréose **14** et du L-érythrose **15** générés par voie enzymatique en présence de la FSA_{eco} sauvage ou des mutants A129G ou A165G/S166P. ¹ Déterminés par RMN ¹³C.**

Les synthèses des aldéhydes α-hydroxylés (2S), le L-glyceraldéhyde **13**, le D-thréose **14** et le L-érythrose **15**, ont été réalisées dans l'eau pure, à pH 8. L'avancement a été suivi par HPLC et par RMN ¹H *in situ*, en présence d'un étalon interne, le TSP-d₄. Ces aldéhydes obtenus en solution dans l'eau, dont le pH a préalablement été ajusté à 7, ont ensuite été mis en présence du Li-HPA, de la TK_{gst} et de ses cofacteurs, sans purification préalable, pour accéder à l'échelle préparative aux cétoles L-érythro (3S, 4S) correspondants, le L-ribulose **3**, le D-tagatose **5** et le L-psicose **6** à 60°C, dans les conditions expérimentales optimisées pour

minimiser la dégradation du Li-HPA à haute température. L'avancement de ces réactions a été suivi par CCM et par RMN ^1H *in situ*, en présence du TSP- d_4 . Les produits ont été purifiés par chromatographie sur colonne de gel de silice. Des excès diastéréoisomériques (*ed*), déterminés par RMN ^{13}C , supérieurs à 95%, ont été mesurés. De plus, la pureté optique des produits purifiés a été vérifiée par la mesure de leur pouvoir rotatoire, dont les valeurs se sont révélées identiques à celles décrites dans la littérature.

Les conditions réactionnelles (concentration en substrats, quantité d'enzymes, temps réactionnel, température) dépendent de l'aldéhyde α -hydroxylé (2S) utilisé et sont détaillées dans les paragraphes suivants.

3.4.3.1. Synthèse du L-ribulose **3**

Le L-glycéraldéhyde **13** a tout d'abord été synthétisé indépendamment à partir du glycolaldéhyde et du formaldéhyde, en présence de la FSA_{eco} dans l'eau pure à pH 8 (Etape 1). Puis la solution obtenue a été mise en présence de la TK_{gst} et du Li-HPA, pour accéder au L-ribulose **3** à 60°C (Etape 2) (Figure 97).

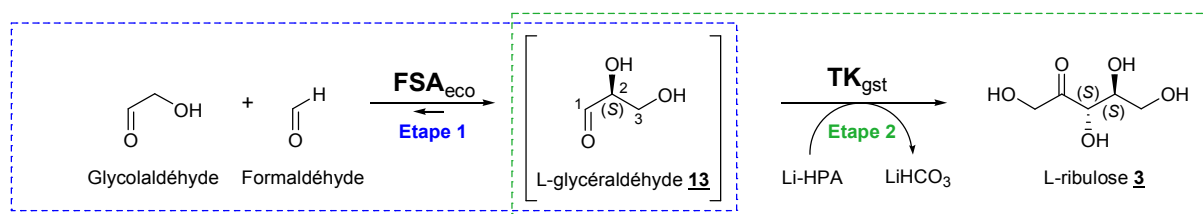


Figure 97 : Couplage FSA_{eco}/TK_{gst} pour l'obtention du L-ribulose **3 à partir du glycolaldéhyde et du formaldéhyde**

Comme nous l'avons vu précédemment, la FSA_{eco} catalyse la condensation du glycolaldéhyde et du formaldéhyde pour conduire au L-glycéraldéhyde **13** par formation stéréospécifique de la liaison C2-C3. Cependant, cette enzyme peut également catalyser l'autocondensation du glycolaldéhyde, conduisant à l'obtention du D-thréose **14**. Dans le but d'éviter la formation de cet aldéhyde indésirable et de favoriser la formation du L-glycéraldéhyde **13**, l'utilisation d'un excès de formaldéhyde par rapport au glycolaldéhyde a été requise. Différentes concentrations en substrats et différentes quantités d'enzymes ont été testées. Finalement, l'emploi de 8 mg de FSA_{eco} en présence de 1 mmol (50 mM) de glycolaldéhyde et 2 mmol (100 mM) de formaldéhyde, a conduit à l'obtention d'un taux de conversion du glycolaldéhyde de 60% après 24 heures, à 25°C. Cette même réaction, réalisée à 50°C, a conduit à une conversion complète du glycolaldéhyde après 19 heures,

grâce à la résistance de la FSA_{eco} à cette température, qui nous a permis d'accélérer la cinétique réactionnelle de la réaction enzymatique. Par ailleurs, malgré l'utilisation d'un excès de formaldéhyde, le D-thréose **14** a été détecté sur le spectre de RMN ¹H, mais à l'état de traces uniquement. Enfin, la réaction de rétro-aldolisation du L-glycéraldéhyde catalysée par la FSA_{eco}, qui réagirait avec le glycolaldéhyde pour former du L-xylose, n'a pas été observée [305].

Le L-glycéraldéhyde **13** a ainsi été obtenu avec un rendement quantitatif (1 mmol) en solution dans l'eau, en présence de 50 mM de formaldéhyde (n'ayant pas réagi avec le glycolaldéhyde) et de D-thréose **14**, à l'état de traces. La présence de formaldéhyde n'est pas gênante pour le couplage ultérieur avec la TK_{gst}. D'une part, aucune inhibition de la TK_{gst} n'a été observée en présence de cette concentration en formaldéhyde. D'autre part, le DHA généré, issu de la réaction entre le formaldéhyde et le Li-HPA catalysée par la TK_{gst}, pourra être facilement séparé du L-ribulose **3** durant l'étape de purification finale.

Le L-glycéraldéhyde **13**, en solution dans l'eau, a ensuite été mis en présence du Li-HPA, de la TK_{gst} et de ses cofacteurs. La conversion complète du Li-HPA et du L-glycéraldéhyde **13** a été observée après 24 heures. Les spectres de RMN ¹H réalisés au cours de la réaction ont montré la formation majoritaire du L-ribulose **3** et la présence de sous-produits très minoritaires tels que le DHA (résultant de la réaction entre le formaldéhyde et le Li-HPA catalysée par la TK_{gst}) et le D-tagatose **5** (résultant de la réaction entre le D-thréose **14** et le Li-HPA catalysée par la TK_{gst}). Finalement, le L-ribulose **3** a été obtenu, après purification, avec un rendement de 55 %, très proche de celui obtenu en présence du L-glycéraldéhyde commercial et du Li-HPA synthétique *i.e.* 56 %.

3.4.3.2. Synthèse du D-tagatose **5**

Le D-thréose **14** a tout d'abord été synthétisé indépendamment à partir du glycolaldéhyde en présence du mutant A129G dans l'eau pure à pH 8 (Etape 1). Puis la solution obtenue a été mise en présence de la TK_{gst} et du Li-HPA, pour accéder efficacement au D-tagatose **5** à 60°C (Etape 2) (Figure 98).

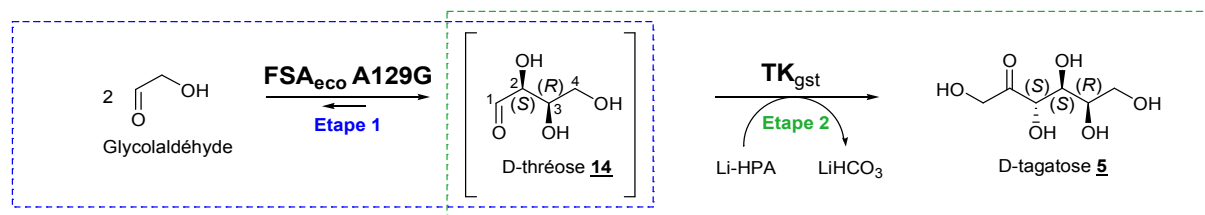


Figure 98 : Couplage FSA_{eco} A129G/TK_{gst} pour l'obtention du D-tagatose **5 à partir du glycolaldéhyde**

L'autocondensation du glycolaldéhyde catalysée par le mutant A129G permet l'obtention du D-thréose **14** (produit cinétique) par formation de la liaison C2(S)-C3(R) de façon stéréospécifique. Cette réaction est rapide, mais partiellement réversible, du fait de la rétro-aldolisation du D-thréose **14** *in situ*, catalysée par ce mutant. Une partie du glycolaldéhyde réagit alors avec le D-thréose **14** linéaire pour former du D-idose (produit thermodynamique) (Figure 99).

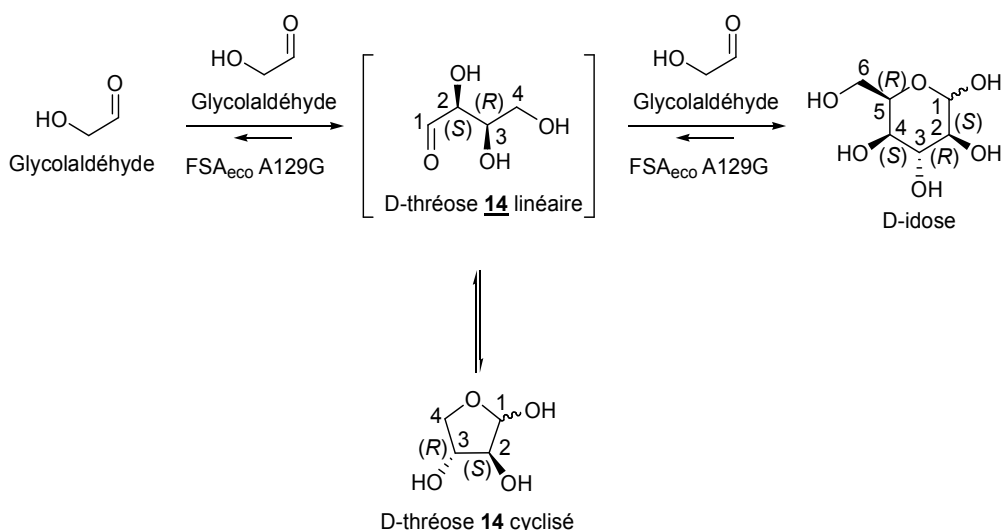


Figure 99 : Synthèse du D-thréose **14 catalysée par la FSA_{eco} A129G à partir du glycolaldéhyde et rétro-aldolisation expliquant la formation du D-idose**

Dans le but de minimiser cette réaction parasite, les conditions réactionnelles de la synthèse ont été optimisées. Différentes quantités d'enzymes ont été testées. Finalement, l'utilisation de 4 mg du mutant A129G en présence de 2 mmol (200 mM) de glycolaldéhyde a permis l'obtention du D-thréose **14** en 24 heures, à 25°C, avec un taux de conversion du glycolaldéhyde de 98%. Dans ces conditions, le D-idose a été détecté à l'état de traces par HPLC et n'a pas été détecté par RMN ¹H. Le D-thréose **14** a ainsi été obtenu en solution dans l'eau, à pH 8 avec un rendement de 98% (0,98 mmol).

La FSA_{eco} étant stable à haute température, nous avons envisagé de réaliser cette réaction à 50°C, afin d'augmenter l'activité spécifique du mutant A129G et permettre ainsi l'utilisation d'une quantité moindre d'enzymes, tout en profitant d'une cinétique réactionnelle plus rapide. Toutefois, l'enzyme a précipité après 3 jours et un taux de conversion du glycolaldéhyde très faible a été obtenu.

Le D-thréose **14**, obtenu en solution dans l'eau, a ensuite été mis en présence du Li-HPA, de la TK_{gst} et de ses cofacteurs. L'ajout de trois équivalents supplémentaires de Li-HPA au cours du temps a été nécessaire pour convertir en quasi-totalité le D-thréose **14** en 4 jours (>90%). Les spectres de RMN ¹H obtenus ont révélé la présence majoritaire du D-tagatose **5** et des traces de L-érythrose **1**, résultant de la rétro-aldolisation du D-thréose **14** catalysée par le mutant A129G, conduisant à la formation du glycolaldéhyde dans le milieu. Après purification, le D-tagatose **5** a été obtenu avec un rendement de 54%, 4 fois supérieur à celui déterminé à partir du D-thréose commercial et du Li-HPA synthétique.

3.4.3.3. Synthèse du L-psicose **6**

Le L-érythrose **15** a tout d'abord été synthétisé indépendamment à partir du glycolaldéhyde en présence du mutant A165G/S166P dans l'eau pure à pH 8 (Etape 1). Il a ensuite été mis en présence de la TK_{gst} et du Li-HPA, pour accéder efficacement au L-psicose **6** à 60°C (Etape 2) (Figure 100).

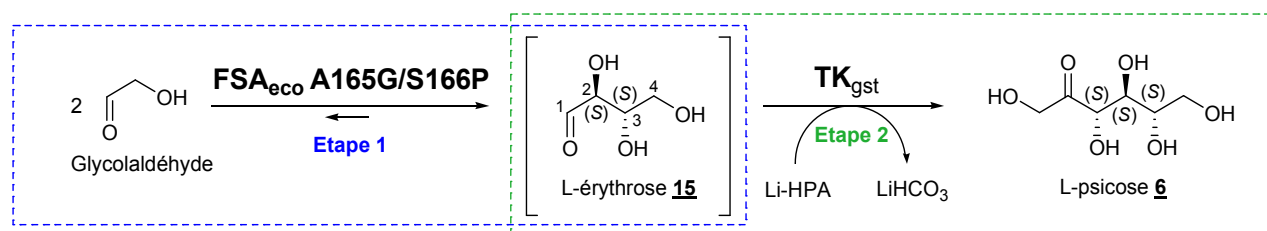


Figure 100 : Couplage FSA_{eco} A165G/S166P/TK_{gst} pour l'obtention du L-psicose **6 à partir du glycolaldéhyde**

L'autocondensation du glycolaldéhyde catalysée par le mutant A165G/S166P permet l'obtention du L-érythrose **15** par formation de la liaison C2(S)-C3(S) de façon stéréospécifique, une configuration inaccessible avec le mutant A129G ou la FSA_{eco} sauvage. Toutefois, l'affinité de ce double mutant vis-à-vis du glycolaldéhyde est très faible, conduisant à l'obtention du L-érythrose **15** avec une cinétique réactionnelle très lente. L'emploi de 40 mg du mutant A165G/S166P en présence de 2 mmol (200 mM) de

glycolaldéhyde ont permis de synthétiser le L-érythrose **15** en 10 jours à 25°C, avec un taux de conversion du glycolaldéhyde de 96%. L'obtention d'un rapport 9/1 : L-érythrose **15** /D-thréose **14** en présence de ce mutant à partir du glycolaldéhyde est décrit dans la littérature [305]. Toutefois, ici, la présence du D-thréose **14**, même à l'état de traces, n'a pas été constatée après analyse du milieu réactionnel par RMN ¹H, montrant que la réaction est stéréospécifique. Enfin, la réaction de rétro-aldolisation du L-érythrose **15** catalysée par le mutant A165G/S166P, qui réagirait avec le glycolaldéhyde pour former du L-glucose, n'a pas été observée. Ainsi, le L-érythrose **15** a été obtenu en solution dans l'eau, à pH 8, avec un rendement de 96% (0,96 mmol).

Compte-tenu de la résistance de la FSA_{eco} à haute température, nous avons également envisagé de réaliser cette réaction à 50°C, afin de profiter d'une cinétique réactionnelle plus rapide. Toutefois, l'enzyme a précipité après 2 jours et un taux de conversion du glycolaldéhyde très faible a été obtenu.

Le L-érythrose **15**, en solution dans l'eau, a ensuite été mis en présence du Li-HPA, de la TK_{gst} et de ses cofacteurs. L'ajout de trois équivalents supplémentaires de Li-HPA au cours du temps a été nécessaire pour convertir en quasi-totalité le L-érythrose **15** en 4 jours (>90%). Les spectres de RMN ¹H ont révélé la présence majoritaire du L-psicose **6** et des traces de L-érythrulose **1**. En effet, le glycolaldéhyde dans le milieu n'ayant pas réagi lors de la première étape catalysée par le mutant A165G/S166P est converti par la TK_{gst}, conduisant donc au L-érythrulose **1**. Cependant, ce composé est nettement minoritaire par rapport au L-psicose **6**. Après purification, ce dernier a été obtenu avec un rendement de 55%, plus de cinq fois supérieur à celui déterminé à partir du L-érythrose commercial et du Li-HPA synthétique.

3.4.4. Conclusions

Ainsi, nous avons identifié des aldolases capables de conduire de façon efficace aux trois aldéhydes α -hydroxylés (2S) souhaités, le L-glycéraldéhyde **13**, le D-thréose **14** et le L-érythrose **15**, à l'échelle préparative, à partir du glycolaldéhyde et du formaldéhyde, deux aldéhydes achiraux peu coûteux, avec de très bons rendements, compris entre 96% et 100%. Ces aldéhydes α -hydroxylés (2S), obtenus en solution dans l'eau pure, ont ensuite été utilisés sans purification intermédiaire comme substrats accepteurs de la TK_{gst}. En effet, en raison de réactions croisées avec la TK_{gst}, les deux réactions en cascade ont été réalisées de façon séquentielle. Les cétooses de configuration L-érythro (3S, 4S) correspondants, le L-

ribulose **3**, le D-tagatose **5** et le L-psicose **6**, ont été obtenus à 60°C, en présence du Li-HPA synthétique, avec des rendements compris en 54% et 55%, semblables ou nettement supérieurs à ceux obtenus à partir des aldéhydes commerciaux et du Li-HPA synthétique (Tableau 49). Il est à noter que nous avons été dans l'incapacité de calculer le facteur *E* de ces procédés bi-enzymatiques, ne connaissant pas les procédés de synthèse des aldéhydes α -hydroxylés (2S) commerciaux employés dans les synthèses précédentes. Ce procédé optimisé peut désormais être appliqué à la synthèse d'autres aldéhydes α -hydroxylés (2S) onéreux, accessibles *via* l'utilisation de la FSA_{eco} sauvage ou mutée [305].

3.5. Cascade multi-enzymatique FSA_{eco} mutée A129G/TA_{tca}/TK_{gst} pour la synthèse du D-tagatose **5**

L'objectif est ici de combiner les réactions décrites précédemment afin de générer dans un même procédé, les substrats donneurs et accepteurs de la TK_{gst}. Cette approche n'a jamais été envisagée précédemment, les substrats des TKs étant soit commerciaux, soit obtenus par voie chimique. L'intérêt est ici d'utiliser des précurseurs peu onéreux, accessibles et naturels, pour accéder à moindre coût à des cétooses de haute valeur ajoutée. Comme « preuve de concept », la synthèse du D-tagatose **5** a été choisie. Ce cétoose, comme indiqué précédemment, trouve des applications dans le domaine alimentaire, puisqu'il s'agit d'un édulcorant à faible index glycémique. Il a, de plus, montré des propriétés contre le diabète de type II [312]. Comme preuve d'efficacité du procédé, le rendement en D-tagatose **5** sera ici comparé à celui obtenu en présence de la TK_{gst} seule, du Li-HPA synthétique et du D-thréose commercial. De plus, il faut mentionner que la synthèse de ce cétoose est actuellement réalisée à l'échelle industrielle par voie microbiologique *via* l'utilisation de L-arabinoses isomérases (EC 5.3.1.4), à partir du D-galactose. Toutefois, l'équilibre de la réaction n'est pas en faveur du D-tagatose et les taux de conversion du D-galactose obtenus sont relativement faibles [256], [257].

La stratégie développée est réalisée selon une stratégie « one-pot », de façon séquentielle. Dans un premier temps, le D-thréose **14** a été synthétisé à partir du glycolaldéhyde en présence du mutant de la FSA_{eco} A129G, dans l'eau pure à pH 8, dans les conditions expérimentales optimisées présentées dans le paragraphe précédent (Etape 1). Dans un second temps, il a été mis en présence de la TK_{gst}, de la TA_{tca}, de la L-sérine et de l'acide pyruvique, pour permettre la génération *in situ* du HPA et accéder au D-tagatose **5** à l'échelle préparative (Etape 2) (Figure 101).

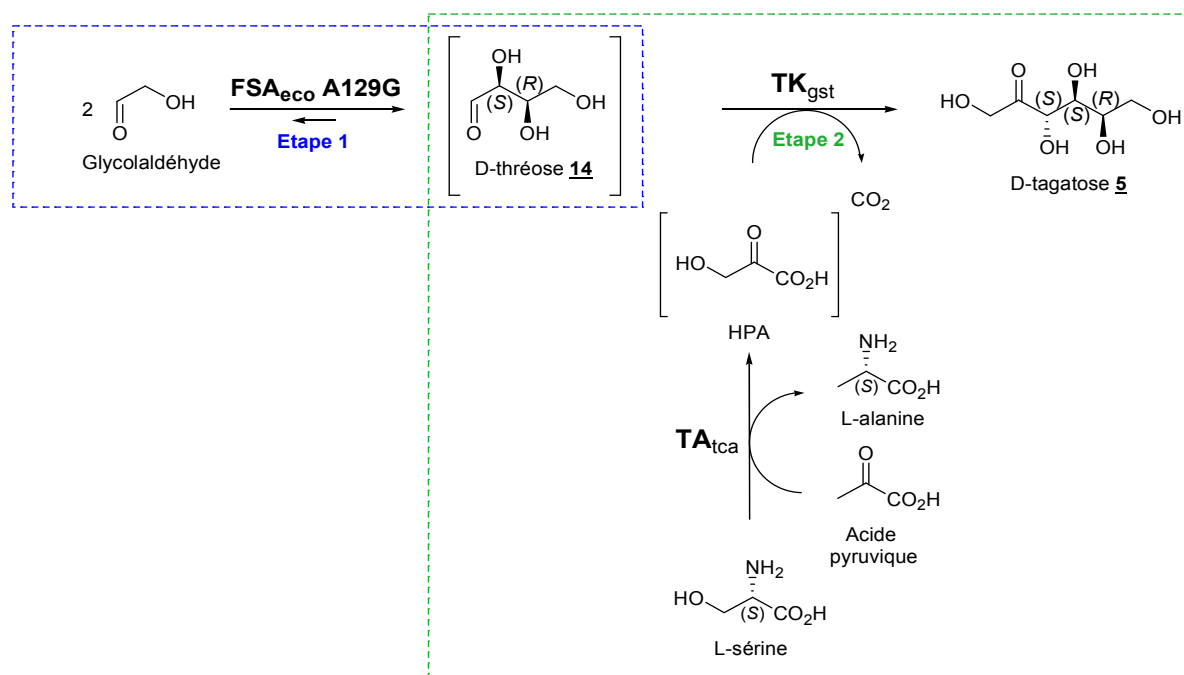


Figure 101 : Couplage FSA_{eco} mutée A129G/ TA_{tca} / TK_{gst} pour la synthèse du D-tagatose **5 à partir du glycolaldéhyde, de la L-sérine et de l'acide pyruvique**

Remarque : Compte tenu de la très faible affinité de la TK_{gst} pour le D-thréose **14**, l'utilisation de ce substrat nécessite de réaliser la réaction enzymatique à haute température, afin d'accélérer la cinétique réactionnelle de formation du D-tagatose **5**. Notre choix s'est donc porté sur l'utilisation concomitante de la TK_{gst} et de la TA_{tca} à $60^\circ C$, permettant la génération *in situ* du HPA à haute température, sa consommation au fur et à mesure de sa formation, limitant ainsi sa dégradation au cours du temps.

Comme décrit précédemment, l'utilisation du mutant A129G de la FSA_{eco} en présence du glycolaldéhyde a permis l'obtention du D-thréose **14** à $25^\circ C$, en 24 heures, avec un taux de conversion du glycolaldéhyde de 98% (étape 1). Puis lors de l'étape 2, les substrats et enzymes ont été introduits dans la solution : la L-sérine, l'acide pyruvique, la TA_{tca} , la TK_{gst} et les cofacteurs des enzymes.

Après 72 heures, les spectres de RMN 1H obtenus ont révélé la présence majoritaire du D-tagatose **5** et des traces de L-érythrose **1**. La présence de ce dernier résulte de la condensation du HPA catalysée par la TK_{gst} sur le glycolaldéhyde, généré dans le milieu par réaction de rétro-aldolisation du D-thréose **14** catalysée par le mutant A129G. Après purification, le D-tagatose **5** a été obtenu avec un rendement de 50%, proche du rendement

obtenu *via* le couplage FSA_{eco} mutée A129G/TK_{gst} en présence du Li-HPA synthétique décrit précédemment et 4 fois supérieur environ à celui déterminé à partir du D-thréose commercial et du Li-HPA synthétique. Un *ed* supérieur à 95% a été déterminé par RMN ¹³C et la pureté optique du produit a été vérifiée par la mesure son pouvoir rotatoire, dont la valeur s'est révélée identique à celle décrite dans la littérature.

Enfin, pour la raison explicitée précédemment, nous n'avons pas été en mesure de déterminer le facteur *E* de ce système multi-enzymatique.

3.6. Conclusions

Ainsi, l'objectif de synthétiser efficacement à haute température des cétooses rares d'intérêt biologique à l'échelle préparative, à partir de composés naturels et peu coûteux, a été atteint.

Une étape d'optimisation des conditions réactionnelles a tout d'abord permis de limiter la dégradation du Li-HPA à haute température, conduisant à la synthèse efficace à 60°C, de cétooses hautement valorisables de configuration (3*S*), D-*thréo* (3*S*, 4*R*) et L-*érythro* (3*S*, 4*S*). Cependant, comme nous l'avons vu précédemment à l'échelle analytique dans le paragraphe 1.3. de la *Partie Résultats et Discussions*, la TK_{gst} présente de faibles activités vis-à-vis des aldéhydes α-hydroxylés (2*S*) à 3 et 4 atomes de carbone et des aldéhydes α-hydroxylés (2*R*) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6). Ceci s'est traduit, à l'échelle préparative, par l'obtention de faibles taux de conversion de ces aldéhydes et de rendements modestes, après purification. Afin d'améliorer ces résultats, les TK_{gst} mutées les plus actives vis-à-vis de ces aldéhydes identifiées à l'échelle analytique ont été utilisées.

Les TK_{gst} mutées L382D/D470S, L191I, L382F/F435Y ont permis de synthétiser plus efficacement trois cétooses de configuration L-*érythro* (3*S*, 4*S*), à l'échelle préparative, le L-ribulose **3**, le 5-désoxy-L-ribulose **4** et le D-tagatose **5**, obtenus avec des temps de réaction plus courts et de meilleurs rendements par rapport à ceux obtenus avec la TK_{gst} sauvage. De plus, l'emploi du mutant R521Y/H462N a permis d'accéder plus efficacement au D-sédoheptulose **9** à partir du D-ribose, en comparaison des résultats obtenus en présence de la TK_{gst} sauvage. Enfin, alors qu'aucun nouveau produit n'a été détecté en présence du D-glucose utilisé comme aldéhyde accepteur de la TK_{gst} sauvage, l'utilisation du mutant R521V/S385D/H462S a permis la conversion quasi-totale de cet aldéhyde, conduisant à la formation du produit correspondant, le D-*glycéro*-D-*altro*-octulose **11**. Toutefois, ce produit pur n'a pas pu être isolé. Ainsi, les gains d'activité mesurés à l'échelle analytique en présence de ces TK_{gst} mutées les plus performantes ont été confirmés à l'échelle préparative.

Afin de s'affranchir de l'utilisation de substrats commerciaux et/ou obtenus par voie chimique, mais également dans l'optique de développer un procédé éco-compatible, la synthèse des substrats donneurs et accepteurs de la TK_{gst} a été envisagée selon des réactions enzymatiques couplées à la réaction catalysée par la TK_{gst} , l'enzyme sauvage ayant été utilisée comme « preuve de principe ». Ainsi, pour éviter la synthèse chimique peu efficace du Li-HPA, mais également pour limiter sa dégradation à haute température, celui-ci a été généré *in situ* par voie enzymatique, à partir de la D- ou L-sérine comme précurseur, selon des réactions en cascade « one-pot », réalisées de façon simultanée. D'une part, le HPA a été généré *in situ* à partir de la L-sérine et de l'acide pyruvique, *via* l'emploi d'une L- α -TAs thermostable, la TA_{tca} , autorisant le couplage de cette enzyme avec la TK_{gst} à 60°C. D'autre part, le HPA a été généré *in situ* à partir d'un substrat unique, la D-sérine, en présence d'une D-AAO issue d'un microorganisme mésophile, la D-AAO_{rg}, limitant les synthèses à l'obtention de cétooses de configuration (3S) et D-*thréo* (3S, 4R), accessibles à température ambiante. Les avancées obtenues par rapport aux procédés décrits dans la littérature concernent notamment les sources d'enzymes utilisées. En effet, la TA_{tca} , comme la D-AAO_{rg}, issues de microorganismes recombinants, présentent des activités spécifiques élevées et sont obtenues en quantité importante, à moindre coût. Par ailleurs, compte tenu du coût élevé des aldéhydes α -hydroxylés (2S) à 3 et 4 atomes de carbone, ceux-ci ont été générés efficacement par voie enzymatique *via* une réaction d'aldolisation catalysée par la FSA_{eco} (sauvage ou mutée), à partir de deux aldéhydes achiraux à très courte chaîne carbonée beaucoup plus accessibles, le glycolaldéhyde et le formaldéhyde. Obtenus en solution dans l'eau, ils ont ensuite été mis en présence de la TK_{gst} et du Li-HPA pour accéder efficacement, à 60°C, aux cétooses L-*érythro* (3S, 4S) correspondants, *via* la réalisation d'un procédé bi-enzymatique « one-pot » séquentiel.

Enfin, un procédé multi-enzymatique, réalisé selon une stratégie « one-pot » de façon séquentielle et combinant les deux approches étudiées précédemment, a permis, en présence des trois enzymes suivantes : la FSA_{eco} mutée A129G, la TA_{tca} et la TK_{gst} et de substrats peu coûteux et non toxiques (la L-sérine, l'acide pyruvique et le glycolaldéhyde), d'obtenir le D-tagatose **5**, comme « preuve de principe » de ce procédé original, jusqu'alors jamais décrit dans la littérature.

Conclusions et Perspectives

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont consisté à exploiter le potentiel synthétique de la transcétolase thermostable issue d'une bactérie thermophile *G. stearothermophilus*, la TK_{gst}, récemment identifiée par notre groupe, pour la synthèse de monosaccharides rares d'intérêt biologique à haute température.

Pour atteindre cet objectif, nous avons d'une part, utilisé la TK_{gst} sauvage ou des TK_{gst} mutées obtenues par Evolution dirigée, afin de synthétiser des cétooses rares d'intérêt et d'autre part, optimisé le procédé de synthèse pour le rendre plus économique et respectueux de l'environnement, grâce notamment à des enzymes auxiliaires, capables de générer les substrats à partir de composés naturels et peu coûteux. Ces travaux s'inscrivent dans un projet collaboratif et pluridisciplinaire bilatéral franco-allemand ThermoTK, financé par l'ANR et développé conjointement avec notre partenaire, le Pr. W.-D. Fessner (Université Technique de Darmstadt, Allemagne).

Les principales étapes qui ont été franchies sont les suivantes :

✓ L'étude de la spécificité de substrat et de l'énantiopréférence de cette nouvelle TK_{gst}, a permis de montrer des similitudes entre cette enzyme et les autres sources de TK communément utilisées en biocatalyse (TK_{sce}, TK_{eco}). La TK_{gst} est très spécifique du Li-HPA, le substrat donneur clé qui rend la réaction irréversible, avec cependant une meilleure affinité par rapport à celle obtenue en présence des TK_{sce} et TK_{eco}. La spécificité vis-à-vis des aldéhydes accepteurs est comparable à celle des autres TKs décrites dans la littérature, avec une activité préférentielle vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés à courte chaîne (C2-C4). L'allongement de la chaîne carbonée ou la présence d'une chaîne aliphatique ou aromatique conduit en effet à une baisse significative de l'activité de cette enzyme. De plus, l'énantiopréférence de la TK_{gst} est également similaire aux autres TKs connues : celle-ci accepte très préférentiellement les aldéhydes α -hydroxylés (2*R*), conduisant à des cétooses de configuration *D-thréo* (3*S*, 4*R*). La particularité de la TK_{gst} est sa capacité à convertir les aldéhydes α -hydroxylés (2*S*) en cétooses correspondants de configuration *L-érythro* (3*S*, 4*S*). De plus, sa thermostabilité permet d'augmenter la faible activité obtenue à 25°C vis-à-vis de ces aldéhydes d'un facteur 4 à 5 à 60°C. Cette propriété n'a jamais été décrite dans la littérature pour d'autres sources de TK.

✓ Compte-tenu des résultats obtenus lors de cette étude préliminaire, un des objectifs de ces travaux de thèse a été d'améliorer l'activité de cette enzyme par Evolution dirigée selon une approche semi-rationnelle, vis-à-vis des aldéhydes accepteurs conduisant à de

faibles activités (aldéhydes α -hydroxylés (2S), aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6), aldéhydes aliphatiques et aromatiques) mais également vis-à-vis de l'acide pyruvique, analogue du substrat donneur utilisé couramment, l'acide hydroxypyruvique ou HPA. La structure 3D de la TK_{gst} n'étant pas connue, un modèle structural de cette enzyme a été construit par homologie de séquence avec la TK de *B. anthracis*. Puis des banques de TK_{gst} mutées sur une, deux, voire trois positions simultanément (identifiées par modélisation moléculaire), ont été générées par mutagenèse par saturation de site (technique « SSM »).

Ainsi, onze cétooses de configuration (3S), D-*thréo* (3S, 4R) et L-*érythro* (3S, 4S), présentant des activités biologiques spécifiques, ont été obtenus à l'échelle préparative, dont quatre n'ayant jamais été synthétisés avec d'autres TKs microbiennes. Les mutants L382D/D470S, L191I et L382F/F435Y, plus performants vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2S), *i.e.* le L-glycéraldéhyde, le L-lactaldéhyde et le D-thréose, ont permis la synthèse des cétooses L-*érythro* (3S, 4S) correspondants, le L-ribulose, le 5-désoxy-L-ribulose et le D-tagatose, avec des rendements compris entre 55% et 68%, supérieurs à ceux obtenus avec la TK_{gst} sauvage [237]. De plus, le D-sédoheptulose, un cétoose de configuration D-*thréo* (3S, 4R) à 7 atomes de carbone, a été synthétisé avec un rendement de 67% en présence du mutant R521Y/H462N, à partir d'un aldéhyde α -hydroxylé (2R) à 5 atomes de carbone, le D-ribose, un rendement de 44% ayant été obtenu avec l'enzyme sauvage. Enfin, le mutant R521V/S385D/H462S a permis de convertir à l'échelle préparative le D-glucose, qui n'est pas accepté par la TK_{gst} sauvage, en D-*glycéro*-D-*ido*-octulose, un cétoose de configuration D-*thréo* (3S, 4R) à 8 atomes de carbone, inaccessible avec la TK_{gst} sauvage. Toutefois, ce produit pur n'a pas pu être isolé.

En parallèle et dans le cadre de ce projet, j'ai également participé aux travaux développés par notre partenaire, le Pr. W.-D. Fessner, centrés sur l'amélioration de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis d'aldéhydes hydrophobes. Les TK_{gst} mutées les plus performantes identifiées, ont permis la synthèse de cétooses de configuration D-*thréo* (3S, 4R) aliphatiques et aromatiques d'une grande variété structurale. De plus, dans l'optique d'élargir le spectre de substrats donneurs de la TK_{gst}, quelques mutants ont été sélectionnés pour leur activité accrue vis-à-vis de l'acide pyruvique et d'analogues, permettant d'accéder à des cétooses en série 1-désoxy à l'échelle préparative, ces composés étant, pour la plupart, inaccessibles avec l'enzyme sauvage [234], [238], [239].

En conclusion, la stratégie basée sur l'Evolution *in vitro* et la modification du site actif de la TK_{gst} par une approche semi-rationnelle, a permis de répondre avec succès à notre objectif.

L'activité de la TK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes ciblés a été améliorée de façon significative. De plus, l'obtention de ces TK_{gst} mutées a permis d'élargir le champ d'application de la TK_{gst} sauvage et d'accéder avec de bons, voire d'excellents rendements et excès diastéréoisomériques, à des cétooses rares d'intérêt biologique.

✓ L'autre objectif de ces travaux a été d'optimiser le procédé de synthèse pour le rendre plus économique et respectueux de l'environnement, grâce notamment à l'utilisation d'enzymes auxiliaires, dont l'emploi a permis de générer les substrats donneurs et accepteurs de la TK_{gst}, à partir de composés naturels et peu coûteux. Pour ces études, la TK_{gst} sauvage a été utilisée.

Afin de s'affranchir de la synthèse chimique et peu efficace du Li-HPA, substrat donneur, mais également pour limiter sa dégradation à haute température, ce composé a été généré *in situ* par voie enzymatique, selon deux stratégies, qui ont en commun l'utilisation d'un même substrat précurseur du HPA, la sérine.

La première stratégie consiste à préparer ce composé *via* une réaction de transamination en présence de la L-sérine et de l'acide pyruvique, catalysée par une nouvelle L- α -transaminase issue de la bactérie thermophile *T. carboxydivorans*, la TA_{tca}, identifiée en collaboration avec le Pr. T. Gefflaut (Equipe BioMéta, ICCF) et le Dr. V. De Berardinis (Genoscope, CEA, Evry). Les réactions catalysées par la TA_{tca} et la TK_{gst} ont été réalisées à 60°C en cascade selon une stratégie « one-pot » et de façon simultanée. Les cétooses L-érythro (3S, 4S), *i.e.* le L-ribulose, le 5-désoxy-L-ribulose, le D-tagatose et le L-psicose, ont été obtenus avec de bons, voire d'excellents rendements, compris entre 51% et 98% et d'excellents excès diastéréoisomériques [262].

Pour simplifier la stratégie précédente et notamment éviter l'utilisation du second substrat, l'acide pyruvique, conduisant à formation de la L-alanine non recyclée, une seconde approche a été développée. La D-AAO_{rg} issue de la levure *R. gracilis*, étudiée en collaboration avec l'équipe du Pr. L. Pollegioni (Italie), a été employée pour former le HPA à partir d'un substrat unique : la D-sérine. Les réactions catalysées par la D-AAO_{rg} et la TK_{gst} ont été réalisées simultanément selon une stratégie « one-pot » à 25°C, la D-AAO_{rg} utilisée ici n'étant pas thermostable. Le L-érythrulose, un cétoose de configuration (3S), le D-xylulose et le L-sorbose, deux cétooses de configuration D-*thréo* (3S, 4R), ont été synthétisés à l'échelle préparative, avec d'excellents taux de conversion, de bons rendements, compris entre 44% et 65% et d'excellents excès diastéréoisomériques.

De plus, compte-tenu du coût très élevé des aldéhydes α -hydroxylés (2S) à 3 et 4 atomes de carbone, ces composés ont été préparés par voie enzymatique, *via* une réaction

d'aldolisation, catalysée par la D-fructose-6-phosphate aldolase, issue de la bactérie *E. coli*, la FSA_{eco}, sauvage ou mutée, à partir de composés achiraux beaucoup plus accessibles. Ce projet a été réalisé en collaboration avec le groupe du Pr. P. Clapés (Espagne). La FSA_{eco} sauvage et les mutants A129G et A165G/S166P ont permis la synthèse du L-glycéraldéhyde, du D-thréose et du L-érythrose avec d'excellents taux de conversion ($\geq 96\%$), à partir du glycolaldéhyde et/ou du formaldéhyde. Un procédé « one-pot » réalisé toutefois de façon séquentielle a été réalisé et a permis la synthèse du L-ribulose, du D-tagatose et du L-psicose, en présence de la TK_{gst}, du Li-HPA et des trois aldéhydes appropriés à 60°C, avec d'excellents taux de conversion, de bons rendements, compris entre 54% et 55% et d'excellents excès diastéréoisomériques.

Finalement, la génération par voie enzymatique du substrat donneur et du substrat accepteur dans une même cascade multi-enzymatique « one-pot » effectuée de façon séquentielle a été appliquée à la synthèse du D-tagatose à 60°C, en présence de la FSA_{eco} mutée A129G, de la TA_{tca} et de la TK_{gst} et à partir de la L-sérine, de l'acide pyruvique et du glycolaldéhyde. Ce procédé a permis l'obtention avec succès du D-tagatose avec un rendement de 50%, à partir de composés peu coûteux, naturels et non toxiques.

En conclusion, l'optimisation de la réaction catalysée par la TK_{gst} et son couplage avec d'autres enzymes dans des réactions en cascade a été initiée au cours de ces travaux de thèse, permettant d'augmenter son efficacité, tout en réduisant son impact environnemental. Cette stratégie n'a jusqu'alors pas été décrite dans la littérature avec ces enzymes.

L'ensemble de ces travaux de thèse ont conduit à ce jour à la publication de cinq articles, donnés en annexes de ce manuscrit.

Ces travaux offrent de nombreuses perspectives, qui seront développées dans le cadre de nouveaux projets au laboratoire.

✎ Les propriétés des TK_{gst} mutées les plus performantes vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (2S) et des aldéhydes α -hydroxylés (2R) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6), pourront être améliorées par d'autres cycles de mutagenèse. De plus, les TK_{gst} mutées les plus actives vis-à-vis d'aldéhydes aliphatiques et aromatiques seront également exploitées pour accéder à des cétooses à plus longues chaînes hydrophobes, recherchés pour leurs propriétés tensio-actives. Dans l'optique de valoriser des huiles végétales, cet

aspect sera étudié à partir de 2018, dans le cadre du projet « Pack Ambition Recherche », financé par la région Auvergne en collaboration avec l'ICBMS à Lyon et l'entreprise ECOAT.

☞ Le couplage de la TK_{gst} sauvage ou des TK_{gst} mutées les plus performantes avec d'autres enzymes auxiliaires, capables de générer les substrats donneurs et accepteurs, sera également optimisé selon plusieurs directions.

L'utilisation d'une seconde transaminase, appartenant au groupe des amines-TAs, au sein du procédé bi-enzymatique impliquant la TA_{tca} , pourrait permettre l'utilisation de l'acide aminé formé qui n'est pas utilisé, ici la L-alanine, en catalysant le transfert de son groupement amine sur le groupement carbonyle du cétose formé, conduisant ainsi à l'obtention d'aminoalcools. Par ce procédé, l'acide pyruvique, utilisé comme substrat accepteur de la TA_{tca} , serait régénéré *via* une « boucle enzymatique ».

Le couplage $D-AAO_{gr}/TK_{gst}$ à haute température sera étudié, par exemple en immobilisant la $D-AAO_{gr}$ pour augmenter sa thermostabilité ou en utilisant une autre $D-AAO$ thermostable, issue d'un microorganisme thermophile. De plus, la L-sérine, naturelle, pourra être employée pour générer l'énantiomère D en présence d'une sérine racémase. Ces projets sont développés depuis septembre 2017 et financés conjointement par la région Auvergne-Rhône-Alpes et BPI France et soutenu par l'entreprise Greentech.

De plus, la synthèse d'un panel plus large d'aldéhydes α -hydroxylés (2S), possédant par exemple un cycle aromatique, un groupement azoture, un groupement phosphate ou encore un atome de chlore, pourrait être envisagée avec la FSA_{eco} , sauvage ou mutée, pour accéder à de nouveaux cétoses d'intérêt, *via* l'utilisation de ces aldéhydes comme substrats accepteurs potentiels de la TK_{gst} sauvage et des TK_{gst} mutées les plus performantes.

Enfin, ces cascades bi-enzymatiques pourraient être réalisées *in cellulo*, *via* l'utilisation d'une souche unique, permettant l'expression simultanée des différentes enzymes.

L'ensemble de ces perspectives a été proposé dans un projet ERA CoBioTech, accepté en 2017, impliquant trois autres groupes européens et deux entreprises (BASF et Prozomix) et dans lequel le Pr. L. Hecquet est partenaire.

Partie Expérimentale

1. Matériel

1.1. Microbiologie

1.1.1. Généralités

Les étapes de pré-culture et de culture des enzymes surexprimées sont réalisées sous un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) de classe II, à partir de matériels et de solutions préalablement stérilisés. Les étapes de pré-culture et de culture des banques de TK_{gst} mutées sont effectuées respectivement en microplaques 96-puits transparentes à fond conique de la marque Greiner Bio-one (ref. 651161) et en plaques « deepwell », commercialisées par la société STARLAB, Plate One (Ref. 18966-1110). Les microplaques 96-puits et les plaques « deepwell » sont incubées dans un agitateur de microplaques thermorégulé de la marque Heidolph, modèles Titramax 1000 et Inkubator 1000 et centrifugées dans un appareil Labofuge 400R de la marque Heraeus. Les pré-cultures et les cultures bactériennes de plus grands volumes sont incubées dans un agitateur orbitalaire thermostaté Infors AG AJ118. Les cellules sont lysées par un sonicateur Sonopuls de Bandelin et centrifugées dans un appareil Aventi® J-26 XP Centrifuge de Beckman Coulter. Le séquençage des mutants ponctuels de la TK_{gst} et des banques de TK_{gst} mutées est réalisé par l'entreprise Eurofins Scientific (Allemagne).

1.1.2. Milieux de culture

Les milieux de culture LB et NZY⁺ sont préparés tels que décrits ci-dessous (Tableau 50).

Milieu de culture Luria-Bertani (LB)		Milieu NZY ⁺	
Tryptone	10 g.L ⁻¹	Casamino Acides	10 g.L ⁻¹
Extrait de levure	10 g.L ⁻¹	Extrait de levure	5 g.L ⁻¹
NaCl	5 g.L ⁻¹	NaCl	5 g.L ⁻¹
-	-	MgCl ₂	12,5 mM
-	-	MgSO ₄	12,5 mM
-	-	D-glucose	20 mM
-	-	pH	7,5

Tableau 50 : Compositions des milieux de culture LB et NZY⁺

Le milieu Luria-Bertani (LB) est commercialisé par la société Difco®. L'extrait de levure, l'Agar-Agar et les « Casamino Acides » sont vendus par la société Becton Dickinson. Tous les milieux de culture sont stérilisés en autoclave (20 minutes, 121°C). Les solutions d'antibiotiques : kanamycine et ampicilline, commercialisées par la société Sigma-Aldrich, sont préparées dans l'eau osmosée, stérilisées par filtration sur filtre Millipore® 0,2 µm et conservées à -18°C. Elles sont ajoutées dans les milieux liquides ou gélosés aux concentrations suivantes : kanamycine : 30 µg.mL⁻¹, ampicilline : 100 µg.mL⁻¹. Les milieux gélosés sont obtenus par ajout d'Agar-Agar à une concentration de 2 % dans les milieux liquides.

1.1.3. Souches bactériennes hôtes et vecteurs

Quatre souches bactériennes hôtes sont utilisées pour la production de la TK_{gst}, des TK_{gst} mutées, de la TA_{tca}, de la D-AAO_{igr}, de la FSA_{eco} sauvage et des FSA_{eco} mutées. Les souches d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS, BL21(DE3) pLysE et M-15 [pREP-4] sont communément utilisées pour l'induction par de l'IPTG d'un gène placé sous le contrôle d'un promoteur T7. La souche d'*E. coli* ultra compétente XL10 Gold est fournie dans le kit « QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis » (Agilent) et est utilisée transitoirement pour la réalisation des mutants ponctuels de la TK_{gst} et des banques de TK_{gst} mutées (Voir paragraphe 2.1.3.2., page 222) (Tableau 51).

Souche bactérienne hôte	Caractéristique	Production des enzymes	Origine, Ref.
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	Dérivé de la souche B d' <i>E. coli</i>	TK _{gst} , TK _{gst} mutées	Invitrogen, [313]
		D-AAO _{igr}	Promega, [313]
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysE	Dérivé de la souche B d' <i>E. coli</i>	TA _{tca}	Invitrogen, [313]
<i>E. coli</i> M-15 [pREP-4]	Dérivé de la souche <i>E. coli</i> K12	FSA _{eco} , FSA _{eco} mutées	Qiagen, [314]
<i>E. coli</i> XL10 Gold	Souche d' <i>E. coli</i> ultra compétente	TK _{gst} mutées	Agilent

Tableau 51 : Caractéristiques des souches bactériennes hôtes utilisées pour la production des enzymes

Pour chaque souche bactérienne hôte utilisée, à l'exception de la souche d'*E. coli* XL10 Gold, deux vecteurs sont utilisés : un vecteur d'expression **1**, contenant le gène codant pour l'enzyme d'intérêt et possédant un gène de résistance à un premier antibiotique et un vecteur **2**, dont le rôle est d'empêcher l'expression basale de ce gène d'intérêt en l'absence

d'induction par l'IPTG et possédant un gène de résistance à un second antibiotique (Tableau 52).

Souche bactérienne hôte	Enzyme	Vecteur (Origine) - Résistance à un antibiotique
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	TK _{gst} et TK _{gst} mutées	1 : pGEN768 (Invitrogen) - Kanamycine 2 : pLysS (Invitrogen) - Chloramphénicol
	D-AAO _{rg}	1 : pT7-HisDAAO (USB) - Kanamycine 2 : pLysS (Promega) - Chloramphénicol
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysE	TA _{tca}	1 : pET22b(+) (Novagen) - Ampicilline 2 : pLysE (Invitrogen) - Chloramphénicol
<i>E. coli</i> M-15 [pREP-4]	FSA _{eco} et FSA _{eco} mutée	1 : pQE40 (Qiagen) - Ampicilline 2 : p-REP4 (Qiagen) - Kanamycine

Tableau 52 : Vecteurs utilisés pour la production des enzymes

1.1.4. Amorces nucléotidiques

Les amorces nucléotidiques conçues et utilisées pour la création de mutants ponctuels de la TK_{gst} et des banques de TK_{gst} mutées sont récapitulées ci-dessous (Tableau 53).

Amorces	Sens de lecture de l'ADN : 5' → 3'	Mutant ponctuel - Banque
OECXX	TTT GGC GGT TCG GCG GAC NNS GCA AGC TCG AAT AAA ACG C	Banque L382X - Codon NNS
OECXX	G CGT TTT ATT CGA GCT TGC SNN GTC CGC CGA ACC GCC AAA	
OECXX	C AGC ATC GCC GTC GGC GAA NNS GGG CCG ACG CAC	Banque D470X - Codon NNS
OECXX	GTG CGT CGG CCC SNN TTC GCC GAC GGC GAT GCT G	
OEC17	GCG CTC GTC TTG ACG GTT CAA GAT GTG CCG AC	Mutant R521V
OEC18	GT CGG CAC ATC TTG AAC CGT CAA GAC GAG CGC	
OEC25	GC AAA AGC TTG GCA ACC NNS TCA TCG TCC GGG GAA GT	Banque R358X - Codon NNS
OEC26	AC TTC CCC GGA CGA TGA SNN GGT TGC CAA GCT TTT GC	
OEC27	GGT TCG GCG GAC TTG GCA AGC NNS AAT AAA ACG CTC ATC AAA GGC	Banque S385X - Codon NNS
OEC28	GCC TTT GAT GAG CGT TTT ATT SNN GCT TGC CAA GTC CGC CGA ACC	
OEC29	TC ATC TAC GTC TTG ACG NNS GAC AGC ATC GCC GTC GG	Banque H462X - Codon NNS
OEC30	CC GAC GGC GAT GCT GTC SNN CGT CAA GAC GTA GAT GA	
OEC31	CT GCG CTC GTC TTG ACG NNS CAA GAT GTG CCG ACG TT	Banque R521X - Codon NNS
OEC32	AA CGT CGG CAC ATC TTG SNN CGT CAA GAC GAG CGC AG	
OEC43	G GCG GAC TTG GCA AGC ACG AAT AAA ACG CTC AT	Mutant S385T
OEC44	AT GAG CGT TTT ATT CGT GCT TGC CAA GTC CGC C	
OEC45	T TCG GCG GAC TTG GCA AGC GTG AAT AAA ACG CTC ATC AAA G	Mutant S385V
OEC46	C TTT GAT GAG CGT TTT ATT CAC GCT TGC CAA GTC CGC CGA A	
OEC47	GCG CTC GTC TTG ACG NDT CAA GAT GTG CCG AC	Banque R521X - Codon NDT
OEC48	GT CGG CAC ATC TTG AHN CGT CAA GAC GAG CGC	
OEC49	GGT TCG GCG GAC TTG GCA AGC NDT AAT AAA ACG CTC ATC AAA GGC	Banque S385X - Codon NDT
OEC50	GCC TTT GAT GAG CGT TTT ATT AHN GCT TGC CAA GTC CGC CGA ACC	
OEC51	TC ATC TAC GTC TTG ACG NDT GAC AGC ATC GCC GTC GG	Banque H462X - Codon NDT
OEC52	CC GAC GGC GAT GCT GTC AHN CGT CAA GAC GTA GAT GA	
OEC53	GAC GTC AAC GAC ATT TCG NDT GAC GGG GAG CTC AAC CTG	Banque L191 - Codon NDT
OEC54	CAG GTT GAG CTC CCC GTC AHN CGA AAT GTC GTT CGA GTC	
OEC55	TTT GGC GGT TCG GCG GAC NDT GCA AGC TCG AAT AAA ACG C	Banque L382 - Codon NDT
OEC56	G CGT TTT ATT CGA GCT TGC AHN GTC CGC CGA ACC GCC AAA	
OEC57	CTG AAA GTG TTC GGC GGC ACG NDT TTC GTG TTC TCT GAC TAT TTG	Banque F435 - Codon NDT
OEC58	CAA ATA GTC AGA GAA CAC GAA AHN CGT GCC GCC GAA CAC TTT CAG	
OEC58	CAA ATA GTC AGA GAA CAC GAA AHN CGT GCC GCC GAA CAC TTT CAG	

Tableau 53 : Amorces nucléotidiques conçues et utilisées pour la création de mutants ponctuels de la TK_{gst} et des banques de TK_{gst} mutées. Le codon modifié est représenté en gras et souligné.

Les amorces nucléotidiques utilisées pour réaliser le séquençage des mutants ponctuels de la TK_{gst} et des banques de TK_{gst} mutées sont décrites ci-dessous (Tableau 54).

Amorces	Sens de lecture de l'ADN : 5' → 3'	Localisation
OEC10	AAT GGA ATG AGC AGC TCG CC	Forward - Interne - TK _{gst}
OEC12	AAC GTT GCG CCC TTC GTA GC	Reverse - Interne - TK _{gst}
OEC13	ATA CCC ACG CCG AAA CAA GC	Forward - Amont - TK _{gst}
OEC14	ATC GGA ACC CTA AAG GGA GC	Reverse - Aval - TK _{gst}

Tableau 54 : Amorces nucléotidiques conçues et utilisées pour le séquençage d'un mutant ponctuel de la TK_{gst} ou d'une banque de TK_{gst} mutées

1.2. Réactifs et enzymes

Les réactifs utilisés sont commercialisés par les sociétés Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, Acros Organics, CarboSynth, Fluka AG, ROTH, Interchim (Biotech Grade), Labosi et Merck. Le L-glycéraldéhyde est vendu par la société Molekula. Le Li-HPA est synthétisé au laboratoire sous forme de sel de lithium selon une méthode adaptée de la littérature [101]. Le D- et le L-lactaldéhyde sont synthétisés au laboratoire selon un protocole adapté de la littérature [244]. L'acide 3-hydroxy-2-oxobutanoïque (sel de potassium) ou HOBA est synthétisé au laboratoire et repose sur la condensation de Baylis Hillman entre l'acrylate de méthyle et l'acétaldéhyde (Equipe du Pr. T. Gefflaut).

L'alcool déshydrogénase de levure de boulanger (ADH, EC 1.1.1.1, 369 U.mg⁻¹), la L-lactate déshydrogénase de muscle de lapin (L-LDH, EC 1.1.1.27, 1005 U.mg⁻¹) et la catalase de foie de bovin (EC 1.11.1.6, 2000-5000 U.mg⁻¹) sont commercialisées par la société Sigma-Aldrich, sous forme lyophilisée (ADH, catalase) et en suspension dans le sulfate d'ammonium (L-LDH). La TK_{gst}, les TK_{gst} mutées, la TA_{tca} et la D-AAO_{gr}, produites au laboratoire, sont purifiées sur la résine Ni-NTA commercialisée par la société Qiagen et leur lyophilisation, ainsi que celle de la FSA_{eco} (sauvage ou mutée), est effectuée avec un appareil de la marque Triad LABCONCO. Le réactif de Bradford est commercialisé par l'entreprise Bio-Rad. Enfin, le gène « synthétique » de la TK_{gst} est vendu par la société Invitrogen.

1.3. Synthèses

Des pH-mètres fonctionnant en mode pH-stat (modèles Radiometer analytical TIM 856 Titration Manager de la marque Hach et Titroline® 7000 de la marque SI Analytics) sont

utilisés lors des réactions de synthèses enzymatiques. Un débitmètre pour gaz de la marque SUPELCO Analytical (ref. PMR1-011417) est utilisé pour contrôler le débit de dioxygène dans le cadre des réactions catalysées par la D-AAO_{gr.}. L'avancement des réactions est suivi par analyse chromatographique sur couche mince (CCM) en utilisant des plaques d'aluminium recouvertes de silice (Merck® - DC 60F254). Les produits sont purifiés par chromatographie sur colonne de gel de silice (Merck® - 40-63 µm). Les synthèses du D- et du L-lactaldéhyde sont réalisées en présence de la résine anionique DOWEX 1X8, 1,2 méq.mL⁻¹, 200-400 mesh, commercialisée par la société Acros-Organics et la résine cationique DOWEX HCR-W2, 1,8 méq.mL⁻¹, 16-40 mesh, commercialisée par la société Sigma-Aldrich.

1.4. Analyses

Les pouvoirs rotatoires sont déterminés à 25°C avec un polarimètre P-2000 JASCO PTC-262 pour la raie D du sodium ($\lambda = 589$ nm). La concentration *c* (en %) est exprimée en gramme pour 100 mL.

Les spectres de RMN sont enregistrés sur l'appareil Bruker Avance 400 (400 MHz en RMN ¹H et 101 MHz en RMN ¹³C).

Les spectres de masse ont été réalisés sur un appareil de type ThermoScientific Q-Exacte, équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI).

Les analyses par HPLC sont effectuées sur une chaîne VWR en utilisant une colonne Acclaim™ 120 C18 5 µm 120 Å (4,6 x 250 nm) et une détection à 215 nm. Les échantillons sont élués dans un système d'éluant binaire (Eluant A : solution aqueuse de TFA (0,1% v/v) - Eluant B : CH₃CN/H₂O : 4/1 et TFA (0,1% v/v)), en mode gradient : 10% à 95% en éluant B en 30 minutes avec un débit d'1 mL.min⁻¹. La température d'analyse est de 30°C. Les échantillons sont préalablement dérivatisés selon une méthode adaptée de la littérature [305] : 10 µL de milieu réactionnel sont prélevés et mélangés à 50 µL d'une solution d'hydrochlorure de *O*-benzylhydroxylamine (21,1 mg.mL⁻¹, 0,14 mmol.mL⁻¹), réalisée dans un mélange pyridine/méthanol/eau (33/15/2). 500 µL de méthanol sont ajoutés puis la solution est agitée avant d'être centrifugée (14500 rpm, 5 minutes, 25°C). 30 µL du surnageant sont ensuite utilisés pour réaliser l'analyse.

Les mesures d'absorbance dans l'UV-visible (UV-Vis), réalisées en macrocuve de 1 mL, sont effectuées avec des spectrophotomètres de marques Perkin-Elmer, modèle Lambda 25 et Agilent Technologies, modèle Cary 300 UV-Vis. La température des cuves est contrôlée au moyen d'un thermostat à effet Peltier. Les mesures d'absorbance UV-Vis réalisées en microplaques 96-puits sont effectuées avec un lecteur de microplaques de la marque TECAN, modèle Spark control 10. Celui-ci est couplé à un automate pipetteur-diluteur EVO 150 de la même marque, muni d'un bras robotisé pour le transfert de microplaques, d'une tête à quatre aiguilles et d'une tête 96-puits, pour le criblage des banques de TK_{gst} mutées. Les microplaques 96-puits utilisées pour ces mesures d'absorbance sont transparentes à fond plat et non stériles de la marque Greiner Bio-one (ref. 655101).

2. Méthodes

2.1. Production et purification des enzymes

2.1.1. Protocole général d'expression et d'extraction des enzymes

La souche bactérienne hôte utilisée est cultivée à 37°C dans un volume variable de milieu LB, supplémenté avec l'antibiotique approprié, à partir d'une préculture diluée au 1/200. Lorsque l'absorbance du milieu atteint environ 0,7 à 600 nm (phase exponentielle de croissance bactérienne), une solution d'IPTG est ajoutée au milieu ([IPTG]_{finale} = 0,5 mM) et le mélange est agité durant une nuit à 30°C, ou durant 3 heures à 28°C. La culture bactérienne est centrifugée (8000 rpm, 15 minutes, 4°C), le surnageant est éliminé et les culots cellulaires sont lavés trois fois avec le tampon adéquat. A l'issue du troisième lavage, la solution est centrifugée (4000 rpm, 15 minutes, 4°C) et le culot cellulaire obtenu est congelé à - 80°C. Après décongélation, le culot cellulaire est mis en suspension dans 7, 20 ou 35 mL de tampon approprié par gramme de cellules. Les cellules sont lysées par sonication durant 30 minutes, avec des intervalles de pulsations de 10 secondes suivis de 15 secondes de repos, avec 50 % d'amplitude et à 4°C. La suspension est ensuite centrifugée (4000 rpm, 30 minutes, 4°C). Le surnageant constitue le lysat cellulaire.

2.1.2. Protocole général de purification des enzymes par IMAC

Le lysat cellulaire est déposé sur une colonne contenant la résine NTA chargée en Nickel, préalablement équilibrée à l'aide du tampon adéquat. La résine est lavée avec ce même tampon jusqu'à l'absence de protéine en sortie de colonne (vérification par le test de Bradford qualitatif : 20 μ L de solution protéique sont mélangés à 180 μ L de réactif de Bradford). L'enzyme d'intérêt portant une étiquette 6-His est ensuite éluée avec le tampon d'éluion jusqu'à l'absence de protéine en sortie de colonne (vérification par le test de Bradford qualitatif) puis la solution recueillie est dialysée pour éliminer l'imidazole.

2.1.3. Production et purification de la TK_{gst} et des TK_{gst} mutées

2.1.3.1. Production de la TK_{gst}

Clonage

Le clonage du gène codant pour la TK_{gst} a été réalisé par le groupe du Dr. V. de Béardinis (Genoscope, CEA, Evry) dans le cadre du projet ANR DeoTK (ANR DeoTK ANR-09-BLAN-0424-CSD3). Le gène codant pour la TK_{gst} est amplifié par PCR à partir de la séquence d'ADN issue du microorganisme *G. stearothermophilus*, avec les amorces nucléotidiques suivantes, conçues à partir du programme Primer3: forward-5'-AGGCGTTAATTAATGGCGCATTCAATCGAGGAGTTGG-3' et reverse-5'-ATAGTTTGTGC-3'. Ce gène est cloné dans le plasmide pGEN452, dérivé du plasmide pET-47b(+). Celui-ci confère à la souche bactérienne hôte une résistance à la kanamycine et possède un promoteur inductible T7, permettant la surexpression de la protéine avec une étiquette 6-His à l'extrémité N-terminale, facilitant sa purification par IMAC. Le plasmide résultant est nommé pGEN717 et est inséré dans la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS par électroporation. Dans le cadre du projet ANR DeoTK, un gène « synthétique » a été construit et fourni par la société Invitrogen. Celui-ci possède 3 mutations : L397F, D399G et H479Q, effectuées pour la réalisation d'expériences de mutagenèse par cassette [60]. Ce gène « synthétique » a toujours été utilisé dans le cadre de ces travaux de thèse. Il est cloné dans le vecteur d'expression pGEN452. Le plasmide résultant se nomme pGEN768 et est inséré dans la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS par électroporation.

Expression et extraction

L'expression de la TK_{gst} est réalisée selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.1.1. avec la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS dans un volume d'un litre de milieu LB supplémenté en kanamycine. Les cellules sont lavées dans le tampon LEL (composition du tampon décrite dans le paragraphe 2.1.3.3.). Le rendement de la culture est de 3,73 g de cellules (poids humide) par litre de culture. Le culot cellulaire est mis en suspension dans 7 mL de tampon LEL par gramme de cellules. Les cellules sont lysées par sonication puis la suspension est centrifugée.

2.1.3.2. Production des TK_{gst} mutées

Production des mutants ponctuels de la TK_{gst} et des banques de TK_{gst} mutées

Les mutants ponctuels de la TK_{gst} et les banques de TK_{gst} mutées décrites dans ce manuscrit ont été conçues et construites au laboratoire, à l'exception de la banque de TK_{gst} mutées L382X/D470X, réalisée par le Dr. D. Yi, ancien doctorant dans l'équipe du Pr. W.-D. Fessner (Université Technique de Darmstadt, Allemagne).

- Conception des mutants ponctuels de la TK_{gst} et des banques de TK_{gst} mutées

Les mutations effectuées dans la séquence du gène codant pour la TK_{gst} sont introduites lors de l'amplification du gène par PCR, à partir d'une paire d'amorces nucléotidiques synthétiques conçues à l'aide du logiciel QuikChange Primer Design. Ces amorces contiennent, soit un codon spécifique d'un acide aminé, qui remplacera l'acide aminé présent dans la séquence sauvage de la TK_{gst} en une position donnée, pour la réalisation d'un mutant ponctuel de la TK_{gst}, soit des codons dégénérés NNS ou NDT, dans le cas de la création des banques de TK_{gst} mutées. Celles-ci sont recensées dans le Tableau 53 du paragraphe 1.1.4.

- Construction des mutants ponctuels de la TK_{gst} et des banques de TK_{gst} mutées

Les mutants ponctuels de la TK_{gst} et les banques de TK_{gst} mutées sont réalisés avec le kit QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis (Agilent), selon les recommandations du fournisseur.

- 1) Amplification du gène par PCR

L'amplification du gène muté est réalisée par PCR, en utilisant le plasmide pGEN768 comme matrice, à l'aide d'une Taq polymérase haute-fidélité : la *PfuUltra* « High Fidelity DNA polymerase », selon les recommandations du fournisseur, dans un thermocycleur Prime (Techne).

2) Traitement avec l'enzyme de restriction *Dpn* I

Un traitement avec l'enzyme de restriction *Dpn* I est ensuite réalisé, afin d'éliminer les plasmides parentaux méthylés et hémiméthylés et conserver uniquement les plasmides créés *de novo*. 10 U de *Dpn* I sont ajoutés dans le mélange d'ADN amplifié par PCR. Le mélange résultant est incubé 1 heure à 37°C.

Remarque : pour la construction de double mutants ponctuels de la TK_{gst} ou de banques de TK_{gst} mutées sur deux ou trois positions simultanément, la mutation d'une première position est réalisée et le mélange de plasmides obtenu sert alors de matrice pour une deuxième étape de PCR sur la deuxième position. Puis le mélange de plasmides obtenu sert à son tour de matrice pour une troisième étape de PCR sur la troisième position. A l'issue de chaque étape d'amplification par PCR, une étape de digestion par l'enzyme de restriction *Dpn* I est réalisée.

3) Amplification du plasmide créé *de novo* dans la souche ultra compétente d'*E. coli* XL10 Gold

Les plasmides non digérés portant la mutation désirée sont ensuite insérés dans la souche ultra compétente d'*E. coli* XL10 Gold. La transformation de cette souche est effectuée en milieu NZY⁺, puis celle-ci est cultivée sur boîte de Pétri en milieu LB gélosé supplémenté en kanamycine, dans le cas d'un mutant ponctuel de la TK_{gst} ou en milieu LB liquide supplémenté en kanamycine dans le cas d'une banque de TK_{gst} mutées, afin d'obtenir un nombre maximal de clones.

4) Analyse de la qualité d'un mutant ponctuel de la TK_{gst} ou d'une banque de TK_{gst} mutées

L'ADN plasmidique est ensuite purifié par lyse alcaline à l'aide des kits GenElute™ Plasmid Miniprep (cas d'un mutant ponctuel de la TK_{gst}) et GenElute™ Plasmid Midiprep (cas d'une banque de TK_{gst} mutées) (Sigma-Aldrich). Dans le cas des banques de TK_{gst} mutées, une étape de précipitation de l'ADN plasmidique est réalisée à la suite de sa purification, afin de

le concentrer et d'améliorer sa pureté. L'ADN plasmidique purifié est repris dans 100 μL d'eau puis il est quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre à microvolume Nanodrop (BioSpec-nano-Shimadzu), à 260 et 280 nm, puis séquencé par la société Eurofins Scientific (Allemagne), après amplification par PCR en présence d'une paire d'amorces nucléotidiques appropriée, décrite dans le Tableau 54 du paragraphe 1.1.4. Pour cette étape, une quantité minimale de matériel génétique de 100 ng est nécessaire dans le cas d'un mutant ponctuel de la TK_{gst} et d'environ 2 μg , dans le cas d'une banque de TK_{gst} mutées. La totalité du gène est séquencé dans le cas d'un mutant ponctuel, tandis que seule la région d'intérêt du gène est séquencée, dans le cas d'une banque.

5) Préparation et transformation de la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS

Le plasmide (cas d'un mutant ponctuel de la TK_{gst}) ou le mélange de plasmides (cas d'une banque de TK_{gst} mutées) purifié(s) est (sont) ensuite inséré(s) dans la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS par choc thermique. Les cellules sont rendues compétentes par traitement au chlorure de calcium.

6) Culture de la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS transformée

Dans le cas de la réalisation d'un mutant ponctuel de la TK_{gst} , une seule transformation est réalisée. La souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS transformée est cultivée sur deux boîtes de Pétri en milieu LB gélosé supplémenté en kanamycine, puis trois clones isolés sont à nouveau cultivés séparément dans les puits d'une microplaque 96-puits, dans 130 μL de milieu LB liquide supplémenté en kanamycine. Dans le cas de la réalisation d'une banque de TK_{gst} mutées, plusieurs transformations sont réalisées en parallèle, pour obtenir un nombre de clones suffisant. La souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS transformée est cultivée sur 2 à 15 boîtes de Pétri, selon la taille de la banque, en milieu LB gélosé supplémenté en kanamycine, puis chaque colonie isolée est à nouveau cultivée séparément dans les puits d'une microplaque 96-puits dans 130 μL de milieu LB liquide supplémenté en kanamycine.

7) Conservation des clones exprimant les mutants ponctuels de la TK_{gst} et les banques de TK_{gst} mutées

Les clones exprimant les TK_{gst} mutées (mutants ponctuels ou banques) sont conservés au congélateur à -80°C en présence de glycérol à 13%, en microplaques 96-puits. Elles constituent les plaques « sources » à partir desquelles sont réalisées les cultures des mutants ponctuels de la TK_{gst} et des banques de TK_{gst} mutées.

- Expression et extraction des mutants ponctuels de la TK_{gst} et des banques de TK_{gst} mutées

Chaque clone est transféré à l'aide d'un répliqueur en plastique dans des puits individuels de microplaques 96-puits à fond conique, contenant 130 µL par puits de milieu LB supplémenté en kanamycine, à partir des plaques « sources ». Le puits H10 n'est pas inoculé et contient uniquement du milieu LB supplémenté en kanamycine. Le puits H11 est inoculé à partir de la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS contenant le plasmide pGEN452 dépourvu du gène codant pour la TK_{gst}. Enfin, le puits H12 est inoculé à partir de la même souche contenant le plasmide pGEN768 exprimant le gène codant pour la TK_{gst}. Les plaques sont scellées à l'aide d'un film perméable, incubées à 37°C et agitées à 900 rpm durant 18 heures. Puis 50 µL de chacune de ces pré-cultures sont transférés vers les puits de plaques « deepwell » d'une contenance de 1 mL, contenant 400 µL par puits de milieu LB supplémenté en kanamycine en présence de 0,1 mM d'IPTG (solution stérilisée par filtration sur filtre Millipore® 0,2 µm). Ces plaques sont scellées à l'aide d'un film perméable et incubées à 30°C et à 900 rpm durant 24 heures.

Les cellules sont ensuite recueillies par centrifugation des plaques (3000 rcf, 20 minutes, 4°C). Le milieu de culture est retiré avec précaution et chaque culot cellulaire est lavé avec 300 µL de tampon TEA 2 mM, pH 7,15. La plaque « deepwell » est scellée à l'aide d'un film imperméable et les culots cellulaires sont mélangés à ce tampon durant 10 minutes à 30°C et 900 rpm, avant d'être séparés par centrifugation (3000 rcf, 20 minutes, 4°C). Le tampon TEA est retiré avec précaution et les culots cellulaires sont remis en suspension dans 150 µL de tampon de lyse, contenant 1/10 de solution de BugBuster® 10X (Merck), 0,5 mg.mL⁻¹ de lysozyme et 4 U.mL⁻¹ d'endonucléase benzonase. La plaque « deepwell » scellée à l'aide d'un film perméable est agitée à 37°C durant 1 heure à 900 rpm. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation (3000 rcf, 1 heure, 4°C). Le surnageant de chaque puits, constituant le lysat cellulaire, est finalement transféré dans une microplaque 96-puits à fond plat, notée « plaque mère ».

N.B. : Pour les banques de TK_{gst} mutées L191X/F435X, L191X/L382X et L382X/F435X, un volume de culture de 430 µL est préparé, pour obtenir un volume de lysat cellulaire de 160 µL.

Production des 10 TK_{gst} mutées les plus performantes

L'expression des 10 TK_{gst} mutées les plus performantes, obtenues *via* la réalisation des banques de TK_{gst} mutées, est réalisée selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.1.1., avec la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS dans un volume de 600 mL de milieu LB supplémenté en kanamycine. Les cellules sont lavées dans le tampon LEL (composition du tampon décrite dans le paragraphe 2.1.3.3.). Le rendement de la culture est compris entre 1,23 g à 2,35 g de cellules (poids humide) par 600 mL de culture. Chaque culot cellulaire est mis en suspension dans 7 mL de tampon LEL par gramme de cellules. Les cellules sont lysées par sonication puis la suspension est centrifugée.

2.1.3.3. Purification de la TK_{gst} et des TK_{gst} mutées par IMAC

Tampon de Lavage - Equilibration - Lyse (LEL)		Tampon d'éluion	
NaH ₂ PO ₄	50 mM	NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
-	-	Imidazole	500 mM
Le pH est ajusté à 8 à l'aide d'une solution de NaOH 1 M			

La purification de la TK_{gst} et des 10 TK_{gst} mutées sélectionnées est réalisée à température ambiante, selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.1.2.

La résine Ni-NTA est équilibrée et lavée avec le tampon LEL. La TK_{gst} et les 10 TK_{gst} mutées sont éluées avec le tampon d'éluion. La solution recueillie (35-55 mL) est introduite dans un « sac à dialyse », qui est mis sous agitation durant une nuit à 4°C dans 4 L de tampon TEA 2 mM, pH 7,5. Une deuxième étape de dialyse est réalisée dans l'eau pure à pH 7,5 durant 5 heures, à 4°C. La TK_{gst} et les TK_{gst} mutées purifiées en solution dans l'eau sont ensuite lyophilisées et conservées à -18°C. L'activité spécifique de la TK_{gst}, déterminée par le « test TK_{ADH} » décrit dans le paragraphe 2.2.1.1., est de 2,02 U.mg⁻¹ à 25°C. A partir de 600 mL de culture, la masse moyenne de TK_{gst} mutée lyophilisée obtenue est de 112 mg.

2.1.4. Production et purification de la TA_{tca}

Clonage

Le clonage du gène codant pour la TA_{tca} a été réalisé par le groupe du Dr. V. de Berardinis (Genoscope, CEA, Evry). Le gène codant pour la TA_{tca} (A1HUC4.pdb) est amplifié par PCR à partir de la séquence d'ADN issue du microorganisme *T. carboxydivorans* DSM 14886,

avec les amorces nucléotidiques suivantes, conçues à partir du programme Primer3 :
 forward -5'-AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCA~~TTACAAAAACCGTATTTGA~~-3'
 et reverse-5'-GCAAGAAATACTTATGGAGGGATAAGATCACTATCCATTACAC-3'. Une étiquette 6-His, en italique dans la séquence nucléotidique, est ajoutée en aval du codon « START », souligné dans la séquence, à l'extrémité N-terminale de la protéine, permettant sa purification par IMAC. Le clonage du gène dans le plasmide pET22b(+) est réalisée par la technique « LIC-PCR : ligation-independent cloning of PCR products » [315]. Ce vecteur d'expression confère à la souche bactérienne hôte une résistance à l'ampicilline et possède un promoteur inductible T7, permettant la surexpression de la protéine. Le plasmide est inséré dans la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysE par électroporation.

Expression et extraction

L'expression de la TA_{tca} est réalisée selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.1.1., avec la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysE dans un volume d'un litre de milieu LB supplémenté en ampicilline. Les cellules sont lavées dans le tampon LEL (composition du tampon décrite dans la partie *Purification*). Le rendement de la culture est de 4,45 g de cellules (poids humide) par litre de culture. Le culot cellulaire est mis en suspension dans 7 mL de tampon LEL par gramme de cellules. Les cellules sont lysées par sonication puis la suspension est centrifugée. Le surnageant (31 mL) est mélangé à 3,5 mL d'une solution de PLP (10 mM).

Purification

Tampon de Lavage - Equilibration - Lyse (LEL)		Tampon d'éluion	
KH ₂ PO ₄	50 mM	KH ₂ PO ₄	50 mM
KCl	300 mM	KCl	300 mM
Imidazole	10 mM	Imidazole	250 mM
Le pH est ajusté à 8 à l'aide d'une solution de NaOH 1 M			

La purification de la TA_{tca} est réalisée à température ambiante, selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.1.2. La résine Ni-NTA est équilibrée et lavée avec le tampon LEL. La TA_{tca} est ensuite éluée avec le tampon d'éluion. La solution recueillie (60 mL) est mélangée à 300 µL d'une solution de PLP (10 mM) puis dialysée dans trois bains successifs de sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄ (3 mol.L⁻¹), pH 8 : dans un premier bain de 1

L durant 6 heures, un second de 500 mL durant une nuit, puis un troisième de même volume durant 6 heures. A partir d'un litre de culture, 203 mg de TA_{tca} purifiée sont obtenus, dont l'activité spécifique, déterminée par le « test TA_{WST-1} » décrit dans le paragraphe 2.2.2., est de 3,5 U.mg⁻¹, à 25°C, en présence de la L-sérine et de l'α-KG. La TA_{tca} est conservée en suspension dans le sulfate d'ammonium à 4°C, en présence de PLP. Avant chaque utilisation, la suspension de TA_{tca} est centrifugée (14500 rpm, 5 minutes, 25°C) et le culot formé est solubilisé dans une solution aqueuse tamponnée ou non, après élimination du surnageant contenant le sulfate d'ammonium.

2.1.5. Production et purification de la D-AAO_{rgr}

Clonage

Le clonage du gène codant pour la D-AAO_{rgr} a été réalisé par le groupe du Pr. L. Pollegioni (Université de l'Insubrie de Lombardie (Italie)) et le protocole détaillé réalisé est décrit dans la littérature [296]. Le gène codant pour la D-AAO_{rgr} est cloné dans le plasmide pT7-HisDAAO. Celui-ci confère à la souche une résistance à l'ampicilline et possède un promoteur inductible T7, permettant la surexpression de la protéine avec une étiquette 6-His à l'extrémité N-terminale, facilitant sa purification par IMAC. Le plasmide est inséré dans la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS.

Expression et extraction

L'expression de la D-AAO_{rgr} est réalisée selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.1.1., adapté de la littérature [296], avec la souche d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS, dans un volume d'un litre de milieu LB supplémenté en ampicilline. Les cellules sont lavées dans le tampon de lyse (composition du tampon décrite dans la partie *Purification*). Le rendement de la culture est de 2,45 g de cellules (poids humide) par litre de culture. Le culot cellulaire est mis en suspension dans 35 mL de tampon de lyse par gramme de cellules. Les cellules sont lysées par sonication puis la suspension est centrifugée.

Purification

Tampon de lyse		Tampon d'équilibration-lavage		Tampon d'élution	
Na ₂ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O	50 mM	Na ₂ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O	50 mM	Na ₂ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O	50 mM
C ₂ H ₆ OS	5 mM	NaCl	1 M	Imidazole	500 mM
FAD	0,1 mM	Imidazole	20 mM	Glycérol	5% (v/v)
-	-	Glycérol	5% (v/v)	-	-
Le pH est ajusté à 7,2 à l'aide d'une solution de NaOH 1M					

La purification de la D-AAO_{rg}r est réalisée en chambre froide à 4°C, selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.1.2., adapté de la littérature [296]. La résine Ni-NTA est équilibrée et lavée avec le tampon d'équilibration-lavage. La D-AAO_{rg}r est ensuite éluée avec le tampon d'éluion. La solution recueillie (55 mL) est introduite dans un « sac à dialyse », qui est mis sous agitation durant une nuit à 4°C dans 4 L d'eau pure, pH 7,5. Une seconde étape de dialyse est réalisée dans un nouveau bain de 4 L d'eau pure, pH 7,5, durant 5 heures à 4°C. La D-AAO_{rg}r purifiée en solution dans l'eau et en présence de FAD est lyophilisée et conservée à -18°C. A partir d'un litre de culture, 144 mg de D-AAO_{rg}r lyophilisée sont obtenus, dont l'activité spécifique, déterminée par le « test D-AAO_{rg}r-LDH » décrit dans le paragraphe 2.2.3., est de 37,4 U.mg⁻¹, à 25°C en présence de la D-sérine.

2.1.6. Production et purification de la FSA_{eco} et des FSA_{eco} mutées

Clonage

Le clonage des gènes codant pour la FSA_{eco} et les FSA_{eco} mutées A129G et A165G/S166P a été réalisé par le groupe du Pr. P. Clapés (Institut de Chimie Avancée de Catalogne, Barcelone, Espagne). Le protocole détaillé réalisé est décrit dans la littérature [305]. Les gènes codants pour ces enzymes sont clonés dans le plasmide pQE40. Celui-ci confère à la souche une résistance à l'ampicilline et possède un promoteur inductible T7, permettant la surexpression des protéines. Le plasmide est inséré dans la souche d'*E. coli* M-15 [pREP-4].

Expression et extraction

L'expression de la FSA_{eco} et des FSA_{eco} mutées A129G et A165G/S166P est réalisée selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.1.1., adapté de la littérature [305], avec la souche d'*E. coli* M-15 [pREP-4], dans un volume de 600 mL de milieu LB supplémenté en ampicilline et en kanamycine. Les cellules sont lavées dans le tampon LEL (composition du tampon décrite dans le paragraphe 2.1.3.3.). Le rendement de la culture est de 1,01 g de cellules (poids humide) pour 600 mL de culture pour la FSA_{eco}, de 1,10 g pour le mutant A129G et de 1,33 g pour le mutant A165G/S166P. Chaque culot cellulaire est mis en suspension dans 20 mL de tampon Gly-gly 50 mM, pH 8,5 par gramme de cellules. Les cellules sont lysées par sonication puis la suspension est centrifugée.

Purification

Les étapes de purifications de la FSA_{eco} et des FSA_{eco} mutées A129G et A165G/S166P sont réalisées à température ambiante, à l'exception du choc thermique, selon un protocole adapté de la littérature [305]. Le lysat cellulaire contenant la FSA_{eco} ou les FSA_{eco} mutées est chauffé pendant 30 minutes à 70°C. Après centrifugation (15000 rpm, 15 minutes, 4°C), le surnageant contient la FSA_{eco} (sauvage ou mutée) purifiée dans le tampon Gly-gly 50 mM, pH 8,5. Celui-ci est ensuite remplacé par de l'eau pure, pH 8,5 par dialyse. Une solution de 20 mL de FSA_{eco} (sauvage ou mutée) est introduite dans un « sac à dialyse » qui est mis sous agitation durant une nuit à 4°C dans 4 L d'eau pure, pH 8,5. Une seconde étape de dialyse est réalisée dans un nouveau bain de 4 L d'eau pure, pH 8,5 durant 5 heures à 4°C. L'enzyme purifiée en solution dans l'eau est lyophilisée et conservée à -18°C. 61 mg de FSA_{eco} lyophilisée, 57 mg du mutant A129G lyophilisé et 59 mg du mutant A165G/S166P lyophilisé sont obtenus.

2.1.7. Stockage des enzymes

La TK_{gst} ainsi que les TK_{gst} mutées peuvent être conservées durant deux semaines à 4°C et durant plusieurs semaines à -18°C, en solution tamponnée, sans perte d'activité. La D-AAO_{rgf} peut être conservée durant plusieurs semaines à 4°C et durant plusieurs mois à -18°C, en solution tamponnée, sans perte d'activité. Ces enzymes, ainsi que la FSA_{eco} et les FSA_{eco} mutées, peuvent être lyophilisées et conservées à -18°C, durant plusieurs mois, sans perte d'activité. Enfin, la TA_{tca} peut être conservée sous la forme d'une suspension dans le sulfate d'ammonium (3 mol.L⁻¹) à 4°C, durant plusieurs mois, sans perte d'activité.

2.1.8. Dosage des protéines par le test de Bradford

La concentration en protéines d'une solution, exprimée en mg.mL⁻¹, est déterminée par le test de Bradford [230]. Le bleu de Coomassie G-250 contenu dans la solution de Bradford (Bio-Rad) réagit avec les acides aminés basiques et aromatiques [316] et l'absorbance du milieu est mesurée à 595 nm. Dans une cuve spectrophotométrique ($V_{\text{cuve}} = 1 \text{ mL}$), 980 μL de solution de Bradford sont mélangés à 20 μL de solution protéique à doser, diluée ou non. L'absorbance du milieu est mesurée à 595 nm, après 10 minutes d'incubation dans l'obscurité, à 25°C. Une droite de calibration est effectuée pour différentes concentrations en protéines (2 à 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, concentrations finales dans la cuve) en utilisant la BSA (albumine de sérum bovin) comme protéine de référence. L'absorbance mesurée varie de façon linéaire avec la concentration en BSA de 2 à 18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Le test est également réalisé en microplaque 96-puits dans les mêmes conditions. Dans un puits ($V_{\text{puits}} = 200 \mu\text{L}$),

160 μL de solution de Bradford sont mélangés à 40 μL de solution protéique à doser. Une droite de calibration est réalisée et l'absorbance mesurée varie de façon linéaire avec la concentration en BSA de 10 à 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (concentrations finales dans le puits).

2.1.9. Electrophorèse en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE)

L'électrophorèse en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE) est réalisée selon un protocole adapté de celui du Pr. U. K. Laemmli [229]. Le gel d'électrophorèse est constitué d'un gel de concentration de 4% w/v en acrylamide/bis-acrylamide et d'un gel de séparation de 15% w/v en acrylamide/bis-acrylamide et contenant 0,1% w/v de SDS. Les gels de concentration et de séparation sont préparés (Tableau 55) puis coulés et polymérisés dans un système Mini-Protean (Bio-Rad).

Constituants	Gel de concentration	Gel de séparation
Eau pure	3,075 mL	3,6 mL
Tampon Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	1,25 mL	-
Tampon Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	-	3,75 mL
Dodécylsulfate de sodium (SDS) (20 % w/v)	0,025 mL	0,075 mL
Acrylamide/bis-acrylamide 30% (Bio-Rad)	0,67 mL	7,5 mL
Persulfate d'ammonium (APS) (10 % w/v)	0,025 mL	0,075 mL
Tétraméthyléthylènediamine (TEMED)	0,01 mL	0,02 mL
Volume total	5 mL	15 mL

Tableau 55 : Composition des gels de concentration et de séparation

Les échantillons sont préparés en mélangeant 20 μL d'une solution protéique de concentration connue (0,63 à 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) et 5 μL de tampon de dénaturation, contenant 10% w/v de SDS et 10 mM de β -mercaptoéthanol (Tableau 56).

Constituants	Quantités
Eau pure	2 mL
Tampon Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	2 mL - 0,2 M
Glycérol	1 mL - 20% v/v
Bleu de bromophénol	2,5 mg (0,05 % w/v)
Dodécylsulfate de sodium (SDS)	0,5 g (10% w/v)
β -mercaptoéthanol - $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$	3,5 μL - 10 mM
Volume total	5 mL

Tableau 56 : Composition du tampon de dénaturation

Le mélange est agité, incubé pendant 5 minutes à 95°C et est ensuite déposé sur le gel d'électrophorèse. Un marqueur constitué de protéines de référence de masse moléculaire connue (All Blue Prestained Protein Standards, Bio-Rad) est également déposé dans un des puits du gel (10 µL). La migration s'effectue dans le tampon de migration (Tableau 57) dilué 10 fois, sous l'effet d'un champ électrique constant de 130 V et durant environ 1h30.

Constituants	Quantités
Tampon Tris-HCl	19,7 g - 250 mM
Glycine	75 g - 2 M
Dodécylsulfate de sodium (SDS)	5 g - 1 % w/v
Volume total	500 mL

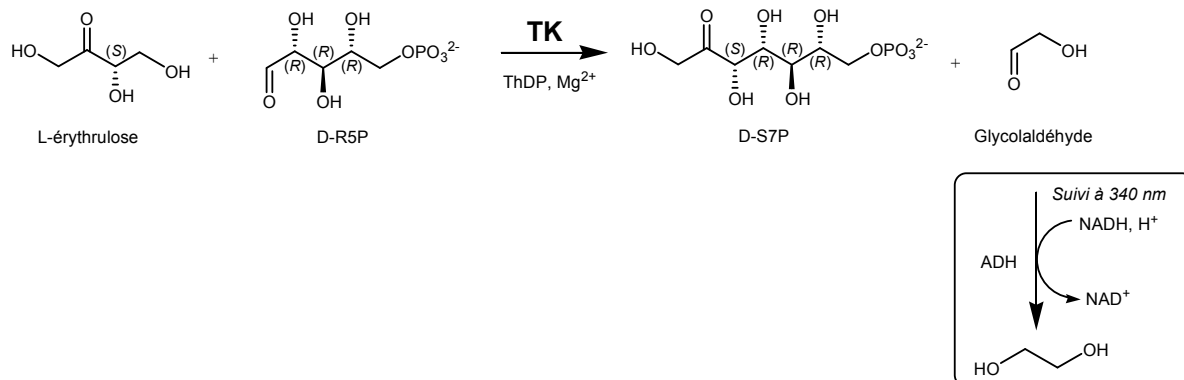
Tableau 57 : Composition du tampon de migration

Les protéines sont révélées après coloration durant une nuit à température ambiante dans une solution contenant 0,2 % w/v de bleu de Coomassie (Brilliant Bleu G-250, Sigma), 50 mL d'eau pure, 40 mL de méthanol et 10 mL d'acide acétique. Le gel est ensuite décoloré dans un bain d'une solution contenant 50 mL d'eau pure, 40 mL de méthanol et 10 mL d'acide acétique. Cette solution est renouvelée toutes les 45 minutes jusqu'à l'obtention d'une décoloration satisfaisante.

2.2. Tests enzymatiques

2.2.1. Détermination de l'activité de la TK_{gst} et des TK_{gst} mutées

2.2.1.1. Détermination de l'activité en présence d'une enzyme auxiliaire (« test TK_{ADH} »)



Test en macrocuvette

Dans une cuve spectrophotométrique ($V_{\text{cuve}} = 1 \text{ mL}$), sont introduits :

- 800 μL de tampon Gly-gly 0,1 M pH 7,5
- 20 μL de NADH, H^+ (sel disodique, 10 mg.mL^{-1})
- 5 μL de ThDP (10 mg.mL^{-1})
- 10 μL de MgCl_2 (10 mg.mL^{-1})
- 100 μL de L-érythrose (120 mg.mL^{-1})
- 50 μL de D-ribose-5-phosphate (50 mg.mL^{-1})
- 5 μL d'ADH (5000 U.mL^{-1})
- 10 μL de TK (V_{TK})

L'enzyme est incubée à la température souhaitée pendant 5 minutes, en présence de tous les constituants hormis le D-ribose-5-phosphate, dont l'ajout permet d'initier la réaction. La diminution de l'absorbance (A) est mesurée à 340 nm pendant 10 minutes. La pente $\Delta A/\Delta t$ mesurée correspond à la quantité de NADH, H^+ consommée lors de la réduction du glycolaldéhyde par l'ADH. L'activité de la TK est calculée en utilisant l'équation suivante, issue de la loi de Beer-Lambert :

$$\text{Activité} = \frac{\Delta A / \Delta t}{\varepsilon_{\text{NADH}} \times \ell} \times \frac{V_{\text{cuve}}}{V_{\text{TK}}} \times 10^3$$

Avec l'activité exprimée en U.mL⁻¹ (μmol.min⁻¹.mL⁻¹), Δt en minutes, V_{cuve} et V_{TK} en mL, la largeur de la cuve ℓ = 1 cm et le coefficient d'absorption molaire ε_{NADH} = 6220 M⁻¹.cm⁻¹.

Une unité est définie comme la quantité de TK_{gst} catalysant la conversion d'1 μmol de L-érythrose ou de D-ribose-5-phosphate (ou de glycolaldéhyde) par minute à 25°C dans le tampon Gly-gly 0,1 M, pH 7,5.

L'activité spécifique de la TK est définie de la façon suivante :

$$\text{Activité spécifique} = \frac{\text{Activité enzymatique}}{\text{Concentration en protéines}}$$

Avec l'activité spécifique exprimée en U.mg⁻¹ de protéines, l'activité enzymatique en U.mL⁻¹ et la concentration de protéines en mg.mL⁻¹.

N. B : Pour la détermination de l'activité de la TK_{gst} après purification, un volume de 10 μL est utilisé, correspondant à une concentration finale moyenne en protéine de 26 μg.mL⁻¹.

Test en microplaques 96-puits

Dans un puits (V_{puits} = 250 μL), sont introduits :

- 110 μL de tampon Gly-gly 0,1 M pH 7,5
- 10 μL de NADH, H⁺ (sel disodique, 10 mg.mL⁻¹)
- 10 μL de ThDP (27,6 mg.mL⁻¹)
- 5 μL de MgCl₂ (91,4 mg.mL⁻¹)
- 50 μL de L-érythrose (51 mg.mL⁻¹)
- 5 μL d'ADH (5000 U.mL⁻¹)
- 50 μL de D-ribose-5-phosphate (12,2 mg.mL⁻¹)
- 10 μL de TK (V_{TK})

L'enzyme est incubée à la température souhaitée pendant 5 minutes, en présence de tous les composants hormis le D-ribose-5-phosphate, dont l'ajout permet d'initier la réaction. La diminution de l'absorbance (ΔA/Δt) est mesurée à 340 nm pendant 10 minutes. L'activité de la TK est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$Activité = \frac{\Delta A / \Delta t}{\varepsilon_{NADH} \times \ell} \times \frac{V_{puits}}{V_{TK}} \times 10^3$$

Avec l'activité exprimée en U.mL⁻¹ (μmol.min⁻¹.mL⁻¹), Δt en minutes, V_{puits} et V_{TK} en mL, et le coefficient d'absorption molaire ε_{NADH} = 6220 M⁻¹.cm⁻¹. Pour un volume de 250 μL, la hauteur du puits vaut ℓ = 0,73 cm.

N.B : La détermination de l'activité de la TK_{gst} (48 μg.mL⁻¹, 12 μg par puits) en fonction de la concentration en cofacteurs a été réalisée pour des concentrations en ThDP et en MgCl₂ comprises respectivement entre 0 et 2,4 mM et 0 et 9 mM.

2.2.1.2. Détermination de l'activité en présence du rouge de phénol (« test TK_{ROUGE DE PHENOL} »)

Conditions du test pour la détermination de l'activité spécifique de la TK_{gst} (sauvage ou mutée) purifiée

Dans un puits (V_{puits} = 200 μL) d'une microplaque 96-puits, sont introduits :

Composant	Solution mère	Volume [μL]	Concentration finale
TK _{gst} (sauvage ou mutée) purifiée	Variable	40	Variable
ThDP	1-24 mM	20	0,1-2,4 mM
MgCl ₂	100-900 mM	2	1-9 mM
Rouge de phénol	2,8 mM	6	84 μM
Substrat accepteur	100 mM - 1 M	40	20-200 mM
Substrat donneur	100-500 mM	20	10-50 mM
Tampon TEA pH 7,15	-	72	2 mM
Volume total	-	200	-

Une solution mère contenant tous les composants du test sauf la TK et ses substrats est préparée et son pH est ajusté à 7,15 à l'aide d'une solution de NaOH (0,1 M). Dans le puits d'une microplaque 96-puits, 100 μL de cette solution sont ajoutés à 40 μL d'une solution de TK_{gst} (sauvage ou mutée) purifiée, réalisée dans le tampon TEA 2 mM pH 7,15 et de concentration variable. Le substrat accepteur, en solution dans le tampon TEA 2 mM pH 7,15 est ensuite ajouté (40 μL) puis la réaction est ensuite initiée par l'ajout du Li-HPA (20 μL), préparé dans ce même tampon. La solution est homogénéisée et l'absorbance du milieu est mesurée à 560 nm et à 25°C au cours du temps, par le lecteur de microplaques.

Pour la détermination de l'activité spécifique de la TK_{gst} à 25°C et 60°C vis-à-vis des aldéhydes α-hydroxylés (2S), le test est réalisé en macrocuve (V = 1 mL). Le même protocole est réalisé avec les volumes et concentrations mentionnés dans le tableau ci-dessous.

Composant	Solution mère	Volume [μL]	Concentration finale
TK _{gst} (sauvage ou mutée) purifiée	1-2,25 mg.mL ⁻¹	200	200-450 μg.mL ⁻¹
ThDP	1 mM	100	0,1 mM
MgCl ₂	100 mM	10	1 mM
Rouge de phénol	2,8 mM	30	84 μM
Aldéhyde α-hydroxylé (2S)	500 mM	200	100 mM
Li-HPA	500 mM	100	50 mM
Tampon TEA pH 7,15	-	360	2 mM
Volume total	-	1000	-

- Calcul de l'activité

L'activité de la TK est calculée à partir de l'absorbance mesurée à 560 nm au cours du temps et de la « courbe de calibration standard », dont la réalisation est décrite dans le paragraphe *Calibration du test d'activité en fonction de la concentration en NaHCO₃* (« Courbe de calibration standard »), qui est de la forme $y = ax + b$. L'activité est obtenue par l'équation suivante :

$$\text{Activité} = \frac{\Delta A_{560}}{dt} \times \frac{1}{a} \times V_{\text{puits}} \times 10^{-3}$$

Avec l'activité en U (μmol.min⁻¹), l'absorbance A₅₆₀ en UA, le temps t en min, volume du puits : 200.10⁻⁶ L, la pente $a = 0,3484 \text{ UA.mM}^{-1}$

Une unité (U) correspond à la formation d' 1 μmol d'ions HCO₃⁻ par minute dans un puits, dans les conditions du test.

Pour le test d'activité réalisé en macrocuve, l'activité de la TK est calculée comme explicité précédemment, à partir de l'absorbance mesurée à 560 nm au cours du temps et de la courbe de calibration « standard » (en présence des ions bicarbonates), réalisée selon le même protocole mais en macrocuve.

L'activité spécifique de la TK est définie selon la formule décrite dans le paragraphe 2.2.1.1.

- Calibration du test d'activité en fonction de la concentration en NaHCO_3 (« Courbe de calibration standard »)

La courbe de calibration standard est obtenue en mesurant l'absorbance du milieu en fonction de la concentration en NaHCO_3 (0 à 0,8 mM). 40 μL de solution mère de NaHCO_3 , préparée dans le tampon TEA 2 mM, pH 7,15 et dont la concentration varie de 0 à 4 mM, sont introduits dans les puits d'une microplaque 96-puits. Puis 160 μL d'une solution contenant les réactifs du test sauf le Li-HPA sont ajoutés, telle que les concentrations finales dans le puits soient de 0,1 mM de ThDP, 1 mM de MgCl_2 , 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de TK_{gst} , 84 μM de rouge de phénol, 20 mM de D-glycéraldéhyde et 2 mM de tampon TEA pH 7,15. L'absorbance du milieu est mesurée à 560 nm pour chaque concentration en ions HCO_3^- testée. L'expérience est réalisée en triplicata. Une droite d'équation $y = ax + b$ est obtenue ; $a = 0,3484 \text{ UA}\cdot\text{min}^{-1}$.

- Calibration du test d'activité en fonction de la quantité de TK_{gst}

La TK_{gst} et le D-glycéraldéhyde sont utilisés comme références pour réaliser cette droite de calibration. 40 μL de solutions mères de TK_{gst} purifiée, préparées dans le tampon TEA 2 mM pH 7,15 et dont la concentration varie de 0 à 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, sont introduites dans les puits d'une microplaque 96-puits. Les activités sont déterminées en présence du D-glycéraldéhyde (20 mM) et du Li-HPA (50 mM) selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.2.1.2., en microplaques 96-puits et à 25°C, en présence de 0,1 mM de ThDP et de 1 mM de MgCl_2 . La variation de l'absorbance du milieu est mesurée durant les cinq premières minutes de la réaction et les pentes, exprimées en $\text{UA}\cdot\text{min}^{-1}$, sont également déterminées. L'expérience est réalisée en triplicata.

- Calcul des limites de détection et de quantification

A partir de la courbe de calibration du test d'activité en fonction de la quantité de TK_{gst} , la régression linéaire effectuée conduit à une équation de la forme $y = ax + b$. La limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) sont calculées à l'aide des formules suivantes :

$$LOD = 3,3 \times \frac{\sigma_b}{a} \quad \text{et} \quad LOQ = 3 \times LOD$$

avec σ_b : l'écart-type sur b

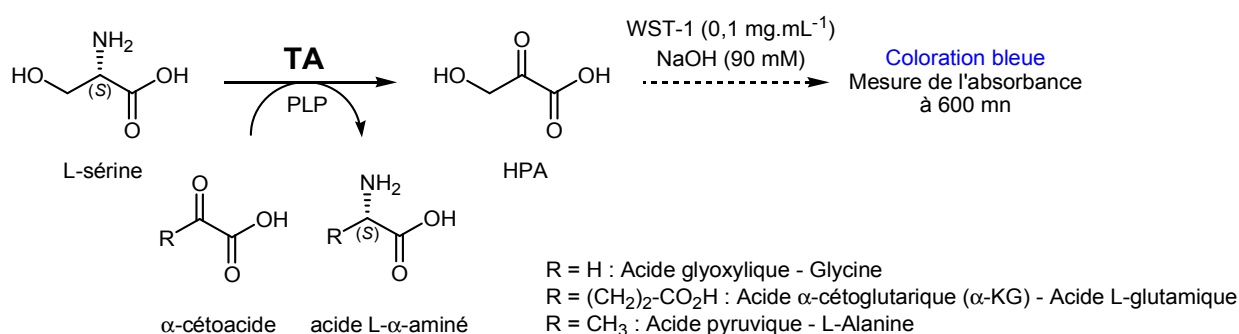
La LOD est estimée à 1,7 mU, ce qui correspond à une pente mesurée de 0,003 UA.min⁻¹ ; la LOQ atteint 5,2 mU, ce qui correspond à une pente de 0,009 UA.min⁻¹. De plus, l'absorbance n'est plus linéaire au-dessus de 26 mU, soit une pente de 0,046 UA.min⁻¹.

Conditions du test pour le criblage de banques de TK_{gst} mutées

Le criblage des banques de TK_{gst} mutées est effectué sur la plateforme robotisée TECAN®, à l'aide du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} » décrit dans le paragraphe 2.2.1.2., en microplaques 96-puits et à 25°C, utilisé comme test de criblage haut débit. L'automate de pipetage réalise le mélange des différents réactifs nécessaires pour mesurer l'activité de chaque TK_{gst} mutée.

40 µL de lysat cellulaire sont répartis dans des microplaques 96-puits à fond plat à partir de la « plaque mère ». Puis 100 µL d'une solution contenant les réactifs du test (2 mM de tampon TEA pH 7,15, 1 mM de ThDP, 1 mM de MgCl₂ et 84 µM de rouge de phénol) sont ajoutés dans chaque puits contenant les lysats cellulaires. Les différents aldéhydes accepteurs, en solution dans le tampon TEA 2 mM pH 7,15 (100 mM - 1 M) sont ensuite ajoutés (40 µL) puis chaque réaction est initiée par l'ajout de 10 mM de Li-HPA (20 µL) préparé dans ce même tampon. Le mélange est agité puis l'absorbance du milieu est mesurée par le lecteur de microplaques aussitôt après l'ajout du Li-HPA (Ai), puis après 30 minutes d'incubation à 25°C (Af).

2.2.2. Détermination de l'activité des transaminases (« test TA_{WST-1} »)



Le criblage de la banque des L-α-TAs ainsi que la caractérisation de la TA_{tca} ont été réalisés à l'aide d'un test d'activité séquentiel décrit dans la littérature [274] et basé sur le dosage indirect du HPA formé au cours du temps.

La TA est mise en présence d'un α -cétoacide, l'acide glyoxylique (5 mM), l' α -KG (3 à 5 mM) ou l'acide pyruvique (5 à 50 mM) et du PLP (0,2 mM), en solution dans le tampon HEPES 0,1 M pH 7,5. Puis la L-sérine (5 à 250 mM) est ajoutée au mélange pour initier la réaction. Les réactions enzymatiques peuvent être réalisées selon les besoins dans un puits d'une microplaque 96-puits ($V_{\text{puits}} = 200 \mu\text{L}$), dans une cuve spectrophotométrique ($V_{\text{cuve}} = 1 \text{ mL}$) ou dans un microtube de 1,5 mL.

Des prélèvements de 20 μL du milieu réactionnel sont réalisés au cours du temps et mélangés à 180 μL d'une solution basique contenant 90 μL d'une solution de NaOH (0,2 M) et 90 μL d'une solution du colorant WST-1 (0,22 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), dont l'absorbance a préalablement été mesurée à 600 nm (A_{initiale}). Le mélange est placé dans un puits d'une microplaque 96-puits recouverte d'un film imperméable puis celle-ci est incubée 10 minutes à 60°C. L'absorbance du milieu est à nouveau mesurée à 600 nm (A_{finale}). L'activité de la TA est calculée en utilisant l'équation suivante, issue de la loi de Beer-Lambert :

$$\text{Activité} = \frac{A_{\text{finale}} - A_{\text{initiale}}}{\varepsilon_{\text{WST-1}} \times \ell} \times \frac{V_{\text{puits}}}{V_{\text{TA}}} \times 10^3$$

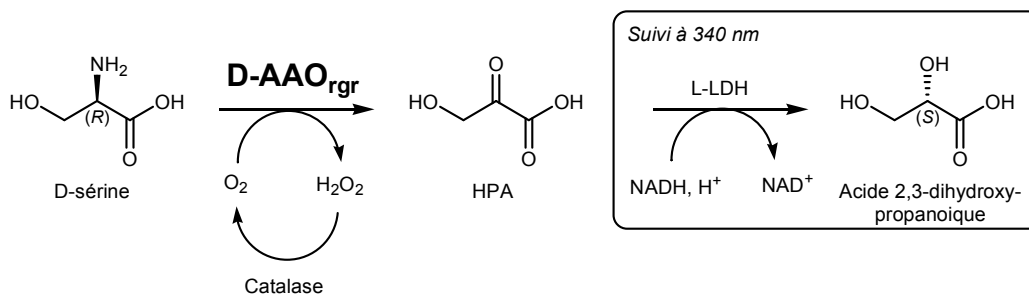
Avec l'activité exprimée en $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$), V_{puits} et V_{TA} en mL, et le coefficient d'absorption molaire $\varepsilon_{\text{WST-1}} = 42000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Pour un volume de 200 μL , la hauteur du puits vaut $\ell = 0,59 \text{ cm}$.

Une unité est définie comme la quantité de TA catalysant la conversion d'1 μmole de L-sérine ou d' α -cétoacide par minute à 25°C dans le tampon HEPES 0,1 M, pH 7,5.

L'activité spécifique de la TA est définie selon la formule décrite dans le paragraphe 2.2.1.1.

Une droite de calibration est effectuée pour différentes concentrations en HPA (0 à 2 mM, concentrations finales dans le puits). L'absorbance est mesurée à 600 nm et varie de façon linéaire avec la concentration en HPA de 0 à 0,12 mM.

2.2.3. Détermination de l'activité de la D-AAO_{rgr} (« test D-AAO_{rgr}-L-LDH »)



Dans une cuve spectrophotométrique ($V_{\text{cuve}} = 1 \text{ mL}$), sont introduits :

- 790 μL de tampon Tris 50 mM pH 7,5 préalablement saturé en O₂
- 20 μL de NADH, H⁺ (10 mg.mL⁻¹)
- 60 μL de L-LDH (187 U.mL⁻¹)
- 30 μL de catalase (17600-44000 U.mL⁻¹)
- 50 μL de D-AAO_{rgr} ($V_{\text{D-AAO}_{\text{rgr}}}$)
- 50 μL de D-sérine (150,1 mg.mL⁻¹)

L'enzyme est incubée à la température souhaitée pendant 5 minutes, en présence de tous les constituants du test hormis la D-sérine, dont l'ajout permet d'initier la réaction. La diminution de l'absorbance (A) est mesurée à 340 nm pendant 10 minutes. La pente $\Delta A/\Delta t$ mesurée correspond à la quantité de NADH, H⁺ consommée lors de la réduction du HPA par la L-LDH. L'activité de la D-AAO_{rgr} est calculée en utilisant l'équation suivante, issue de la loi de Beer-Lambert :

$$\text{Activité} = \frac{\Delta A/\Delta t}{\varepsilon_{\text{NADH}} \times \ell} \times \frac{V_{\text{cuve}}}{V_{\text{D-AAO}_{\text{rgr}}}} \times 10^3$$

Avec l'activité exprimée en U.mL⁻¹ ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$), Δt en minutes, V_{cuve} et $V_{\text{D-AAO}_{\text{rgr}}}$ en mL, et le coefficient d'absorption molaire $\varepsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et la largeur de cuve $\ell = 1 \text{ cm}$

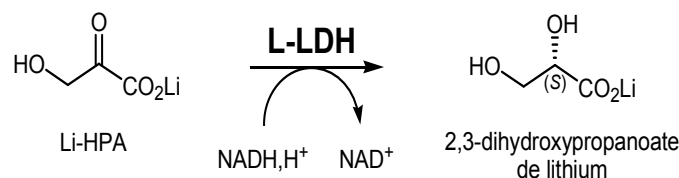
Une unité est définie comme la quantité de D-AAO_{rgr} catalysant la conversion d'une 1 μmol de D-sérine (ou de HPA) par minute à 25°C dans le tampon Tris 50 mM, pH 7,5.

L'activité spécifique de la D-AAO_{rgr} est définie selon la formule décrite dans le paragraphe 2.2.1.1.

N. B : Pour la détermination de l'activité de la D-AAO_{rg}, un volume de 50 µL est utilisé, correspondant à une concentration de 0,9 µg.mL⁻¹.

2.2.4. Dosage du Li-HPA

2.2.4.1. Test en macrocuve



Dans une cuve spectrophotométrique ($V_{\text{cuve}} = 1 \text{ mL}$), sont introduits :

- 940 µL de tampon TEA 0,1 M, pH 7,5
- 20 µL de NADH, H⁺ (10 mg.mL⁻¹)
- 20 µL de L-LDH (187 U.mL⁻¹)
- 20 µL d'échantillon à doser

L'absorbance initiale (A_{initiale}) est déterminée à 340 nm puis la solution de Li-HPA à doser diluée ou non ($V_{\text{échantillon}}$) est ensuite introduite. Après stabilisation, l'absorbance finale est mesurée (A_{finale}). La concentration en Li-HPA est donnée par l'équation suivante, issue de la loi de Beer-Lambert :

$$[\text{Li} - \text{HPA}] = \frac{(A_{\text{initiale}} - A_{\text{finale}}) \times V_{\text{cuve}}}{V_{\text{échantillon}} \times \varepsilon_{\text{NADH}} \times \ell} \times 10^3$$

Avec [Li-HPA] exprimée en mM, V_{cuve} et $V_{\text{échantillon}}$ en mL, le coefficient d'absorption molaire $\varepsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et la largeur de la cuve $\ell = 1 \text{ cm}$

Pour doser la pureté d'un lot de Li-HPA, une solution de 0,5 mg.mL⁻¹ en Li-HPA est préparée à l'aide d'une fiole jaugée et 20 µL de cette solution sont dosés selon le protocole décrit ci-dessus. La concentration en Li-HPA est déterminée en mM. La pureté de l'échantillon est calculée en faisant le rapport entre la concentration mesurée et la concentration théorique.

2.2.4.2. Test en microplaque 96-puits

Dans un puits ($V_{\text{puits}} = 250 \mu\text{L}$), sont introduits :

- 218 μL de tampon TEA 0,1 M, pH 7,5
- 10 μL de NADH, H^+ (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- 2 μL de L-LDH (187 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- 20 μL d'échantillon à doser

L'absorbance initiale (A_{initiale}) est déterminée à 340 nm puis la solution de Li-HPA à doser diluée ou non ($V_{\text{échantillon}}$) est ensuite introduite. Après stabilisation, l'absorbance finale est mesurée (A_{finale}). La concentration en Li-HPA est donnée par l'équation suivante :

$$[\text{Li} - \text{HPA}] = \frac{(A_{\text{initiale}} - A_{\text{finale}}) \times V_{\text{puits}}}{V_{\text{échantillon}} \times \epsilon_{\text{NADH}} \times \ell} \times 10^3$$

Avec [Li-HPA] exprimée en mM, V_{puits} et $V_{\text{échantillon}}$ en mL et le coefficient d'absorption molaire $\epsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Pour un volume de 250 μL , la hauteur du puits vaut $\ell = 0,73 \text{ cm}$.

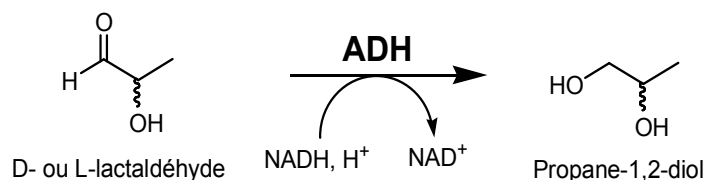
2.2.5. Etude de la stabilité du Li-HPA

La stabilité du Li-HPA est étudiée dans l'eau pure à différentes températures (25°C, 50°C, 60°C et 65°C), différents pH (6,5, 7 et 7,5) en l'absence ou en présence des cofacteurs de la TK_{gst} et ce, à différentes concentrations ($[\text{ThDP}] = 0,1$ et 2,4 mM et $[\text{MgCl}_2] = 1$ et 9 mM).

Le ThDP (0,9-22 mg, 2-48 μmol , 0,1-2,4 mM) et le MgCl_2 (4-36 mg, 20-180 μmol , 1-9 mM) sont dissous dans 10 mL d'eau et le pH est ajusté au pH étudié avec une solution de NaOH (0,1 M ou 0,01 M) (Solution A). Dans un autre récipient, le Li-HPA (110,02 mg, 110 μmol , 50 mM) est dissous dans 10 mL d'eau et le pH est ajusté au pH étudié avec une solution de NaOH (0,1 M) (Solution B). Les solutions A et B sont mélangées et agitées à 250 rpm à la température étudiée. Le pH de la solution est maintenu constant au moyen d'un pH-stat, *via* l'ajout d'HCl 0,1 M ou de NaOH 0,3 M, selon les conditions expérimentales. Des prélèvements de 15 μL de milieu réactionnel sont effectués au cours du temps jusqu'à disparition totale du Li-HPA, dilués dans 85 μL d'eau tel que la concentration de la solution fille soit au maximum de 7,5 mM de Li-HPA, puis 20 μL de cette solution sont dosés selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.2.4.1.

N.B. : Dans le cas de l'étude de la stabilité du Li-HPA en l'absence des cofacteurs, le Li-HPA est dissous dans 20 mL d'eau et le pH de la solution est ajusté au pH souhaité.

2.2.6. Dosage du D-lactaldéhyde et du L-lactaldéhyde



Dans une cuve spectrophotométrique ($V_{\text{cuve}} = 1 \text{ mL}$), sont introduits :

- 900 μL de tampon Gly-gly 0,1 M pH 7,5
- 20 μL de NADH, H^+ (10 mg.mL^{-1})
- 70 μL de l'ADH (3432 U.mL^{-1})
- 10 μL d'échantillon à doser

L'absorbance initiale (A_{initiale}) est déterminée à 340 nm puis la solution de D- ou L-lactaldéhyde à doser ($V_{\text{échantillon}}$) est ensuite introduite. Après stabilisation, l'absorbance finale est mesurée (A_{finale}). La concentration en D- ou L-lactaldéhyde est donnée par l'équation suivante, issue de la loi de Beer-Lambert :

$$[\text{D - ou L - lactaldéhyde}] = \frac{(A_{\text{initiale}} - A_{\text{finale}}) \times V_{\text{cuve}}}{V_{\text{échantillon}} \times \varepsilon_{\text{NADH}} \times \ell} \times 10^3$$

Avec [D- ou L-lactaldéhyde] exprimée en mM, V_{cuve} et $V_{\text{échantillon}}$ en mL, le coefficient d'absorption molaire $\varepsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et la largeur de la cuve $\ell = 1 \text{ cm}$

2.3. Caractérisation de la TK_{gst} et des TK_{gst} mutées les plus performantes

2.3.1. Etude de la thermostabilité de la TK_{gst} et des mutants L382D/D470S, L191I, L382F/F435Y, R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S

La thermostabilité de la TK_{gst} et des mutants L191I, L382F/F435Y, R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S est étudiée à 60°C et la thermostabilité du mutant L382D/D470S est étudiée à 50°C et 60°C. L'extrait purifié de TK_{gst} (4,5 mg.mL^{-1} , 9 U.mL^{-1}), du mutant

L382D/D470S (4,5 mg.mL⁻¹, 0,2 U.mL⁻¹), du mutant L191I (2 mg.mL⁻¹, 2,4 U. mL⁻¹), du mutant L382/F435Y (2 mg.mL⁻¹, 1,8 U. mL⁻¹), du mutant R521Y/H462N (2 mg.mL⁻¹, 1 U.mL⁻¹), du mutant R521V/S385D/H462S (6 mg.mL⁻¹, 0,06 U. mL⁻¹), en solution dans le tampon Gly-gly 0,1 M, pH 7,5, est incubé dans un microtube de 1,5 mL placé sur une table d'agitation thermorégulée et agité à 150 rpm à la température étudiée, jusqu'à l'inactivation totale de l'enzyme. Des prélèvements de 10 µL (cas de la TK_{gst} et des mutants L191I et L382F/F435Y) ou de 50 µL (cas des mutants L382D/D470S, R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S) sont effectués au cours du temps et dosés par le « test TK_{ADH} », décrit dans le paragraphe 2.2.1.1. en macrocuve et à 25°C. Les mesures sont réalisées en triplicata.

N.B. : Le « test TK_{ADH} » est effectué en présence de 760 µL de tampon Gly-gly 0,1M pH 7,5, en présence des mutants L382D/D470S, R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S,

2.3.2. Détermination de la température optimale du mutant L382D/D470S

La température optimale du mutant L382D/D470S est déterminée par la mesure de son activité dans une gamme de températures comprises entre 25°C et 60°C. L'extrait enzymatique (4,5 mg.mL⁻¹, 0,2 U.mL⁻¹) est d'abord incubé à la température étudiée en présence de tous les réactifs du test hormis le D-R5P et l'ADH. Lorsque la température est atteinte, la réaction enzymatique est initiée par l'ajout d'une solution de D-R5P et d'ADH. Pour les températures supérieures à 50°C, un plus large excès de l'enzyme auxiliaire ADH (100 U.mL⁻¹) est ajouté pour pallier à son inactivation. L'activité du mutant est déterminée *via* la mesure des pentes obtenues pour chaque température testée au moyen du « test TK_{ADH} » décrit dans le paragraphe 2.2.1.1., en macrocuve et à 25°C. Les mesures sont réalisées en triplicata.

N.B. : La réalisation du « test TK_{ADH} » en présence du mutant L382D/D470S est effectuée en présence de 760 µL de tampon Gly-gly 0,1M pH 7,5.

2.3.3. Détermination des paramètres cinétiques apparents de la TK_{gst} et des TK_{gst} mutées les plus performantes

2.3.3.1. Généralités

Les paramètres cinétiques apparents K_M^{app} et V_{max}^{app} de la TK_{gst} et des TK_{gst} mutées vis-à-vis d'un substrat donné sont déterminés en faisant varier la concentration [S] de ce substrat et en mesurant la vitesse de réaction V correspondante, la concentration du second substrat étant fixée. La méthode de Hanes-Woolf est ensuite utilisée pour le calcul des paramètres cinétiques apparents. Elle consiste à tracer la courbe [S]/V en fonction de [S]. Si la cinétique est de type Michaelis-Menten, cette courbe est alors une droite d'équation de la forme $y = ax + b$.

Les paramètres cinétiques apparents sont alors calculés ainsi :

$$K_M^{app} = -b/a \quad \text{et} \quad V_{max}^{app} = 1/a$$

2.3.3.2. Paramètres cinétiques apparents de la TK_{gst} vis-à-vis des cofacteurs ThDP et Mg²⁺

Les paramètres cinétiques apparents de la TK_{gst} vis-à-vis de ses cofacteurs, le ThDP et le Mg²⁺, sont déterminés en présence du couple Li-HPA/glycolaldéhyde, dont les concentrations sont fixées à 50 mM et 20 mM respectivement et au moyen du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} » décrit dans le paragraphe 2.2.1.2., en microplaque 96-puits et à 25 °C. Les quantités de TK_{gst} sont ajustées (3,2 à 14,1 µg par puits) selon les concentrations en ThDP et Mg²⁺ testées, afin que les pentes mesurées se situent dans l'intervalle de quantification du test (0,009 à 0,046 UA.min⁻¹). Les K_M^{app} et V_{max}^{app} sont déterminés selon la méthode décrite dans le paragraphe 2.3.3.1. Les mesures sont réalisées en triplicata.

2.3.3.3. Paramètres cinétiques apparents de la TK_{gst} et des TK_{gst} mutées les plus performantes vis-à-vis d'un panel d'aldéhydes accepteurs

Les paramètres cinétiques apparents de la TK_{gst} et des TK_{gst} mutées les plus performantes vis-à-vis d'un panel d'aldéhydes accepteurs sont déterminés en présence du Li-HPA dont la concentration est fixée à 50 mM et au moyen du « test TK_{ROUGE DE PHENOL} », décrit dans le paragraphe 2.2.1.2. en microplaques 96-puits et à 25 °C. Les quantités d'enzymes sont

ajustées selon l'aldéhyde testé et sa concentration, de manière à ce que les pentes mesurées se situent dans l'intervalle de quantification du test (0,009 à 0,046 UA.min⁻¹). Les K_M^{app} et V_{max}^{app} sont déterminés selon la méthode décrite dans le paragraphe 2.3.3.1. Les mesures sont réalisées en triplicata.

2.3.3.4. Paramètres cinétiques apparents de la TK_{gst} vis-à-vis du Li-HPA

Les paramètres cinétiques apparents de la TK_{gst} vis-à-vis du Li-HPA sont déterminés à 25°C, en présence du glycolaldéhyde comme substrat accepteur (concentration fixée 50 mM) et par dosage enzymatique indirect du Li-HPA au cours du temps.

Dans un microtube de 1,5 mL, sont introduits :

Composants	Volume Introduit [μL]	Concentration finale
TK _{gst}	Variable	0,0125-0,25 U.mL ⁻¹
ThDP	100	2,4 mM
MgCl ₂	10	9 mM
Glycolaldéhyde	250	50 mM
Tampon Gly-gly 50 mM	Variable	50 mM
Li-HPA	Variable	0,5-25 mM
Volume total	1000	-

Le ThDP, le MgCl₂, le glycolaldéhyde et le Li-HPA sont mis en solution dans le tampon Gly-gly 50 mM, pH 7,5 et introduits dans le microtube. Puis différentes quantités de TK_{gst} purifiée sont introduites, ajustées en fonction de la concentration en Li-HPA testée, afin d'initier la réaction (0,37 à 37 μg.mL⁻¹). Le mélange est agité à 25 °C. Des prélèvements de 20 μL de milieu réactionnel sont effectués toutes les minutes durant 15 min, puis sont dilués dans l'eau glacée tel que la concentration en Li-HPA de la solution « fille » soit d'environ 5 mM. 20 μL de cette solution sont ensuite dosés selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.2.4.2. La diminution de la concentration en Li-HPA en fonction du temps conduit à des pentes qui sont déterminées pour chaque concentration en Li-HPA et rapportées à la quantité de TK_{gst} utilisée. Ces pentes sont reliées à l'activité (U) de la TK_{gst} par la loi de Beer-Lambert. Les K_M^{app} et V_{max}^{app} sont déterminés selon la méthode décrite dans le paragraphe 2.3.3.1.

2.4. Caractérisation de la TA_{tca}

Les activités des L- α -TAs et de la TA_{tca} sont déterminées *via* des prélèvements du milieu réactionnel effectués au cours du temps et dosés selon le « test TA_{WST-1} » décrit dans le paragraphe 2.2.2. Les mesures sont réalisées en triplicata.

2.4.1. Criblage de la banque des L- α -TAs issues de la biodiversité

5 μ L de lysat sont transférés dans une microplaque 96-puits recouverte d'un film et placée sur une table d'agitation thermorégulée, en présence de 5 mM d'un α -cétoacide (l'acide pyruvique, l'acide glyoxylique ou l' α -KG) et de 0,2 mM de PLP, dans le tampon HEPES 0,1 M, pH 7,5. Puis chaque réaction est initiée par l'ajout de la L-sérine (5 mM). La microplaque recouverte d'un film est agitée à 25°C durant 2 heures à 400 rpm.

2.4.2. Détermination de l'activité spécifique

L'extrait purifié de TA_{tca} (2,3 μ g par puits, 8 mU par puits) est incubé durant 5 minutes à 25°C dans le puits d'une microplaque 96-puits recouverte d'un film et placée sur une table d'agitation thermorégulée, en présence de 0,2 mM de PLP et 3 mM d' α -KG, dans le tampon HEPES 0,1 M, pH 7,5. Puis la réaction enzymatique est initiée par l'ajout de la L-sérine (250 mM). La microplaque recouverte d'un film est agitée à 25°C et à 400 rpm.

2.4.3. Détermination de la température optimale et du pH optimal

Le pH optimal de la TA_{tca} est déterminé par la mesure de son activité dans une gamme de pH comprise entre 5 et 9,2 dans différents tampons (0,1 M) : citrate (pH 5-6,5), phosphate, (pH 6,3-7,6), Tris-HCl (pH 7-8,5) et borate (pH 7,8-9,2), dans une cuve spectrophotométrique ($V_{\text{cuve}} = 1$ mL). L'extrait purifié de TA_{tca} (10 μ g.mL⁻¹, 35 mU.mL⁻¹) est tout d'abord incubé au pH souhaité dans le tampon adapté durant 20 minutes à 25°C en présence de 0,2 mM de PLP et 3 mM d' α -KG. Puis la réaction enzymatique est initiée par ajout de la L-sérine (100 mM).

La température optimale de la TA_{tca} est déterminée par la mesure de son activité dans une gamme de températures comprises entre 20°C et 80°C, dans une cuve spectrophotométrique ($V_{\text{cuve}} = 1$ mL). L'extrait purifié de TA_{tca} (10 μ g.mL⁻¹, 35 mU.mL⁻¹) est

tout d'abord incubé à la température étudiée en présence de 0,2 mM de PLP et 3 mM d' α -KG dans le tampon HEPES 0,1 M, pH 7,5. Lorsque la température souhaitée est atteinte, la réaction enzymatique est initiée par l'ajout de la L-sérine (100 mM).

2.4.4. Etude de la thermostabilité

La thermostabilité de la TA_{tca} est étudiée à 60°C. L'extrait purifié de TA_{tca} (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 35 $\text{mU}\cdot\text{mL}^{-1}$) en solution dans le tampon HEPES 0,1 M, pH 7,5 est incubé dans un microtube de 1,5 mL placé sur une table d'agitation thermorégulée en présence de 0,2 mM de PLP. Le microtube est agité à 60°C et à 400 rpm durant 10 jours. Des prélèvements du milieu réactionnel sont effectués au cours du temps et mis en présence de 3 mM d' α -KG dans le tampon HEPES 0,1 M pH 7,5, dans le puits d'une microplaque 96-puits. Puis la réaction est initiée par l'ajout de 170 mM de L-sérine. La microplaque recouverte d'un film est agitée à 25°C et 400 rpm.

2.4.5. Détermination des paramètres cinétiques apparents vis-à-vis de la L-sérine et de l'acide pyruvique

Les paramètres cinétiques apparents de la TA_{tca} (4,6 μg par puits, 16 mU par puits) vis-à-vis de l'acide pyruvique sont déterminés en faisant varier sa concentration de 0,25 à 50 mM et en présence 250 mM de L-sérine. Les paramètres cinétiques apparents de la TA_{tca} (6,9 μg par puits, 24 mU par puits) vis-à-vis de la L-sérine sont déterminés en faisant varier sa concentration de 1 à 250 mM et en présence de l'acide pyruvique (50 mM). Les réactions enzymatiques sont réalisées en microplaques 96-puits. Après incubation de l'extrait purifié de TA_{tca} en présence de 0,2 mM de PLP et de l'acide pyruvique dans le tampon HEPES, 0,1 M, pH 7,5, dans le puits d'une microplaque 96-puits recouverte d'un film et placée sur une table d'agitation thermorégulée, durant 30 minutes et à 25°C, la réaction est initiée par l'ajout de la L-sérine. La microplaque recouverte d'un film est agitée à 25°C et à 400 rpm durant 20 minutes. Les K_M^{app} et $V_{\text{max}}^{\text{app}}$ sont déterminés selon la méthode décrite dans le paragraphe 2.3.3.1.

2.5. Caractérisation de la D-AAO_{rgf}

2.5.1. Détermination de la température optimale

La température optimale de la D-AAO_{rgf} est déterminée par la mesure de son activité dans une gamme de températures comprises entre 20°C et 50°C, au moyen du « test D-AAO_{rgf}-L-LDH » décrit dans le paragraphe 2.2.3. L'extrait enzymatique (4 µg.mL⁻¹, 150 mU.mL⁻¹) est d'abord incubé à la température étudiée en présence de tous les réactifs hormis la D-sérine. Lorsque la température souhaitée est atteinte, la réaction enzymatique est initiée par l'ajout de la D-sérine (50 mM). Pour les températures supérieures à 40°C, un plus large excès de l'enzyme auxiliaire L-LDH (500 U.mL⁻¹) est utilisé pour pallier à son inactivation. Les mesures sont réalisées en triplicata.

N.B. : Dans le cas de l'étude de la stabilité de la D-AAO_{rgf} selon la température, l'extrait enzymatique est d'abord incubé à la température étudiée en présence de tous les réactifs hormis la D-sérine durant 1 heure puis la réaction enzymatique est initiée par l'ajout de la D-sérine (50 mM).

2.5.2. Etude de la thermostabilité

La thermostabilité de la D-AAO_{rgf} est étudiée à 25°C, 30°C, 40°C et 60°C. L'extrait purifié de D-AAO_{rgf} (4 µg.mL⁻¹, 150 mU.mL⁻¹), en solution dans le tampon Tris 50 mM, pH 7,5, préalablement saturé en O₂, est incubé dans un microtube de 1,5 mL placé sur une table d'agitation thermorégulée à la température étudiée et agité à 400 rpm durant 3 jours. Des prélèvements de 50 µL sont effectués au cours du temps et dosés selon le « test D-AAO_{rgf}-L-LDH » décrit dans le paragraphe 2.2.3., à 25°C. Les mesures sont réalisées en triplicata.

2.5.3. Détermination des paramètres cinétiques apparents vis-à-vis de la D-sérine

Les paramètres cinétiques apparents de la D-AAO_{rgf} (0,9 µg.mL⁻¹, 36,5 mU.mL⁻¹) sont déterminés vis-à-vis de la D-sérine, dont la concentration finale varie de 2 à 50 mM. L'activité de la D-AAO_{rgf} est déterminée *via* la mesure des pentes obtenues pour chaque concentration en D-sérine testée, au moyen du « test D-AAO_{rgf}-L-LDH » décrit dans le paragraphe 2.2.3. Les K_M^{app} et V_{max}^{app} sont déterminés selon la méthode décrite dans le paragraphe 2.3.3.1. Les mesures sont réalisées en triplicata.

2.6. Synthèses chimiques, enzymatiques et cascades bi- et multi-enzymatiques

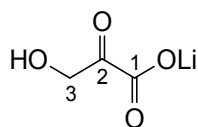
2.6.1. Généralités

Pour les spectres de RMN, les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au solvant deutéré dans lequel le spectre a été réalisé. Les abréviations utilisées pour décrire les signaux sont les suivantes :

- s : singulet
- d : doublet
- dd : doublet dédoublé
- t : triplet
- q : quadruplet
- m : multiplet

2.6.2. Synthèses chimiques

2.6.2.1. Synthèse de l'hydroxypyruvate de lithium (Li-HPA)



Hydroxypyruvate de lithium

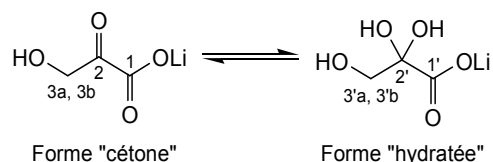
3-hydroxy-2-oxo-propanoate de lithium

Formule brute : $C_3H_3O_4Li$

Masse moléculaire : $110,02 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

La synthèse du Li-HPA est réalisée selon un protocole adapté de la littérature [101]. L'acide bromopyruvique (0,06 mol, 10 g) est dissous dans 100 mL d'eau distillée et le pH de la solution est maintenu à 9 par l'ajout d'une solution d'hydroxyde de lithium (ou lithine) LiOH 1 M, au moyen d'un pH-stat. Lorsque la réaction est terminée (plus d'ajout de LiOH), le pH de la solution est ajusté à 5 par l'ajout d'acide acétique glacial pur. Le mélange est ensuite concentré sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'un volume d'environ 20 mL, puis stocké à 4°C, durant une nuit. Le solide résiduel formé est filtré sur verre fritté avec un

minimum d'eau distillée glacée. Après 3 heures dans un dessiccateur sous vide poussé, le Li-HPA (3 g - 3,5 g environ) est obtenu sous la forme d'une poudre blanche, avec un rendement moyen de 50 %. La pureté du Li-HPA, déterminée par le dosage enzymatique décrit dans le paragraphe 2.2.4.1. est comprise entre 50 % et 80 %.

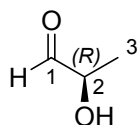


CCM : R_f (dichlorométhane/méthanol : 8/2) = 0,25 (Révélateur : Vanilline)

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ (ppm) : Forme « cétone » : 4,67 (s, 2H, H_{3a} et H_{3b}) - Forme « hydratée » : 3,63 (s, 2H, $\text{H}_{3'a}$ et $\text{H}_{3'b}$)

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) δ (ppm) : Forme « cétone » : 202,5 (C-2), 167,4 (C-1), 66,1 (C-3) - Forme « hydratée » : 176,6 (C-1'), 94,3 (C-2'), 65,3 (C-3')

2.6.2.2. Synthèse du D-lactaldéhyde



D-lactaldéhyde

(2R)-hydroxy-propionaldéhyde

Formule brute : $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$

Masse moléculaire : $74,04 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

La synthèse du D-lactaldéhyde est réalisée selon le protocole décrit dans la littérature [244], en présence de la L-thréonine (0,96 g, 8 mmol) et de la ninhydrine (2,84 g, 16 mmol), dissoutes dans 150 mL de tampon citrate 50 mM, pH 5,4, préparé selon le protocole décrit dans la littérature [317]. Le D-lactaldéhyde est obtenu en solution dans l'eau (1,5 mmol, 153 mM, 10 mL) avec un rendement de 19%. La concentration molaire en D-lactaldéhyde est déterminée selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.2.6.

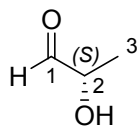
CCM : R_f (dichlorométhane/méthanol : 9/1) = 0,57 (Révélateur : Vanilline)

$[\alpha]_D^{20} = -13,44$ (c 0,9, H_2O)

RMN ^1H (400 MHz, $\text{H}_2\text{O}+\text{CD}_3\text{OD}$) : $\delta = 3,62\text{-}3,71$ (m, 1H, H_2) ; 1,16 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H, H_3)

RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{H}_2\text{O}+\text{CD}_3\text{OD}$) : $\delta = 93,6$ (C-1), 70,8 (C-2), 17,4 (C-3)

2.6.2.3. Synthèse du L-lactaldéhyde



L-lactaldéhyde

(2S)-hydroxy-propionaldéhyde

Formule brute : C₃H₆O₂

Masse moléculaire : 74,04 g.mol⁻¹

La synthèse du L-lactaldéhyde est réalisée selon le protocole décrit dans la littérature [244], en présence de la D-thréonine (0.96 g, 8 mmol) et de la ninhydrine (2.84 g, 16 mmol), dissoutes dans 150 mL de tampon citrate 50 mM, pH 5,4, préparé selon le protocole décrit dans la littérature [317]. Le L-lactaldéhyde est obtenu en solution dans l'eau (2,1 mmol, 214 mM, 10 mL) avec un rendement de 26%. La concentration molaire en L-lactaldéhyde est déterminée selon le dosage enzymatique décrit dans le paragraphe 2.2.6.

CCM : R_f (dichlorométhane/méthanol : 9/1) = 0,57 (Révélateur : Vanilline)

[α]_D²⁰ = + 10,04 (c 1, H₂O)

RMN ¹H (400 MHz, H₂O+CD₃OD) : δ = 3,62-3,71 (m, 1H, H₂) ; 1,16 (d, J = 6,5 Hz, 3H, H₃)

RMN ¹³C (101 MHz, H₂O+CD₃OD) : δ = 93,6 (C-1), 70,8 (C-2), 17,4 (C-3)

2.6.3. Synthèses enzymatiques catalysées par la TK_{gst}

Protocole 1

Le ThDP (0,9 mg, 2 μmol, 0,1 mM) et le MgCl₂ (4 mg, 20 μmol, 1 mM) sont dissous dans l'eau (15 mL) et le pH est ajusté à 7 avec une solution de NaOH (0,1 M). A cette solution, la TK_{gst} (1 mL, 6 mg) est ajoutée et le mélange est agité durant 20 minutes à 60°C (Solution A). Dans un autre récipient (pilulier), le Li-HPA (110 mg, 1 mmol, 50 mM) et l'aldéhyde accepteur (50 mM) sont dissous dans l'eau (4 mL) et le pH est ajusté à 7 avec une solution de NaOH (0,1 M) (Solution B). Après 20 minutes de préincubation de l'enzyme en présence de ses cofacteurs, la solution B est ajoutée à la solution A et le mélange est agité à 60°C. Le pH est maintenu à 7 par ajout d'une solution d'HCl (0,1 M) *via* l'utilisation d'un pH-stat. L'avancement de la réaction est suivi par CCM, par le dosage du Li-HPA selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.2.4.1. et par RMN ¹H *in situ*, réalisée en présence d'un étalon-

interne (TSP-d₄). 450 µL de milieu réactionnel sont prélevés au cours du temps et mélangés à 50 µL d'une solution de TSP-d₄ (50 mM) réalisée dans D₂O.

Après la conversion totale du Li-HPA, la réaction est stoppée. De la silice est ajoutée au mélange et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu solide est purifié par chromatographie sur colonne de gel silice en utilisant l'éluant acétate d'éthyle/méthanol : 9/1 pour le L-érythrose **1** ; acétate d'éthyle pur puis acétate d'éthyle/méthanol : 9/1 pour le D-tagatose **5** et le L-psicose **6** et dichlorométhane/méthanol : 9/1 pour le D-xylulose **2**, le L-ribulose **3**, le 5-désoxy-L-ribulose **4**, le D-fructose **7**, le L-sorbose **8**, le D-sédoheptulose **9** et le D-*ido*-heptulose **10**. Ces produits purifiés sont ensuite caractérisés par CCM, RMN ¹H et/ou ¹³C, polarimétrie et spectrométrie de masse.

2.6.4. Cascades bi-enzymatiques

2.6.4.1. Cascades bi-enzymatiques TA_{tca}/TK_{gst}

Protocole 2

Le ThDP (0,9 mg, 2 µmol, 0,1 mM), le MgCl₂ (4 mg, 20 µmol, 1 mM), le PLP (1,1 mg, 4 µmol, 0,2 mM) et l'acide pyruvique (110 mg, 1 mmol, 50 mM) sont dissous dans l'eau (15 mL) et le pH est ajusté à 7 avec une solution de NaOH (0,1 M). A cette solution, 1 mL de TK_{gst} (6 mg pour la synthèse du L-érythrose **1**, du L-ribulose **3** et du 5-désoxy-L-ribulose **4** et 10 mg pour la synthèse du D-tagatose **5** et du L-psicose **6**) et 1 mL de TA_{tca} (4,8 mg) sont ajoutés et le mélange est agité durant 20 minutes à 60°C (Solution A). Dans un autre récipient (pilulier), la L-sérine (315 mg, 3 mmol, 150 mM) et le glycolaldéhyde ou l'aldéhyde α-hydroxylé (2S), le L-glycéraldéhyde, le L-lactaldéhyde, le D-thréose ou le L-érythrose (1 mmol, 50 mM) sont dissous dans l'eau (3 mL) et le pH est ajusté à 7 avec une solution de NaOH (0,1 M) (Solution B). Après 20 minutes de préincubation des enzymes en présence de leur(s) cofacteur(s) et de l'acide pyruvique, la solution B est ajoutée à la solution A et le mélange est agité à 60°C. Le pH est maintenu à 7 par ajout d'une solution d'HCl (0,1 M) via l'utilisation d'un pH-stat. Dans le cas de la synthèse du D-tagatose **5** et du L-psicose **6**, un second équivalent d'acide pyruvique (110 mg, 1 mmol, 50 mM) est ajouté après 48 heures. L'avancement de la réaction est suivi par CCM et par RMN ¹H *in situ*, réalisée en présence d'un étalon-interne (TSP-d₄).

Après la conversion quasi-totale de l'acide pyruvique (90-95%) et du glycolaldéhyde ou de l'aldéhyde α -hydroxylé (2S) (95-100%), la réaction est stoppée (24-96 heures). De la silice est ajoutée au mélange et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu solide est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant l'éluant dichlorométhane/méthanol : 9/1 pour la purification du L-ribulose **3** et du 5-désoxy-L-ribulose **4** et l'éluant acétate d'éthyle pur puis acétate d'éthyle/méthanol : 9/1 pour la purification du D-tagatose **5** et du L-psicose **6**. Ces produits purifiés sont ensuite caractérisés par CCM, RMN ^1H et/ou ^{13}C , polarimétrie et spectrométrie de masse.

2.6.4.2. Cascades bi-enzymatiques D-AAO_{rgr}/TK_{gst}

Protocole 3

Le ThDP (0,9 mg, 2 μmol , 0,1 mM), le MgCl_2 (4 mg, 20 μmol , 1 mM) et l'aldéhyde, le glycolaldéhyde, le D-glycéraldéhyde ou le L-thréose (1 mmol, 50 mM), sont dissous dans l'eau préalablement saturée en O_2 (13 mL) et le pH est ajusté à 7,5 avec une solution de NaOH (0,1 M). A cette solution, sont ajoutées la TK_{gst} (1 mL, 6 mg), la D-AAO_{rgr} (333 μL , 333 μg , 12,4 U) et la catalase (333 μL , 333 μg , 666-1665 U) et le mélange est agité durant 20 minutes à 25 °C (Solution A). Dans un autre récipient (pilulier), la D-sérine (105 mg, 1 mmol, 50 mM) est dissoute dans l'eau préalablement saturée en O_2 (4 mL) et le pH est ajusté à 7,5 avec une solution de NaOH (0,1 M) (Solution B). Après 20 minutes de préincubation des enzymes en présence des cofacteurs de la TK_{gst} et de l'aldéhyde, la solution B est ajoutée à la solution A et le mélange est agité à 25 °C, avec un apport constant en O_2 d'un débit de 4 mL.min⁻¹. Le pH est maintenu à 7,5 par ajout d'une solution d'HCl (0,1 M) *via* l'utilisation d'un pH-stat. Après 2 heures de réaction, la D-AAO_{rgr} (333 μL , 333 μg , 12,4 U) et la catalase (333 μL , 333 μg , 666-1665 U) sont ajoutées au mélange. Les mêmes quantités d'enzymes sont à nouveau ajoutées après 4h de réaction. L'avancement de la réaction est suivi par CCM et par RMN ^1H *in situ*, réalisée en présence d'un étalon-interne (TSP-d₄).

Après la conversion totale de la D-sérine et de l'aldéhyde, la réaction est arrêtée (24 heures). De la silice est ajoutée au mélange et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu solide est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant l'éluant acétate d'éthyle/méthanol : 9/1 pour la purification du L-érythrose **1** et l'éluant dichlorométhane/méthanol : 9/1 pour la purification du D-xylulose **2** et du L-sorbose **8**. Ces

produits purifiés sont ensuite caractérisés par CCM, RMN ^1H et/ou ^{13}C , polarimétrie et spectrométrie de masse.

2.6.4.3. Cascades bi-enzymatiques FSA_{eco} (sauvage ou mutée)/TK_{gst}

*Protocole 4.1 : Synthèses du L-glycéraldéhyde **13** et du L-ribulose **3** catalysées par la FSA_{eco} et la TK_{gst}*

Le glycolaldéhyde (60 mg, 1 mmol, 50 mM) et le formaldéhyde (60 mg, 2 mmol, 100 mM) sont dissous dans 20 mL d'eau pure et le pH de la solution est ajusté à pH 8, à l'aide d'une solution de NaOH 0,1 M. Puis 8 mg de FSA_{eco} sont ajoutés pour initier la réaction et le mélange est agité à 50°C à 900 rpm. L'avancement de la réaction est suivi par HPLC et par RMN ^1H *in situ*, réalisée en présence d'un étalon-interne (TSP-d₄). Après la conversion totale du glycolaldéhyde (19 heures), la pureté du L-glycéraldéhyde **13** obtenu (1 mmol) est confirmée par HPLC et RMN. Le L-glycéraldéhyde **13**, en solution dans l'eau (50 mM, 0,5 mmol, 10 mL), est immédiatement mis en présence du ThDP (0,5 mg, 0,001 mmol, 0,1 mM), du MgCl₂ (2 mg, 0,01 mmol, 1 mM), de la TK_{gst} (3 mg) et du Li-HPA (110 mg, 1 mmol, 100 mM) et le L-ribulose **3** est synthétisé selon le *protocole 1*. Le L-ribulose **3** est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant l'éluant dichlorométhane/méthanol : 9/1, puis caractérisé par CCM, RMN ^{13}C et polarimétrie.

*Protocole 4.2 : Synthèses du D-thréose **14** et du D-tagatose **5** catalysées par le mutant A129G de la FSA_{eco} et la TK_{gst}*

Le glycolaldéhyde (120 mg, 2 mmol, 200 mM) est dissous dans 10 mL d'eau et le pH de la solution est ajusté à pH 8, à l'aide d'une solution de NaOH 0,1 M. Puis 4 mg du mutant A129G de la FSA_{eco} sont ajoutés pour initier la réaction et le mélange est agité à 25°C à 900 rpm. L'avancement de la réaction est suivi par HPLC et par RMN ^1H *in situ*, réalisée en présence d'un étalon-interne (TSP-d₄). Après la conversion quasi-totale (98%) du glycolaldéhyde (24 heures), la pureté du D-thréose **14** obtenu (0,98 mmol) est confirmée par HPLC et RMN. Le D-thréose **14**, en solution dans l'eau (98 mM, 0,49 mmol, 5 mL), est immédiatement mis en présence du ThDP (0,5 mg, 0,001 mmol, 0,1 mM), du MgCl₂ (2 mg, 0,01 mmol, 1 mM), de la TK_{gst} (5 mg) et du Li-HPA (220 mg, 2 mmol, 200 mM), dissous dans 5 mL d'eau et le D-tagatose **5** est synthétisé selon le *protocole 1*. Le D-tagatose **5** est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant l'acétate d'éthyle pur

puis un mélange acétate d'éthyle/méthanol : 9/1 comme éluant, puis est caractérisé par CCM, RMN ^{13}C et polarimétrie.

*Protocole 4.3 : Synthèse du L-érythrose **15** et du L-psicose **6** catalysées par le mutant A165G/S166P de la FSA_{eco} et la TK_{gst}*

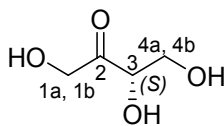
Le glycolaldéhyde (120 mg, 2 mmol, 200 mM) est dissous dans 10 mL d'eau et le pH de la solution est ajusté à pH 8, à l'aide d'une solution de NaOH 0,1 M. Puis 10 mg du mutant A165G/S166P de la FSA_{eco} sont ajoutés pour initier la réaction et le mélange est agité à 25°C à 900 rpm. Après 2, 4, 6 et 8 jours, 10 mg du mutant A165G/S166P sont à nouveau ajoutés. L'avancement de la réaction est suivi par HPLC et par RMN ^1H *in situ*, réalisée en présence d'un étalon-interne (TSP-d₄). Après la conversion quasi-totale (96%) du glycolaldéhyde (10 jours), la pureté du L-érythrose **15** obtenu (0,96 mmol) est confirmée par HPLC et RMN. Le L-érythrose **15**, en solution dans l'eau (96 mM, 0,48 mmol, 5 mL), est immédiatement mis en présence du ThDP (0,5 mg, 0,001 mmol, 0,1 mM), du MgCl₂ (2 mg, 0,01 mmol, 1 mM), de la TK_{gst} (5 mg) et du Li-HPA (220 mg, 2 mmol, 200 mM), dissous dans 5 mL d'eau et le L-psicose **6** est synthétisé selon le *protocole 1*. Le L-psicose **6** est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant l'acétate d'éthyle pur puis un mélange acétate d'éthyle/méthanol : 9/1 comme éluant, puis est caractérisé par CCM, RMN ^{13}C et polarimétrie.

2.6.4.4. Cascade multi-enzymatique FSA_{eco} mutée A129G/TA_{tca}/TK_{gst}

Protocole 5

Le D-thréose **14** est synthétisé selon le *protocole 4.2*. En solution dans l'eau (98 mM, 5 mL), il est immédiatement mis en présence du ThDP (0,1 mM), du MgCl₂ (1 mM), du PLP (0,2 mM), de la TK_{gst} (6 mg), de la TA_{tca} (4,8 mg), de la L-sérine (150 mM) et de l'acide pyruvique (100 mM), dissous dans 5 mL d'eau et le D-tagatose **5** est synthétisé selon le *protocole 1*. Le D-tagatose **5** est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant l'éluant acétate d'éthyle pur puis acétate d'éthyle/méthanol : 9/1 et caractérisé par CCM, RMN ^1H et ^{13}C et polarimétrie.

2.6.5. Caractérisation des produits



L-érythrulose 1
(3S)-1,3,4-trihydroxy-butan-2-one

Formule brute : C₄H₈O₄

Masse moléculaire : 120,04 g.mol⁻¹

Le L-érythrulose 1 est obtenu sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 44 % (52 mg, 0,43 mmol) selon le *protocole 1*, avec un rendement de 44 % (53 mg, 0,43 mmol) selon un protocole adapté du *protocole 2* (75 mM de L-sérine, 2,4 mg de TA_{tca}) et avec un rendement de 44 % (53 mg, 0,44 mmol) selon le *protocole 3*.

CCM : R_f (acétate d'éthyle/méthanol : 9/1) = 0,37 (Révélateur : *p*-anisaldéhyde)

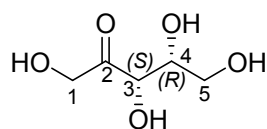
[α]_D²⁰ = + 6,3 (c 2 H₂O) ; littérature: [α]_D²⁵ = + 6,3 (c 1,1, H₂O) [318], [α]_D²⁵ = + 6,7 (c 1,48, H₂O) [139]

Les spectres de RMN ¹H et ¹³C montrent un produit majoritaire correspondant au spectre du L-érythrulose 1, décrit dans la littérature [318].

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ = 4,59 (d, *J* = 19,4 Hz, 1H, H_{1a}), 4,52 (d, *J* = 19,4 Hz, 1H, H_{1b}), 4,44 (t, *J* = 4,1 Hz, 1H, H₃), 3,87 (dd, *J* = 11,4, 3,5 Hz, 1H, H_{4a}), 3,84 (dd, *J* = 11,4, 3,0 Hz, 1H, H_{4b})

RMN ¹³C (101 MHz, D₂O) δ = 212,3 (C-2), 75,8 (C-3), 65,8 (C-1), 62,8 (C-4)

HRMS-ESI : m/z : [M - H]⁻ théorique : 119,0423 ; mesurée : 119,0336

**D-xylulose 2**

(3*S*, 4*R*)-1,3,4,5-tétrahydroxy-pentan-2-one
D-*thréo*-pent-2-ulose

Formule brute : C₅H₁₀O₅

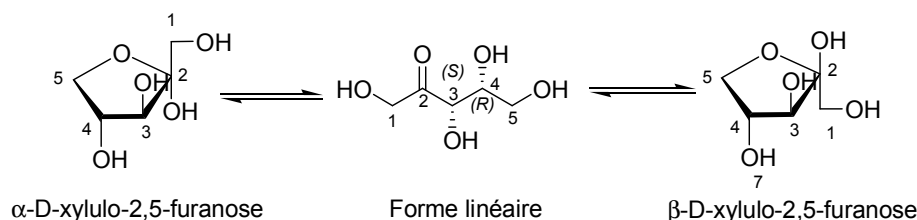
Masse moléculaire : 150,05 g.mol⁻¹

Le D-xylulose **2** est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 87 % (130 mg, 0,87 mmol) selon le *protocole 1* et avec un rendement de 65% (98 mg, 0,65 mmol) selon le *protocole 3*.

CCM : R_f (dichlorométhane/méthanol : 8/2) = 0,43 (Révélateur : *p*-anisaldéhyde)

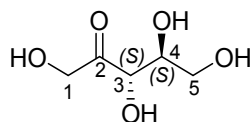
[α]_D²⁰ = + 31,3 (c 0,72, H₂O); littérature ; littérature: **[α]_D²⁶** = - 30,0 (c 2,4, H₂O) [319]

Le spectre de RMN ¹³C montre un produit majoritaire correspondant au spectre du D-xylulose **2** décrit dans la littérature [320]. La forme β-D-xylulo-2,5-furanose est prépondérante devant la forme linéaire et la forme α-D-xylulo-2,5-furanose dans un ratio : β-D-xylulo-2,5-furanose/forme linéaire/α-D-xylulo-2,5-furanose: 62/20/18, conforme à la littérature : 62/20/18 [321].



RMN ¹³C (101 MHz, D₂O) : δ = (Forme linéaire) : 214,4 (C-2), 76,8 (C-3), 73,4 (C-4), 67,5 (C-1), 63,4 (C-5) ; δ = (α-D-xylulo-2,5-furanose) : 107,2 (C-2), 82,0 (C-3), 77,3 (C-4), 73,4 (C-5), 63,9 (C-1) ; δ = (β-D-xylulo-2,5-furanose) : 104,4 (C-2), 77,7 (C-3), 76,4 (C-4), 71,3 (C-5), 64,5 (C-1)

HRMS-ESI : m/z : [M + Cl]⁻ théorique : 185,0217 ; mesurée : 185,0214

**L-ribulose 3**

(3S, 4S)-1,3,4,5-tétrahydroxy-pentan-2-one

L-érythro-pent-2-ulose

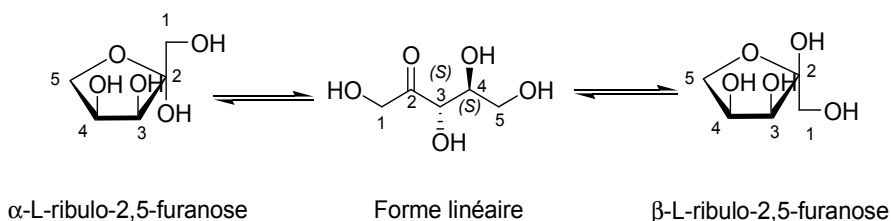
Formule brute : C₅H₁₀O₅Masse moléculaire : 150,05 g.mol⁻¹

Le L-ribulose **3** est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec des rendements de 56 % (84 mg, 0,56 mmol) et 68% (102 mg, 0,68 mmol) selon le *protocole 1*, en présence de 6 mg de TK_{gst} et du mutant L191I, respectivement, avec des rendements de 11% (16 mg, 0,10 mmol) et 55% (82 mg, 0,55 mmol), en présence de 5 mg de TK_{gst} ou du mutant L382D/D470S, respectivement, selon un protocole adapté du *protocole 1* (en présence de 60 mM de Li-HPA, 50 mM de L-glycéraldéhyde, 2,4 mM de ThDP et 9 mM de MgCl₂, à pH 7,5 et à 50°C), avec un rendement de 56% (84 mg, 0,56 mmol) selon le *protocole 2* et avec un rendement de 55% (41 mg, 0,27 mmol) selon le *protocole 4.1*.

CCM : R_f (dichlorométhane/méthanol : 8/2) = 0,43 (Révélateur : *p*-anisaldéhyde)

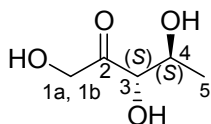
[α]_D²⁰ = +15,8 (c 0,1, H₂O) ; littérature : [α]_D²⁰ = + 16 (H₂O) [322]

Le spectre de RMN ¹³C montre un produit majoritaire correspondant au spectre du L-ribulose **3** décrit dans la littérature [320]. La forme α-L-ribulo-2,5-furanose est prépondérante devant la forme β-L-ribulo-2,5-furanose et la forme linéaire dans un ratio α-L-ribulo-2,5-furanose/β-L-ribulo-2,5-furanose/Forme linéaire: 63/23/14, conforme à la littérature: 63/20/17 [321].



RMN ¹³C (101 MHz, D₂O) : δ = (Forme linéaire) : 213,9 (C-2), 76,8 (C-3), 74,0 (C-4), 67,9 (C-1), 62,7 (C-5) ; δ = (α-L-ribulo-2,5-furanose) : 104,0 (C-2), 72,9 (C-5), 71,9 (C-3), 71,6 (C-1), 64,2 (C-4) ; δ = (β-L-ribulo-2,5-furanose) : 107,1 (C-2), 77,2 (C-3), 72,2 (C-5), 72,0 (C-4), 63,9 (C-1)

HRMS-ESI : m/z : [M + Cl]⁻ théorique : 185,0217 ; mesurée : 185,0212



5-désoxy-L-ribulose 4
(3S, 4S)-1,3,4-trihydroxy-pentan-2-one

Formule brute : C₅H₁₀O₄

Masse moléculaire : 134,06 g.mol⁻¹

Le 5-désoxy-L-ribulose 4 est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 97% (130 mg, 0,97 mmol) selon le *protocole 1*, avec des rendements de 33% (22 mg, 0,16 mmol) et 63% (42 mg, 0,31 mmol), en présence de 5 mg de TK_{gst} ou du mutant L382D/D470S, respectivement, selon un protocole adapté du *protocole 1* (en présence de 60 mM de Li-HPA, 50 mM de L-lactaldéhyde, 2,4 mM de ThDP, 9 mM de MgCl₂, à pH 7,5 et à 50°C, dans un volume réactionnel de 10 mL) et avec un rendement de 98% (131 mg, 0,90 mmol), selon le *protocole 2*.

CCM : R_f (dichlorométhane/méthanol : 9/1) = 0,27 (Révélateur : *p*-anisaldéhyde)

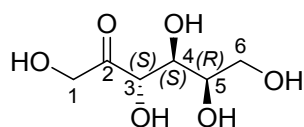
[α]_D²⁰ = - 25,6 (c 0,25, CH₃OH)

Les spectres de RMN ¹H et ¹³C montrent un produit majoritaire correspondant au spectre du 5-désoxy-L-ribulose 4, présent exclusivement sous forme linéaire.

RMN ¹H : (400 MHz, CD₃OD) δ = 4,55 (d, J = 19,4 Hz, 1H, H_{1b}), 4,44 (d, J = 19,4 Hz, 1H, H_{1a}), 4,08 (d, J = 5,1 Hz, 1H, H₄), 3,92-3,99 (m, 1H, H₃), 1,19 (d, J = 6,4 Hz, 3H, H₅)

RMN ¹³C : (101 MHz, CD₃OD) δ = 213,1 (C-2), 80,3 (C-3), 70,0 (C-4), 68,0 (C-1), 18,6 (C-5)

HRMS-ESI : m/z : [M + HCO₂]⁻ théorique : 179,0556 ; mesurée : 179,0553



D-tagatose 5
 (3*S*, 4*S*, 5*R*)-1,3,4,5,6-pentahydroxy-hexan-2-one
 D-lyxo-hex-2-ulose

Formule brute : C₆H₁₂O₆

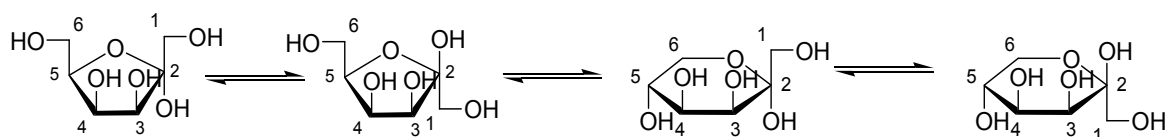
Masse moléculaire : 180,06 g.mol⁻¹

Le D-tagatose **5** est obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 13% (23 mg, 0,13 mmol), selon le *protocole 1*, avec un rendement de 62% (111 mg, 0,6 mmol) en présence de 6 mg du mutant L382F/F435Y, selon un protocole adapté du *protocole 1* (en présence de 100 mM de Li-HPA), avec un rendement de 52% (93 mg, 0,52 mmol), selon le *protocole 2*, avec un rendement de 54% (32 mg, 0,18 mmol), selon le *protocole 4.2*. et avec un rendement de 50 % (90 mg, 0,5 mmol), selon le *protocole 5*.

CCM : R_f (dichlorométhane/méthanol : 8/2) = 0,31 (Révélateur : *p*-anisaldéhyde)

[α]_D²⁰ = - 2,9 (c 2, H₂O) ; littérature: [α]_D = - 2,9 (c 0,9, CH₃OH) [323]

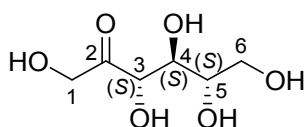
Le spectre de RMN ¹³C montre un produit majoritaire correspondant au spectre du D-tagatose **5** décrit dans la littérature [324]. La forme α-D-tagato-2,6-pyranose est prépondérante devant les formes β-D-tagato-2,6-pyranose, β-D-tagato-2,5-furanose et α-D-tagato-2,5-furanose dans un ratio : α-D-tagato-2,6-pyranose/β-D-tagato-2,6-pyranose/β-D-tagato-2,5-furanose/α-D-tagato-2,5-furanose : 72/22/4/2, conforme à la littérature : 79/14/5/2 [325].



α-D-tagato-2,5-furanose β-D-tagato-2,5-furanose α-D-tagato-2,6-pyranose β-D-tagato-2,6-pyranose

RMN ¹³C (101 MHz, D₂O) δ = (α-D-tagato-2,6-pyranose) : 99,0 (C-2), 71,8 (C-4), 70,6 (C-3), 67,2 (C-5), 64,7 (C-1), 63,1 (C-6) ; δ = (β-D-tagato-2,6-pyranose) : 99,1 (C-2), 70,6 (C-4), 70,1 (C-5), 64,5 (C-3), 64,3 (C-1); 60,9 (C-6) ; δ = (α-D-tagato-2,5-furanose) : 105,8 (C-2), 80,0 (C-5), 77,5 (C-3), 71,9 (C 4), 63,2 (C-1), 62,6 (C-6) ; δ = (β-D-tagato-2,5-furanose) : 103,4 (C-2), 80,9 (C-5), 71,8 (C-4), 71,5 (C3), 63,4 (C-1), 61,8 (C-6)

HRMS-ESI : m/z : [M + Cl]⁻ théorique : 215,0322 ; mesurée : 215,0319



L-psicose 6
(3*S*, 4*S*, 5*S*)-1,3,4,5,6-pentahydroxy-hexan-2-one
L-ribo-hex-2-ulose

Formule brute : C₆H₁₂O₆

Masse moléculaire : 180,06 g.mol⁻¹

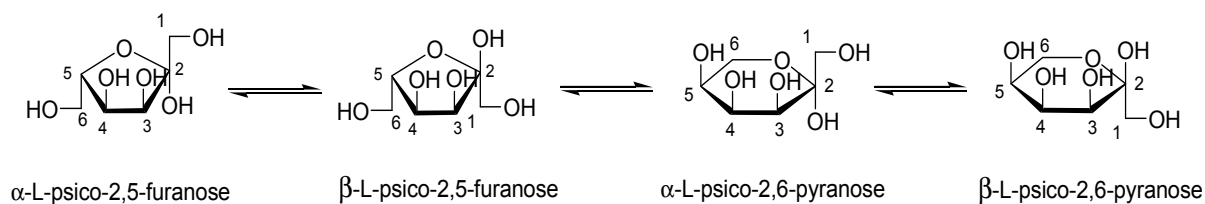
Le L-psicose 6 est obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 10% (18 mg, 0,10 mmol), selon le *protocole 1*, avec un rendement de 51% (92 mg, 0,51 mmol), selon le *protocole 2* et avec un rendement de 55% (32 mg, 0,18 mmol), selon le *protocole 4.3*.

CCM : R_f (dichlorométhane/méthanol : 8/2) = 0,31 (Révélateur : *p*-anisaldéhyde)

[α]_D²⁰ = - 2,3 (c 0,1 H₂O) ; littérature : [α]_D²⁰ = - 2,4 [326]

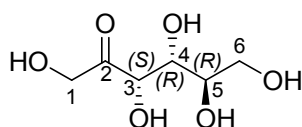
Données pour le D-psicose : [α]_D²⁰ = + 3,02 (c = 1,16, H₂O) [327]

Le spectre de RMN ¹³C montre un produit majoritaire correspondant au spectre du L-psicose 6, identique au spectre du D-psicose décrit dans la littérature [324]. La forme α-L-psico-2,5-furanose est prépondérante devant les formes β-L-psico-2,6-pyranose, α-L-psico-2,6-pyranose et β-L-psico-2,5-furanose dans un ratio : α-L-psico-2,5-furanose/β-L-psico-2,6-pyranose/α-L-psico-2,6-pyranose/β-L-psico-2,5-furanose: 38/25/24/13 conforme à la littérature: 39/24/22/15 [325].



RMN ¹³C : (101 MHz, D₂O) δ = (α-L-psico-2,6-pyranose) : 98,6 (C-2), 72,6 (C-4), 66,8 (C-5), 66,4 (C-3), 64,0 (C-1), 58,9 (C-6) ; δ = (β-L-psico-2,6-pyranose) : 99,3 (C-2), 71,1 (C-3), 69,9 (C-5), 66,0 (C-4), 65,1 (C-6), 64,9 (C-1) ; δ = (α-L-psico-2,5-furanose) : 104,2 (C-2), 83,6 (C-5), 71,2 (C-4), 71,2 (C-3), 64,2 (C-1), 62,2 (C-6) ; δ = (β-L-psico-2,5-furanose) : 106,5 (C-2), 83,6 (C-5), 75,5 (C-3), 71,9 (C-4), 63,7 (C-6), 63,3 (C-1)

HRMS-ESI : m/z : [M + Cl]⁻ théorique : 215,0322 ; mesurée : 215,0318

**D-fructose 7**

(3*S*, 4*R*, 5*R*)-1,3,4,5,6-Pentahydroxy-hexan-2-one
D-*arabino*-hex-2-ulose

Formule brute : C₆H₁₂O₆

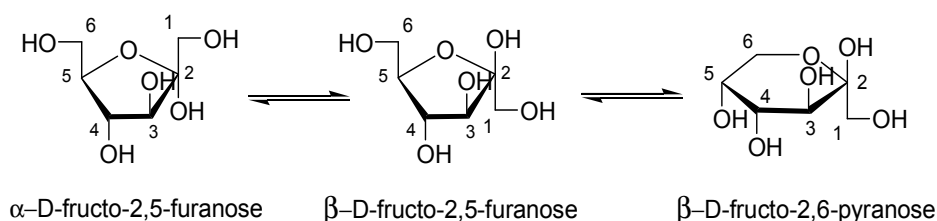
Masse moléculaire : 180,06 g.mol⁻¹

Le D-fructose 7 est obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 77% (138 mg, 0,77 mmol), selon le *protocole 1*.

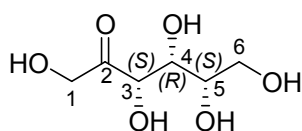
CCM : R_f (dichlorométhane/méthanol : 8/2) = 0,19 (Révélateur: *p*-anisaldéhyde)

[α]_D²⁰ = - 93,13 (c 3 , H₂O) ; littérature : [α]_D²⁰ = - 92,49 (c 5, H₂O) [328]

Le spectre de RMN ¹³C montre un produit majoritaire correspondant au spectre du D-fructose 7 décrit dans la littérature [329]. La forme β-D-fructo-2,6-pyranose est prépondérante devant les formes β-D-fructo-2,5-furanose, α-D-fructo-2,5-furanose et α-D-fructo-2,6-pyranose dans un ratio 72/22/6/0, conforme à celui de la littérature 68/22/6/3 [330].



RMN ¹³C (101 MHz, D₂O) δ = (β-D-fructo-2,6-pyranose) : 99,1 (C-2), 70,7 (C-4), 70,2 (C-5), 68,6 (C-3), 64,9 (C-1), 64,4 (C-6) ; δ = (β-D-fructo-2,5-furanose) : 102,5 (C-2), 81,7 (C-5), 76,4 (C-3), 75,5 (C-4), 63,7 (C-1), 63,4 (C-6) ; δ = (α-D-fructo-2,5-furanose) : 105,5 (C-2), 83,0 (C-3), 82,4 (C-5), 77,1 (C-4), 64,0 (C-1), 62,2 (C-6)



L-sorbose **8**
 (3*S*, 4*R*, 5*S*)-1,3,4,5,6-pentahydroxy-hexan-2-one
 L-xylo-hex-2-ulose

Formule brute : C₆H₁₂O₆

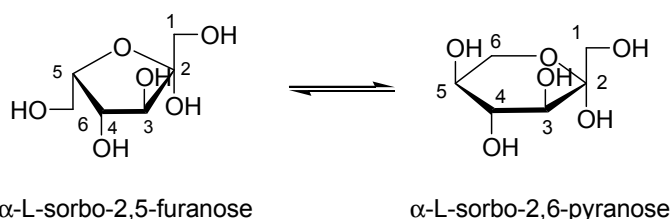
Masse moléculaire : 180,06 g.mol⁻¹

Le L-sorbose **8** est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 57% (102 mg, 0,57 mmol), selon le *protocole 1* et avec un rendement de 63% (114 mg, 0,63 mmol), selon le *protocole 3*.

CCM : R_f (dichlorométhane/méthanol : 8/2) = 0,40 (Révélateur : *p*-anisaldéhyde)

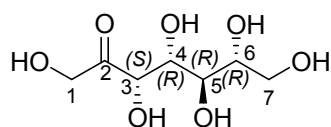
[α]_D²⁰ = - 43,5 (c 1, H₂O) ; littérature : **[α]_D²⁰** = - 43,4 (c 12, H₂O) [331]

Le spectre de RMN ¹³C montre un produit majoritaire correspondant au spectre du L-sorbose **8** décrit dans la littérature [332]. La forme α-L-sorbo-2,6-pyranose est prépondérante devant la forme α-L-sorbo-2,5-furanose, dans un ratio 96/4, conforme à celui de la littérature 98/2 [332]. Les formes β-L-sorbo-2,6-pyranose et β-L-sorbo-2,5-furanose sont présentes à l'état de traces et donc difficilement identifiables par RMN ¹³C.



RMN ¹³C (101 MHz, D₂O) δ = (α-L-sorbo-2,6-pyranose) : 98,5 (C-2), 74,6 (C-4), 71,1 (C-3), 70,2 (C-5), 64,2 (C-1), 62,5 (C-6) ; δ = (α-L-sorbo-2,5-furanose) : 102,5 (C-2), 78,5 (C-5), 76,7 (C-3), 76,0 (C-4), 63,8 (C-1), 61,4 (C-6)

HRMS-ESI : m/z : [M + Cl]⁻ théorique : 215,0322 ; mesurée : 215,0319



D-sédoheptulose 9
(3*S*, 4*R*, 5*R*, 6*R*)-1,3,4,5,6,7-hexahydroxy-heptan-2-one
D-*altro*-hept-2-ulose

Formule brute : C₇H₁₄O₇

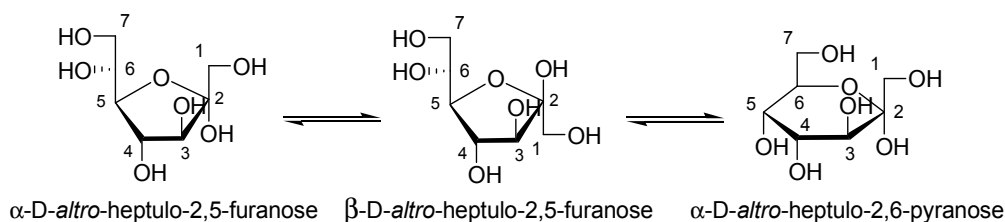
Masse moléculaire : 210,07 g.mol⁻¹

Le D-sédoheptulose **9** est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec des rendements de 44% (92 mg, 0,44 mmol) et de 67 % (140 mg, 0,67 mmol), en présence de 6 mg de TK_{gst} ou du mutant R521Y/H462N, respectivement, selon le *protocole 1*.

CCM : R_f (dichlorométhane/méthanol : 8/2) = 0,22 (Révélateur : *p*-anisaldéhyde)

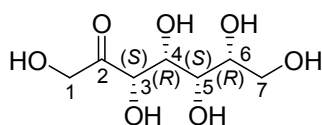
[α]_D²⁰ = + 7,8 (c 0,7, H₂O) ; littérature : [α]_D²⁰ = + 8,6 (c 0,1, H₂O) [225]

Le spectre de RMN ¹³C montre un produit majoritaire correspondant au spectre du D-sédoheptulose **9** décrit dans la littérature [333]. La forme β-D-*altro*-heptulo-2,5-furanose est prépondérante devant les formes α-D-*altro*-heptulo-2,6-pyranose et α-D-*altro*-heptulo-2,5-furanose dans un ratio β-D-*altro*-heptulo-2,5-furanose/α-D-*altro*-heptulo-2,6-pyranose/α-D-*altro*-heptulo-2,5-furanose: 65/21/14, conforme à la littérature : 64/20/16 [333].



RMN ¹³C (101 MHz, D₂O) δ = (β-D-*altro*-heptulo-2,5-furanose) ; 101,6 (C-2), 80,1 (C-5), 75,6 (C-3), 75,4 (C-4), 72,6 (C-6), 62,4 (C-1), 62,2 (C-7) ; δ = (α-D-*altro*-heptulo-2,6-pyranose) : 97,4 (C-2), 70,8 (C-4), 68,7 (C-6), 68,2 (C-3), 64,0 (C-1), 63,4 (C-5), 61,2 (C-7) ; α-D-*altro*-heptulo-2,5-furanose : 104,6 (C-2), 81,7 (C-3), 81,6 (C-5), 76,4 (C-4), 71,5 (C-6), 62,7 (C-1), 62,3 (C-7)

HRMS-ESI : m/z : [M + Cl]⁻ théorique : 245,0428 ; mesurée : 245,0430

**D-ido-heptulose 10**(3*S*, 4*R*, 5*S*, 6*R*)-1,3,4,5,6,7-hexahydroxy-heptan-2-one

D-ido-hept-2-ulose

Formule brute : C₇H₁₄O₇Masse moléculaire : 210,07 g.mol⁻¹

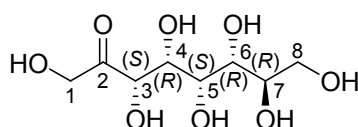
Le D-ido-heptulose 10 est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 21% (45 mg, 0,21 mmol), selon le *protocole 1*.

CCM : R_f (dichlorométhane/méthanol : 8/2) = 0,22 (Révélateur : *p*-anisaldéhyde)

[α]_D²⁰ = - 36,4 (c 0,3 H₂O) ; littérature : [α]_D²⁰ = - 34 ± 8 (c 0,3, H₂O) [334]

Sept signaux sont présents sur le spectre de RMN ¹³C, correspondants à une des formes cyclique du D-ido-heptulose 10.

RMN ¹³C (101 MHz, D₂O) δ = 101,8 - 77,2 - 76,3 - 75,5 - 70,0 - 63,4 - 62,6

**D-glycéro-D-ido-octulose 11**(3*S*, 4*R*, 5*S*, 6*R*, 7*R*)-1,3,4,5,6,7,8-heptahydroxy-octan-2-one

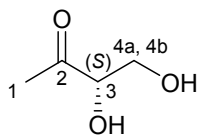
D-glycéro-D-ido-oct-2-ulose

Formule brute : C₈H₁₆O₈Masse moléculaire : 240,08 g.mol⁻¹

Le D-glycéro-D-ido-heptulose 11 est obtenu sous la forme d'une huile jaune en présence du D-glucose, selon un protocole adapté du *protocole 1*, en présence de 6 mg du mutant R521V/S385D/H462S et de 200 mM de Li-HPA.

Le spectre de RMN ¹³C montre un produit correspondant au spectre d'une des formes cycliques du D-glycéro-D-ido-heptulose 11 décrite dans la littérature [26], [335].

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) δ = 101,1 (C-2), 79,8 (C-3), 79,4 (C-4, C-5), 73,9 (C-7), 72,1(C-6), 66,1 (C-1), 65,8(C-8)



1-désoxy-L-érythrulose 12
(3S)-3,4-dihydroxy-butan-2-one

Formule brute : $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3$

Masse moléculaire : $104,05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Le 1-désoxy-L-érythrulose 12 est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 20% (20 mg, 0,2 mmol), selon le *protocole 1*, en présence de l'acide pyruvique comme substrat donneur de la TK_{gst} .

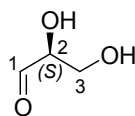
CCM : R_f (dichlorométhane/méthanol : 95/05) = 0,50 (Révélateur : *p*-anisaldéhyde)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 55,0$ (c 0,1 H_2O) ; littérature : $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = + 54,2$ (c 2, H_2O) [234]

Le spectre de RMN ^{13}C montre un produit majoritaire correspondant au spectre du 1-désoxy-L-érythrulose 12, décrit dans la littérature [234], présent exclusivement sous forme linéaire.

RMN ^1H : (400 MHz, D_2O) δ 4,43 (t, $J = 3,8 \text{ Hz}$, 1H, H_3), 3,97 (dd, $J = 12,3, 4,2 \text{ Hz}$, 1H, H_{4a}), 3,90 (dd, $J = 12,3, 3,4 \text{ Hz}$, 1H, H_{4b}), 2,28 (s, 3H, H_1)

RMN ^{13}C : (101 MHz, D_2O) δ = 212,7 (C-2), 77,9 (C-3), 62,5 (C-4), 25,8 (C-1)



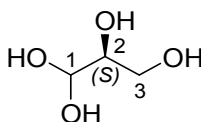
L-glycéraldéhyde 13
(2S)-2,3-dihydroxy-propionaldéhyde

Formule brute : $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$

Masse moléculaire : $90,03 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Le L-glycéraldéhyde 13 est obtenu en solution dans l'eau avec un rendement de 100% (50 mM, 1 mmol, 20 mL, 90 mg), selon le *protocole 4.1*.

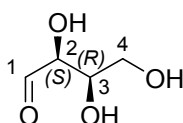
HPLC : $t_r = 15,787 \text{ min}$



Forme linéaire "hydratée"

Le spectre de RMN ^{13}C montre un produit majoritaire correspondant au spectre du L-glycéraldéhyde **13** décrit dans la littérature [336].

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) δ = (Forme linéaire « hydratée ») : 98,7 (C-1), 74,0 (C-2), 61,6 (C-3)

**D-thréose 14**

(2S, 3R)-2,3,4-trihydroxy-butyraldéhyde

Formule brute : $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4$ Masse moléculaire : $120,04 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

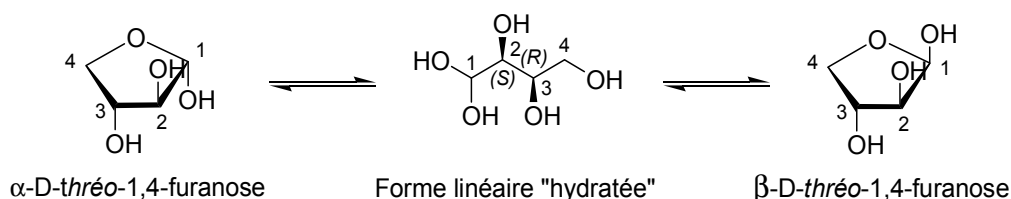
Le D-thréose **14** est obtenu en solution dans l'eau avec un rendement de 98% (98 mM, 0,98 mmol, 10 mL, 118 mg), selon le *protocole 4.2.* et sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 75% (3,6 g, 30 mmol), selon un protocole adapté du *protocole 4.2.* décrit ci-après.

Le glycolaldéhyde (4,8 g, 80 mmol, 400 mM) est dissous dans 200 mL d'eau et le pH de la solution est ajusté à pH 8, à l'aide d'une solution de NaOH 0,1 M. Puis 50 mg de $\text{FSA}_{\text{eco}}^{\text{A}129\text{G}}$ sont ajoutés et le mélange est agité à 25°C à 900 rpm. A $t = 21$ heures, 12 mg supplémentaires de $\text{FSA}_{\text{eco}}^{\text{A}129\text{G}}$ sont ajoutés. L'avancement de la réaction est suivi par RMN ^1H *in situ*, réalisée en présence d'un étalon-interne (TSP- d_4). Après la conversion quasi-totale (98%) du glycolaldéhyde (48 heures), le D-thréose **14** est obtenu en solution dans l'eau (196 mM, 200 mL). Pour éliminer le glycolaldéhyde restant, la solution de D-thréose **14** est concentrée sous pression réduite pour obtenir un volume d'environ 30 mL et mis en présence de la TK_{gst} (50 mg), de ses cofacteurs et du Li-HPA (50 mM), selon le *protocole 1*, à 25°C . L'avancement de la réaction est suivi par RMN ^1H *in situ*, réalisée en présence d'un étalon-interne (TSP- d_4). Après la conversion totale du glycolaldéhyde, la réaction est arrêtée (72 heures). Les enzymes sont précipitées par ajout de trois volumes

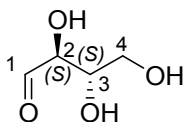
d'éthanol et éliminées par centrifugation (4000 rpm, 15 minutes, 4°C), puis le surnageant est évaporé sous pression réduite. Le L-érythrose **1** est la seule impureté détectée (2%).

HPLC : $t_r = 13,967$ min

Le spectre de RMN ^{13}C montre un produit majoritaire correspondant au spectre du D-thréose **14** décrit dans la littérature [337]. La forme α -D-thréo-1,4-furanose est prépondérante devant la forme β -D-thréo-1,4-furanose et la forme linéaire « hydratée » dans un ratio α -D-thréo-1,4-furanose/ β -D-thréo-1,4-furanose/forme linéaire « hydratée » : 52/38/10, conforme à la littérature 52/38/10 [338].



RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) $\delta = (\alpha$ -D-thréo-1,4-furanose) : 103,4 (C-1), 81,9 (C-2), 76,4 (C-3), 74,3 (C-4) ; (β -D-thréo-1,4-furanose) ; 97,9 (C-1), 77,4 (C-2), 76,1 (C-3), 71,8 (C-4) ; $\delta =$ (Forme linéaire "hydratée") : 91,1 (C-1), 74,5 (C-2), 72,1 (C-3), 64,2 (C-4)



L-érythrose **15**

(2S, 3S)-2,3,4-trihydroxy-butyraldéhyde

Formule brute : $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4$

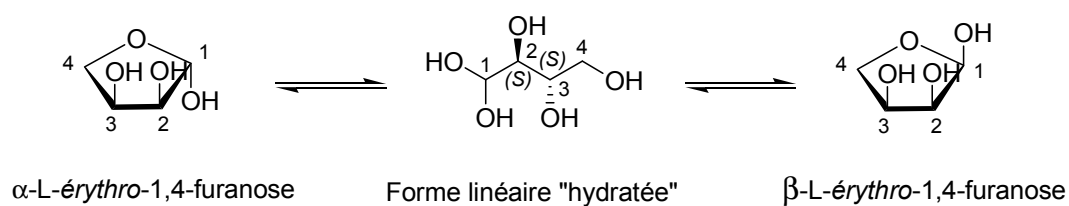
Masse moléculaire : $120,04 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Le L-érythrose **15** est obtenu en solution dans l'eau avec un rendement de 96% (96 mM, 0,96 mmol, 10 mL, 115 mg), selon le *protocole 4.3*.

HPLC : $t_r = 13,747$ min

Le spectre de RMN ^1H montre un produit majoritaire correspondant au spectre du L-érythrose **15** décrit dans la littérature [336]. La forme β -L-érythro-1,4-furanose est prépondérante devant la forme α -L-érythro-1,4-furanose et la forme linéaire « hydratée »

dans un ratio β -L-érythro-1,4-furanose/ α -L-érythro-1,4-furanose/ forme linéaire « hydratée » : 62/27/11, conforme à la littérature 63/25/10 [338].

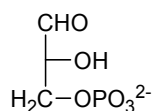


RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) δ = (β -L-érythro-1,4-furanose) : 102,4 (C-1), 77,6 (C-2), 72,5 (C-4), 71,7 (C-3) ; (α -L-érythro-1,4-furanose) ; 96,8 (C-1), 72,9 (C-4), 72,4 (C-2), 70,6 (C-3) ; δ = (Forme linéaire "hydratée") : 90,7 (C-1), 74,8 (C-2), 73,0 (C-3), 63,8 (C-4)

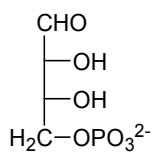
Annexes

Annexe 1 : Monosaccharides phosphorylés

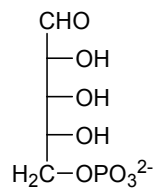
Aldoses phosphorylés



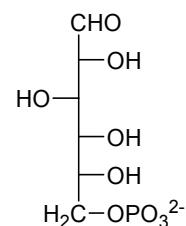
D-glycéraldéhyde-3-phosphate
D-G3P



D-érythrose-4-phosphate
D-E4P

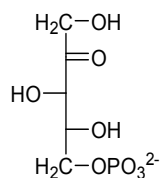


D-ribose-5-phosphate
D-R5P

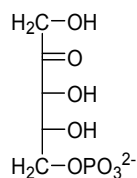


D-glucose-6-phosphate
D-G6P

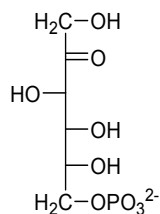
Cétooses phosphorylés



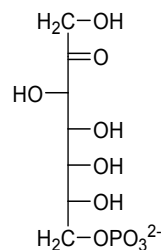
D-xylulose-5-phosphate
D-X5P



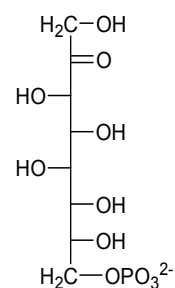
D-ribulose-5-phosphate
D-Ru5P



D-fructose-6-phosphate
D-F6P



D-sédoheptulose-7-phosphate
D-S7P

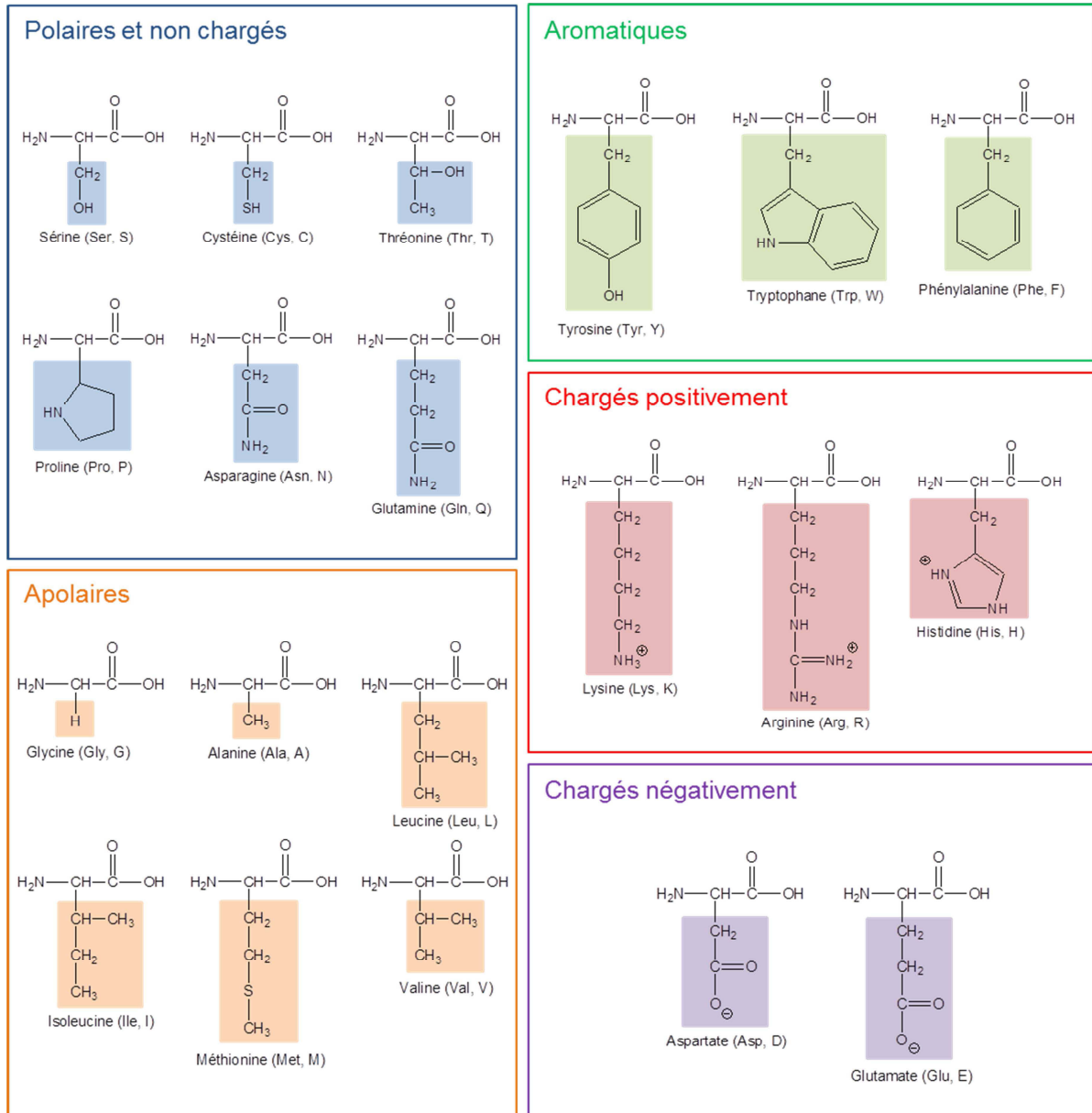


D-octulose-8-phosphate
D-O8P

Annexe 2 : Code génétique

		Deuxième nucléotide									
		U		C		A		G			
Premier nucléotide	U	UUU	Phénylalanine (Phe, F)	UCU	Sérine (Ser, S)	UAU	Tyrosine (Tyr, Y)	UGU	Cystéine (Cys, C)	U	Troisième nucléotide
		UUC		UCC		UAC		UGC		C	
		UUA	Leucine (Leu, L)	UCA		UAA	Codons stop	UGA	Codon stop	A	
		UUG		UCG		UAG		UGG	Tryptophane (Trp, W)	G	
	C	CUU	Leucine (Leu, L)	CCU	Proline (Pro, P)	CAU	Histidine (Hist, H)	CGU	Arginine (Arg, R)	U	
		CUC		CCC		CAC		CGC		C	
		CUA		CCA		CAA	Glutamine (Gln, Q)	CGA		A	
		CUG		CCG		CAG		CGG		G	
	A	AUU	Isoleucine (Ile, I)	ACU	Thréonine (Thr, T)	AAU	Asparagine (Asn, N)	AGU	Sérine (Ser, S)	U	
		AUC		ACC		AAC		AGC		C	
		AUA		ACA		AAA	Lysine (Lys, K)	AGA	Arginine (Arg, R)	A	
		AUG	Méthionine (Met, M)	ACG		AAG		AGG	G		
	G	GUU	Valine (Val, V)	GCU	Alanine (Ala, A)	GAU	Acide aspartique (Asp, D)	GGU	Glycine (Gly, G)	U	
		GUC		GCC		GAC		GGC		C	
		GUA		GCA		GAA	Acide glutamique (Glu, E)	GGA		A	
		GUG		GCG		GAG		GGG		G	

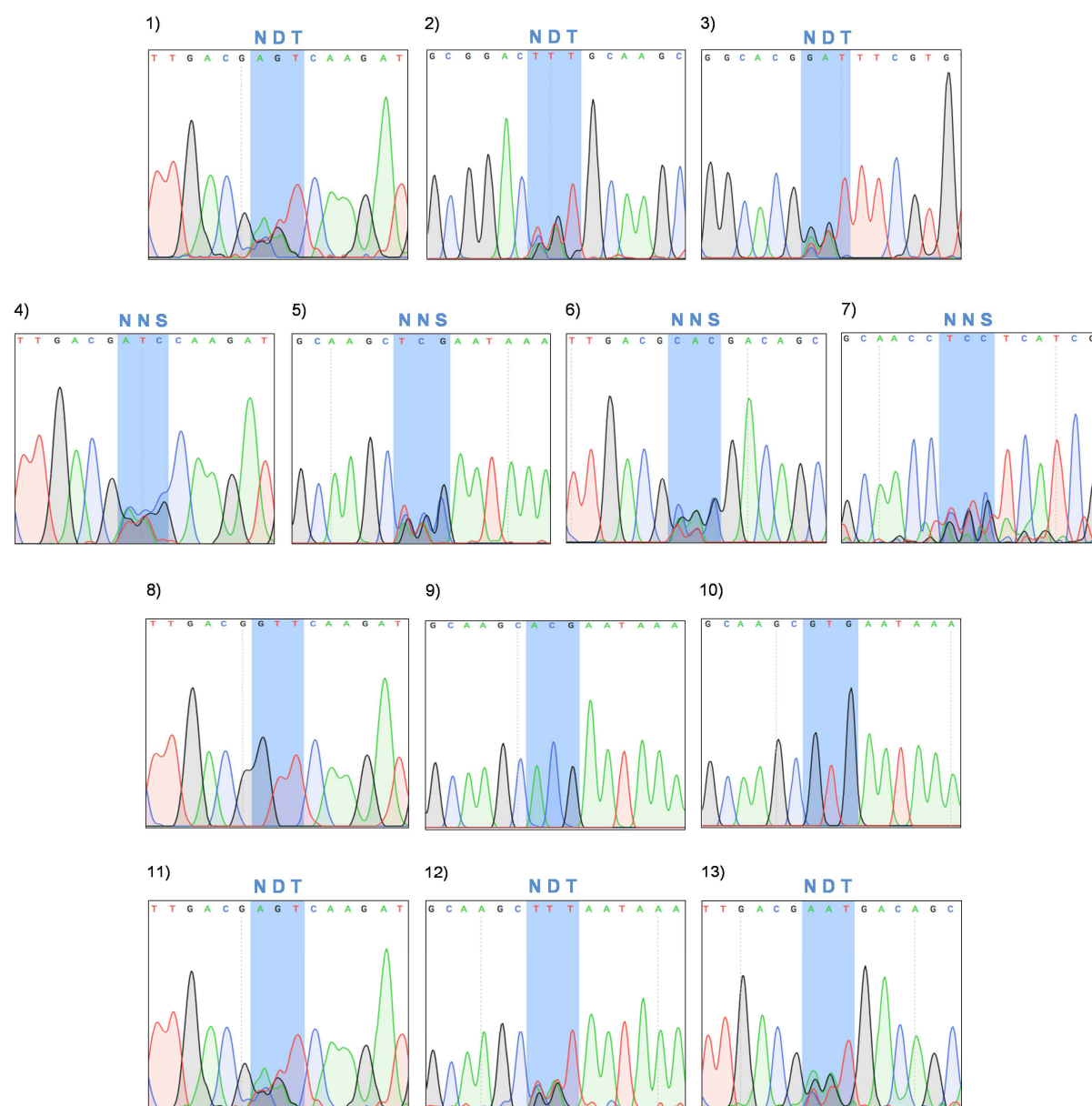
Annexe 3 : Les vingt acides aminés naturels



Annexe 4 : Acides aminés clés des TK_{sce} , TK_{eco} , TK_{ban} et TK_{gst}

TK_{sce}	TK_{eco}	TK_{ban}	TK_{gst}
H30	H26	H28	H28
H263	H261	H263	H263
H481	H473	H474	H474
S386	S385	S385	S385
R359	R358	R358	R358
H469	H461	H462	H462
R528	R520	R521	R521
D477	D469	D470	D470
H103	H100	H102	H102

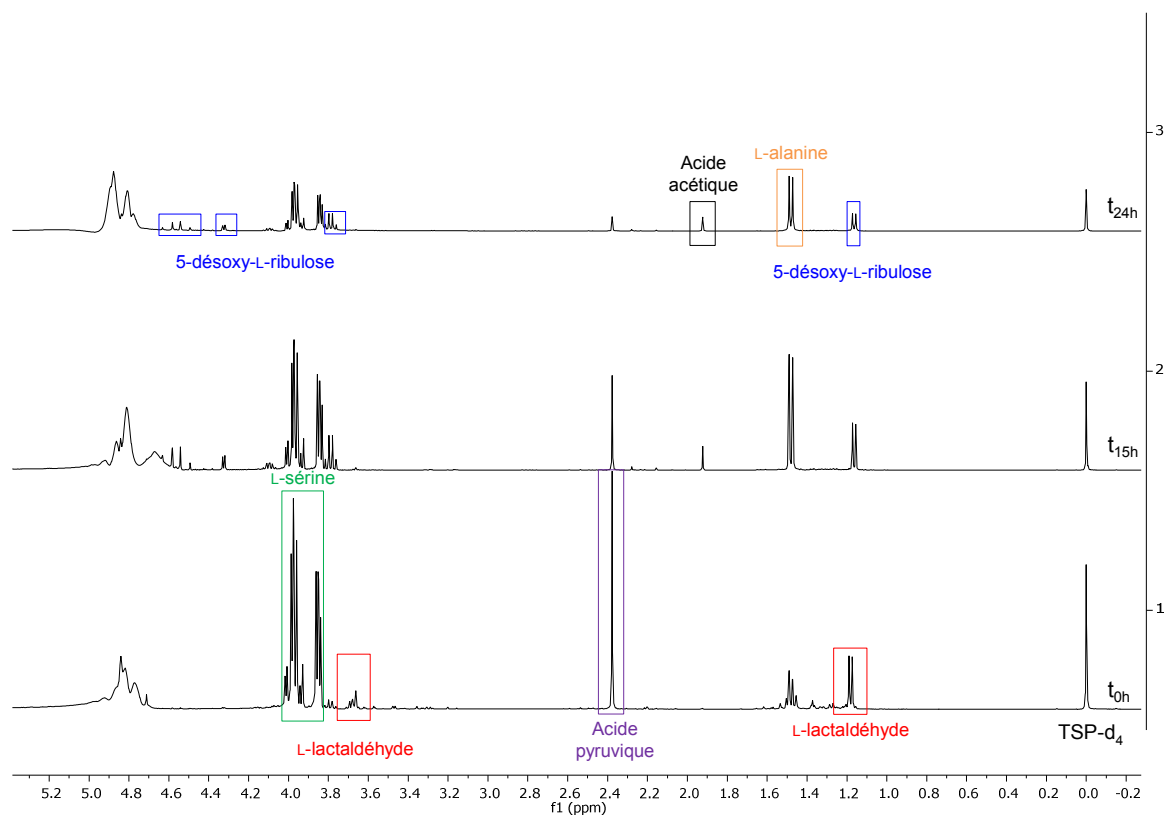
Annexe 5 : Analyse de la qualité des mutants ponctuels de la TK_{gst} et des banques de TK_{gst} mutées



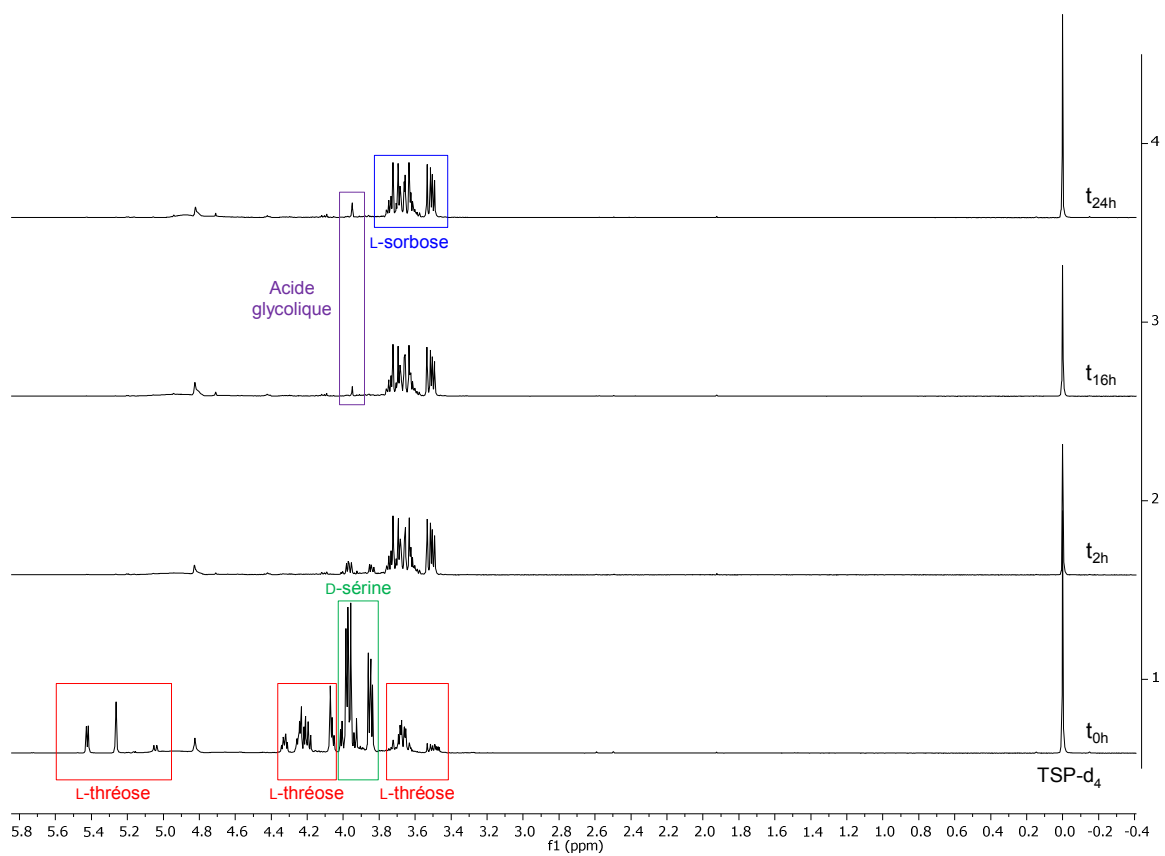
1)	Banque L191X /F435X	8)	Mutant R521V
2)	Banque L191X/ L382X	9)	Mutant S385T
3)	Banque L382X/ F435X	10)	Mutant S385V
4)	Banque R521X	11)	Banque R521X /S385X/H462X
5)	Banque S385X	12)	Banque R521X/ S385X /H462X
6)	Banque H461X	13)	Banque R521X/S385X/ H462X
7)	Banque R358X	-	-

Annexe 6 : Spectres de RMN et chromatogrammes HPLC

Exemple : Suivi réactionnel par RMN ^1H du couplage $\text{TA}_{\text{tca}}/\text{TK}_{\text{gst}}$ pour la synthèse du 5-désoxy-L-ribulose **4**

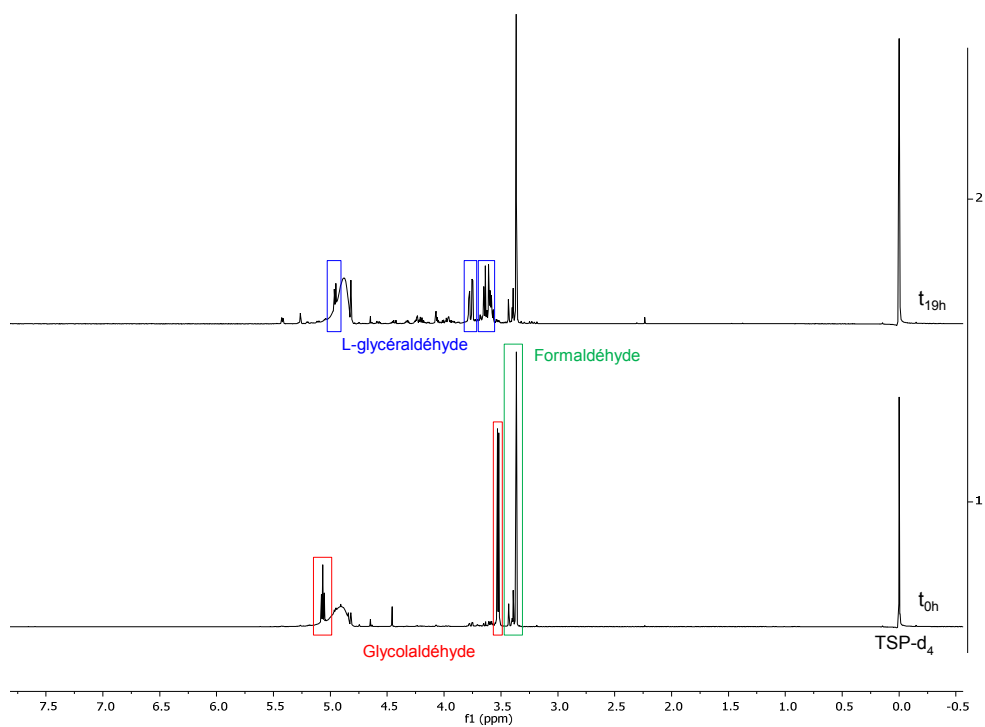


Exemple : Suivi réactionnel par RMN ^1H du couplage D-AAO_{rgf}/TK_{gst} pour la synthèse du L-sorbose **8**

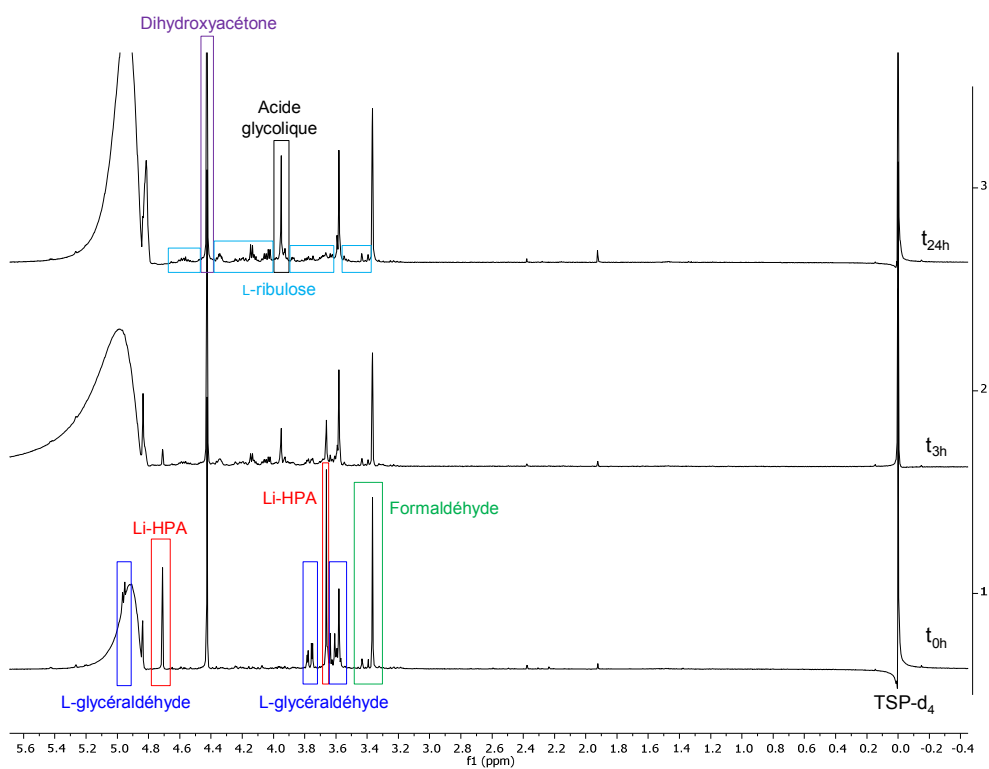


Exemple : Suivi réactionnel par RMN ^1H du couplage $\text{FSA}_{\text{eco}}^{\text{A}129\text{G}}/\text{TK}_{\text{gst}}$ pour la synthèse du L-glycéraldéhyde **13** et du L-ribulose **3**

▪ Synthèse du L-glycéraldéhyde **13**

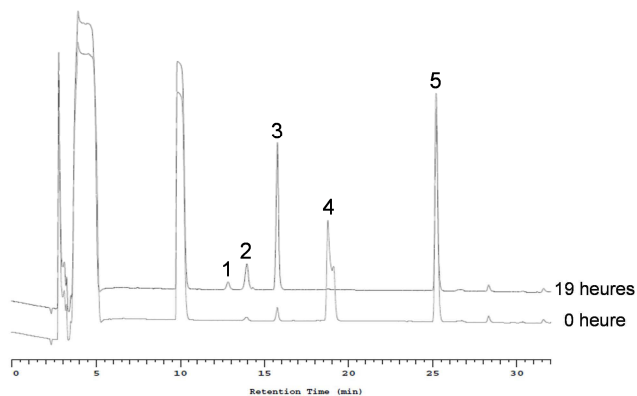


▪ Synthèse du L-ribulose **3**

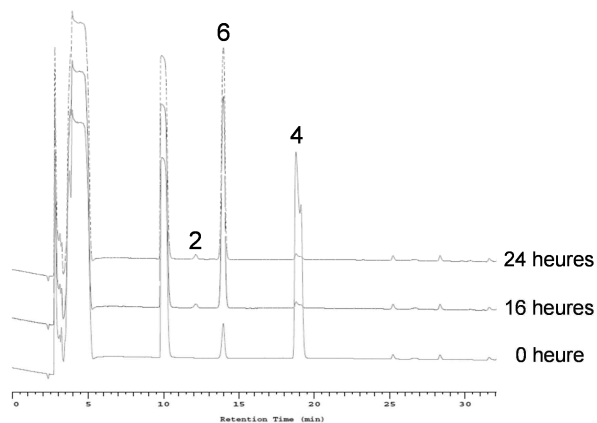


Exemple : Suivi réactionnel par HPLC de la synthèse du L-glycéraldéhyde **13**, du D-thréose **14** et du L-érythrose **15**, catalysée par la FSA_{eco} sauvage ou mutée (1 : L-xylose, 2 : D-idose, 3 : L-glycéraldéhyde ; 4 : glycolaldéhyde ; 5 : formaldéhyde ; 6 : D-thréose ; 7 : L-érythrose)

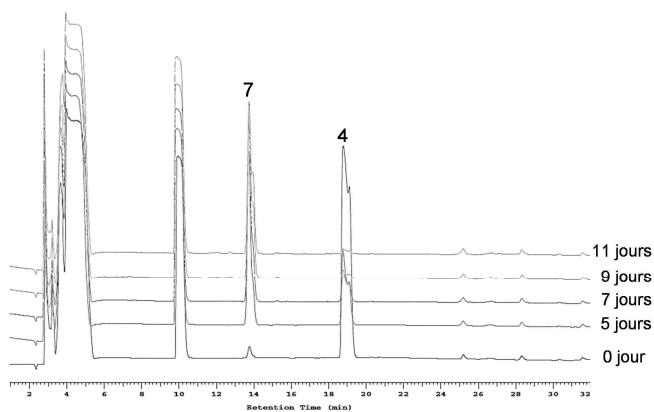
▪ Synthèse du L-glycéraldéhyde **13**



▪ Synthèse du D-thréose **14**

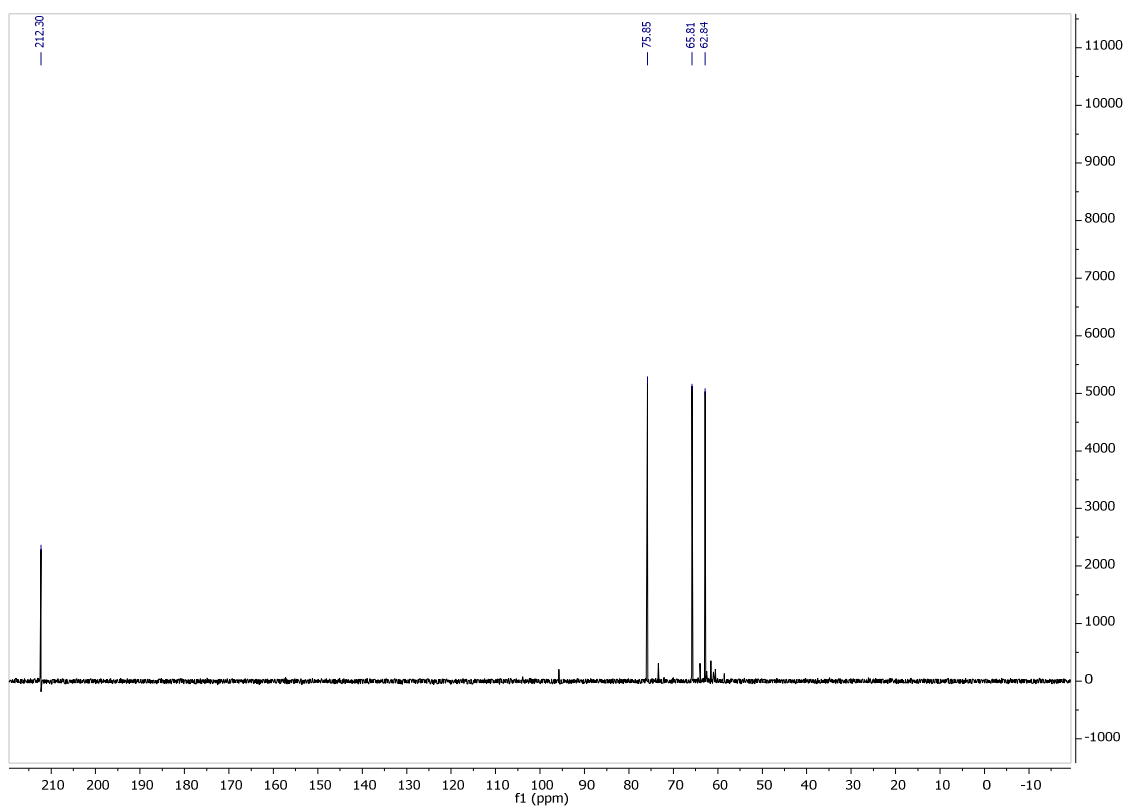
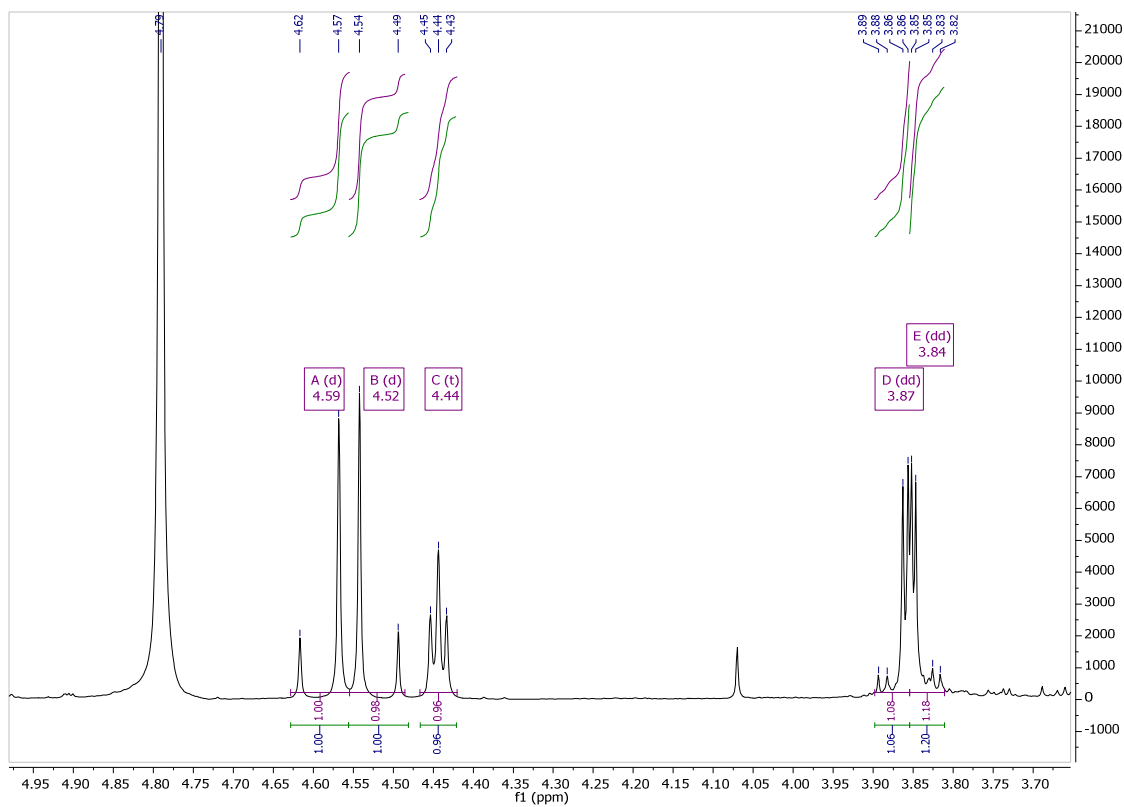


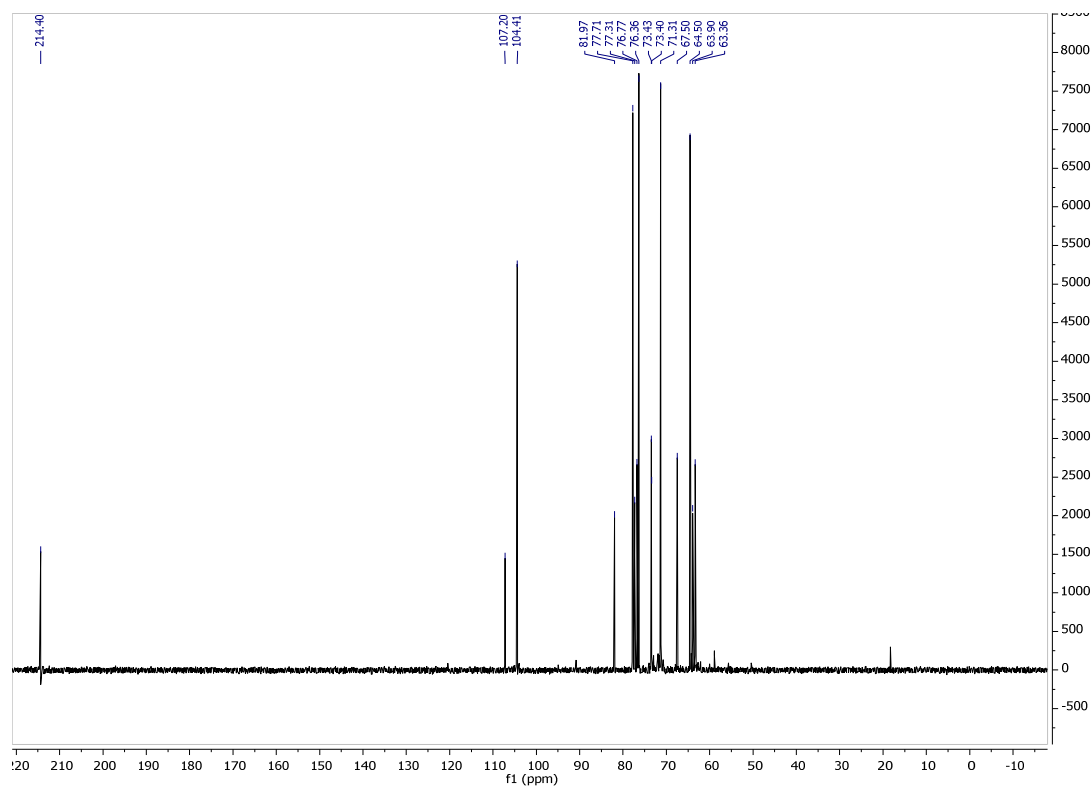
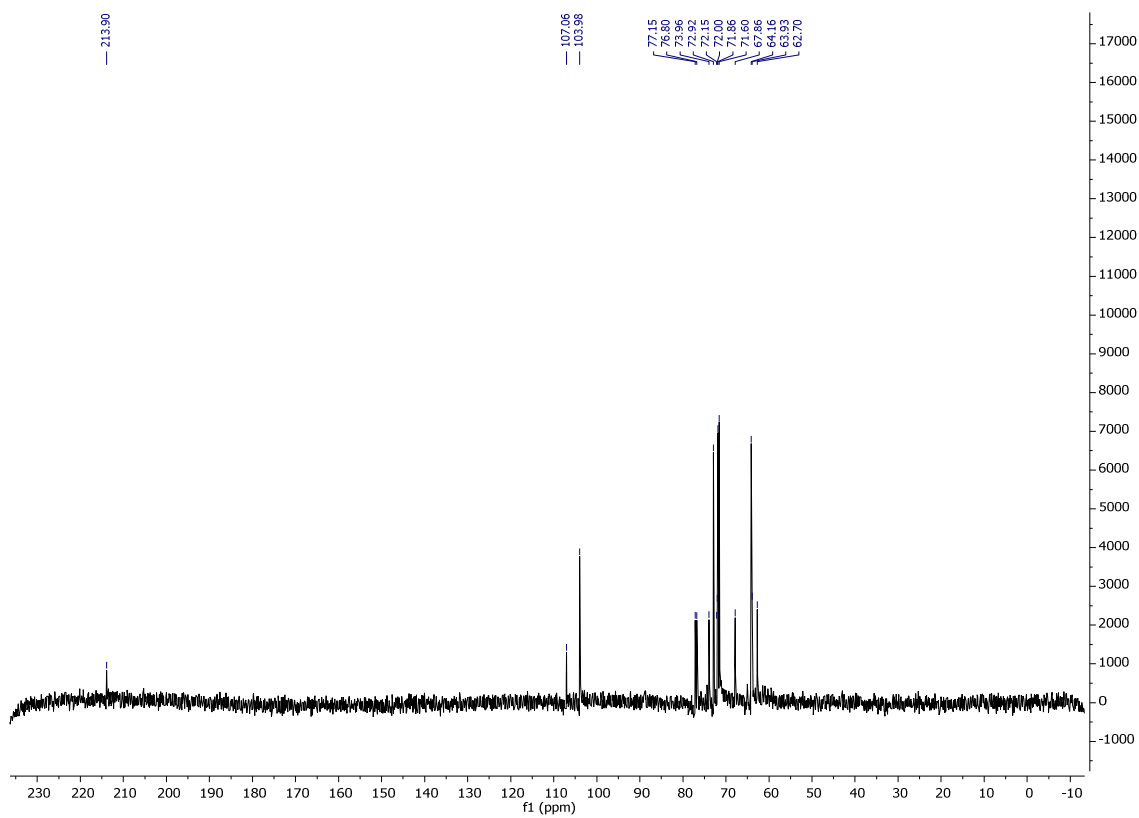
▪ Synthèse du L-érythrose **15**

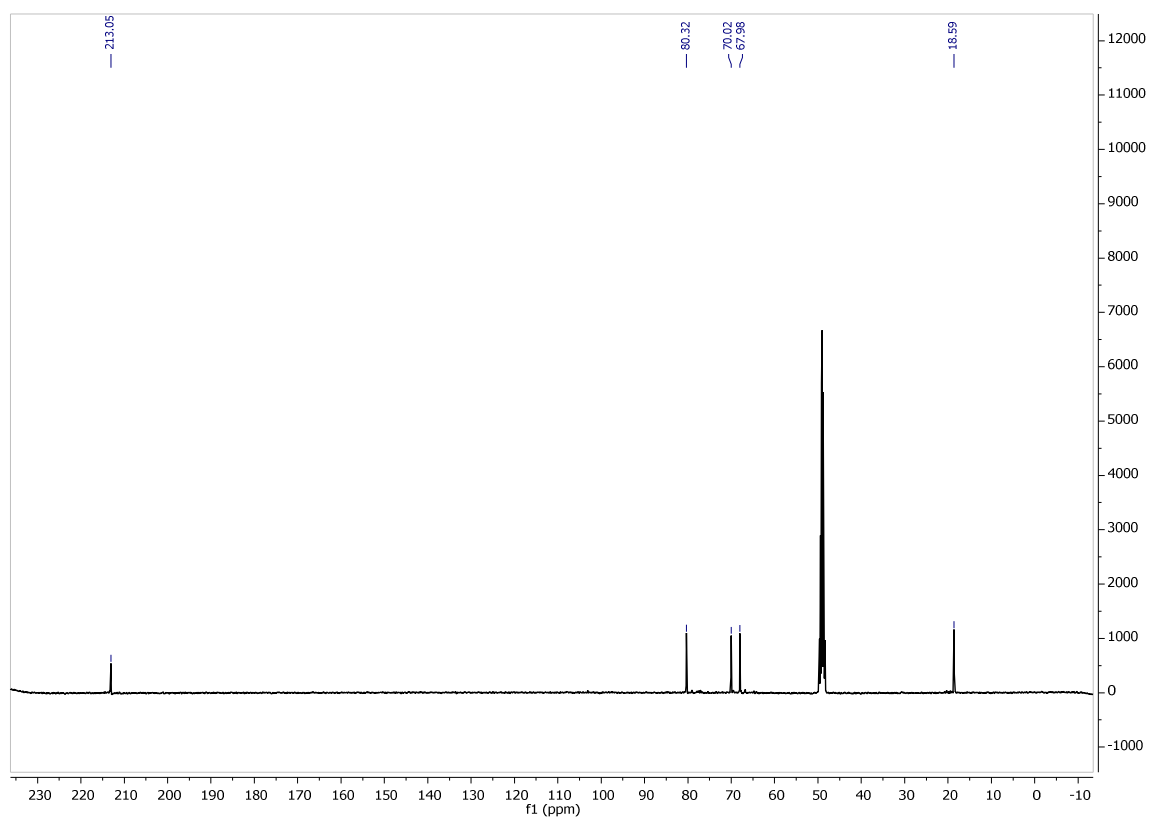
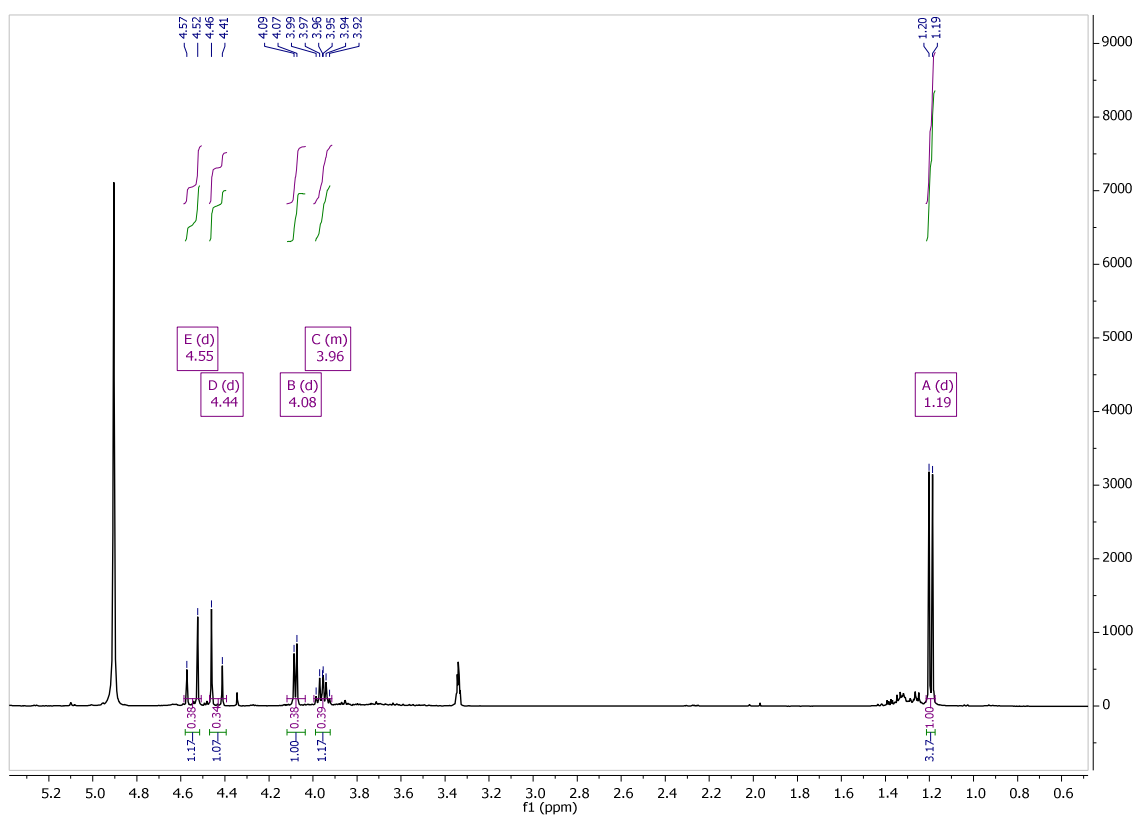


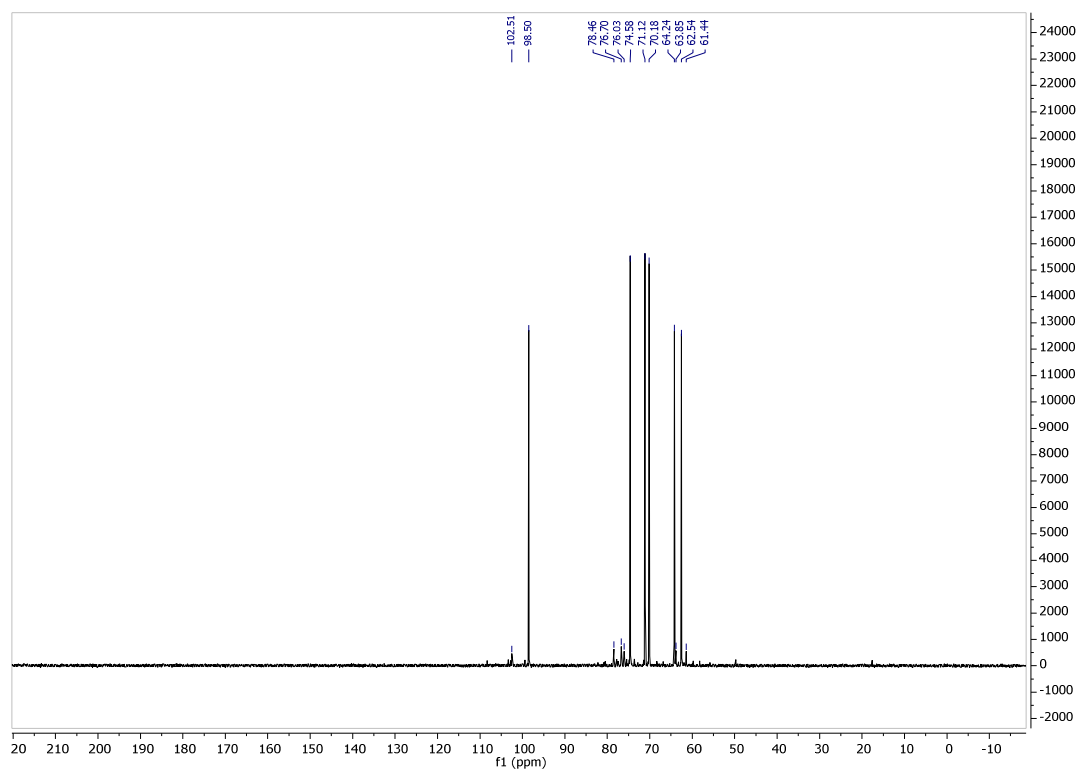
Exemples : Spectres de RMN des cétooses synthétisés purifiés

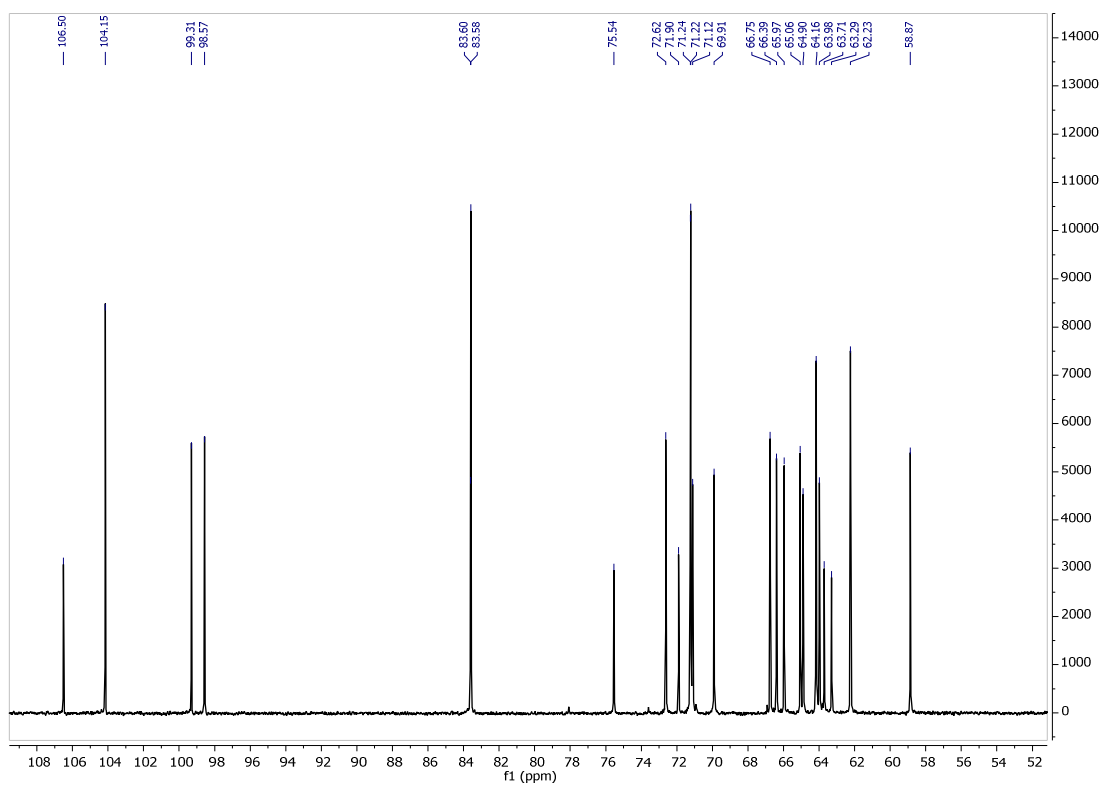
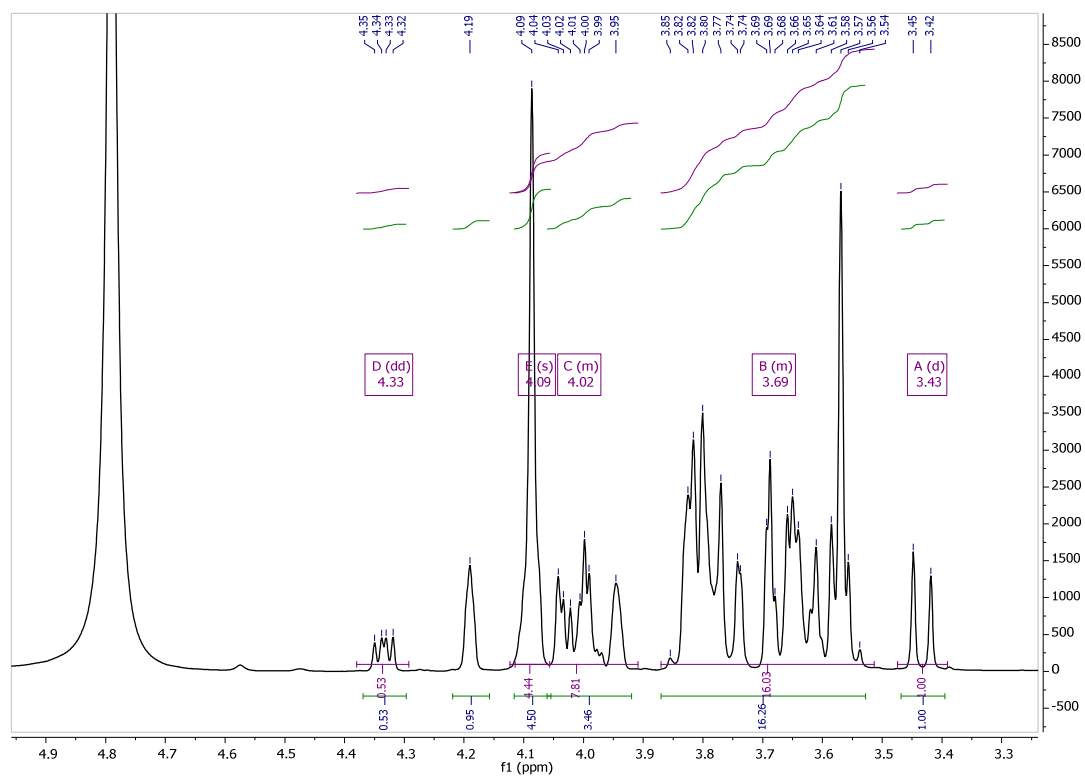
- L-érythrose **1** (D₂O)

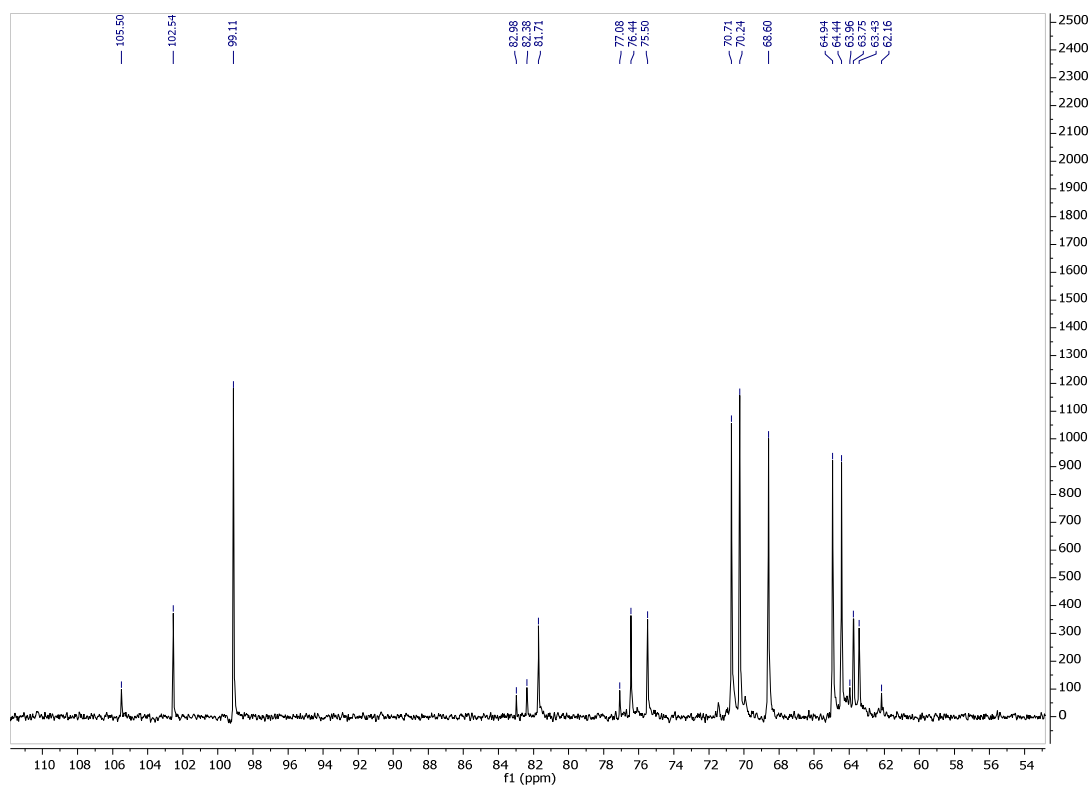
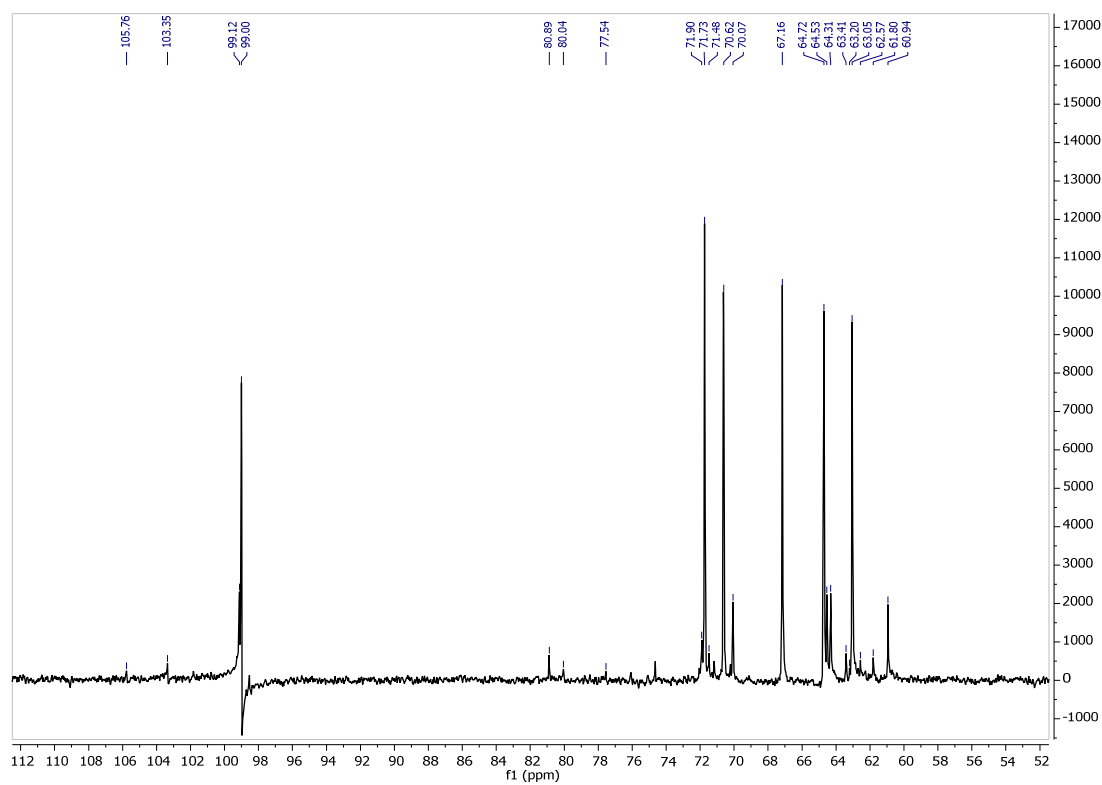


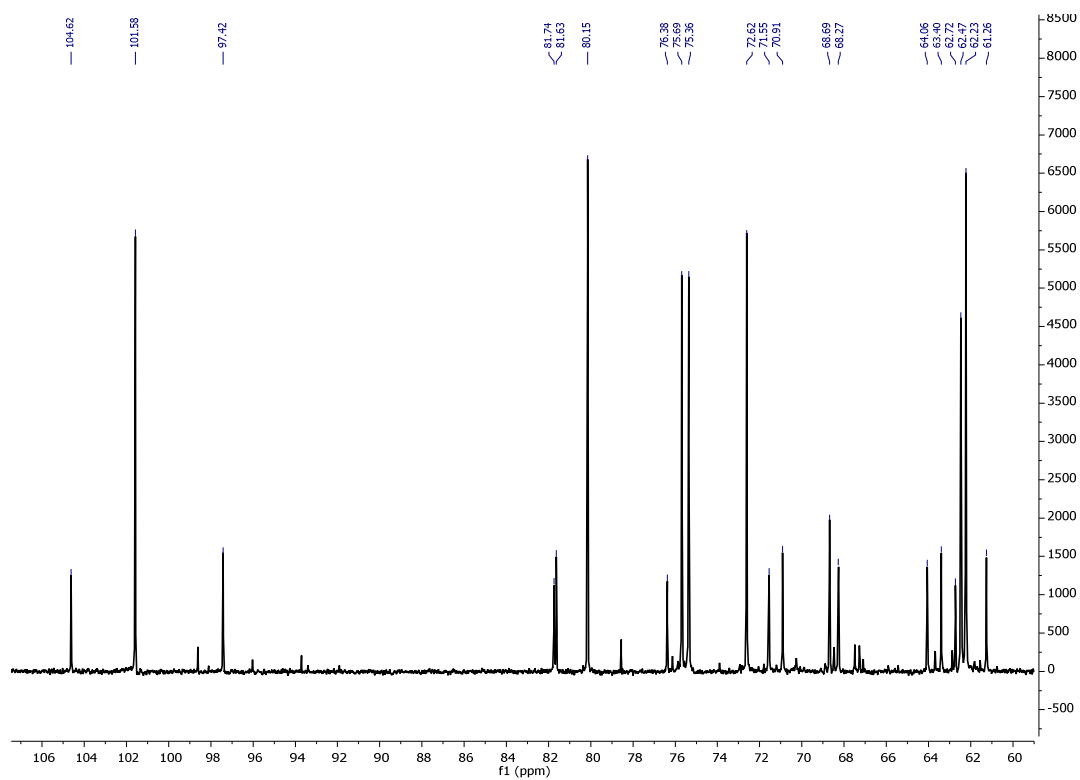
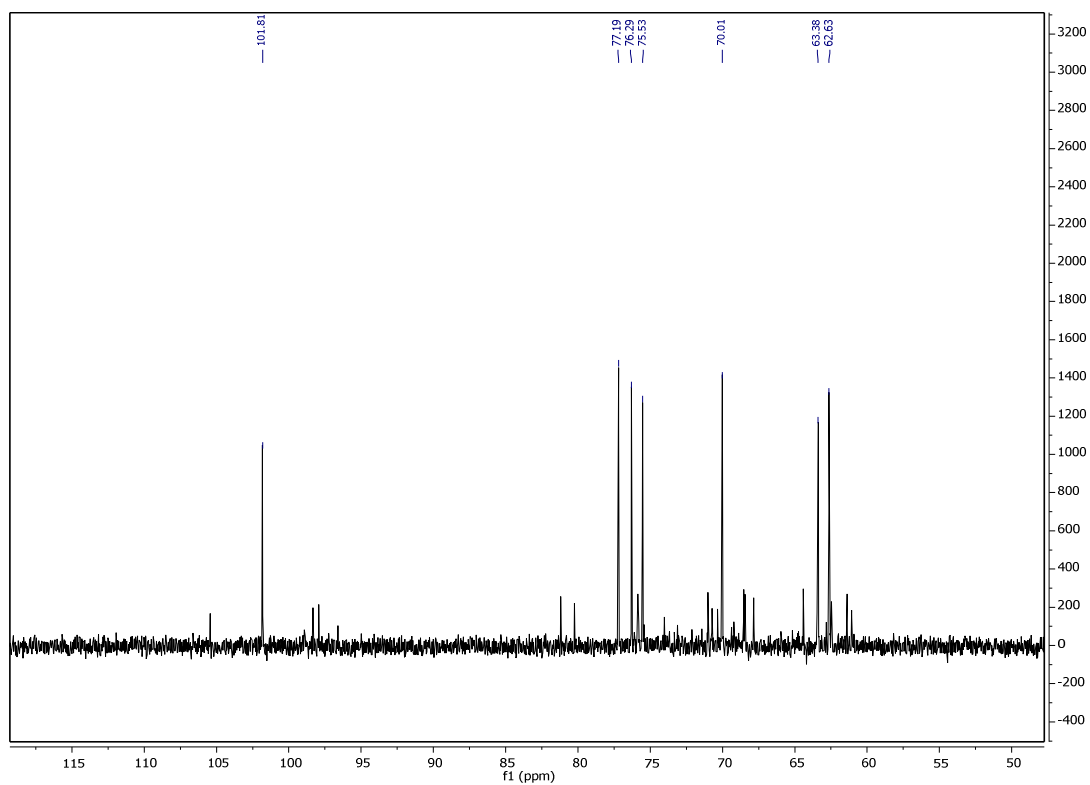
▪ D-xylulose **2** (D₂O)▪ L-ribulose **3** (D₂O)

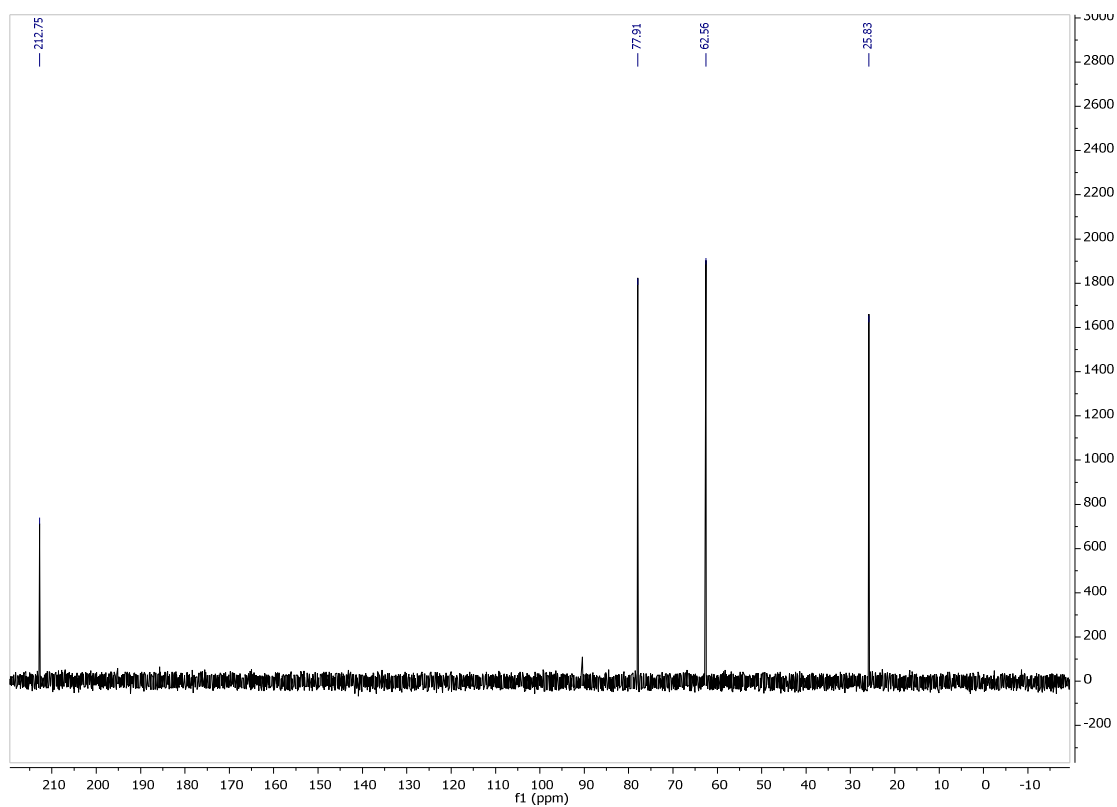
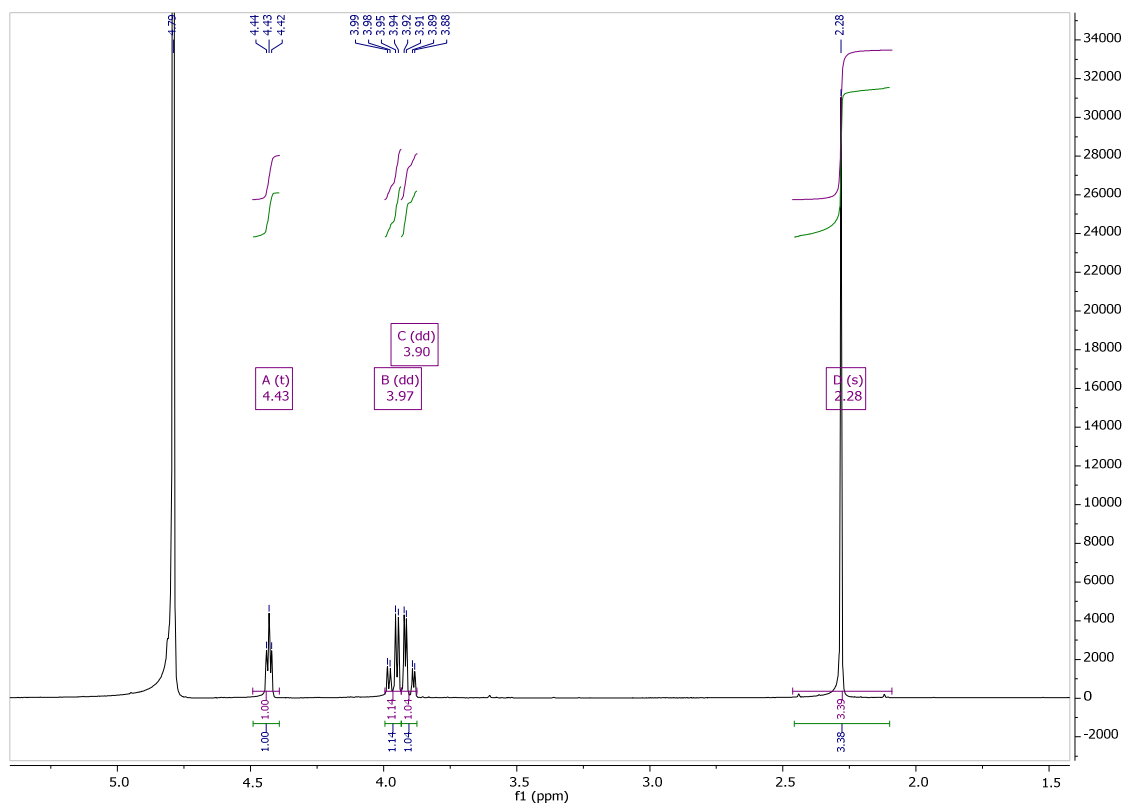
■ 5-désoxy-L-ribulose **4** (CD₃OD)

▪ D-tagatose 5 (D₂O)

▪ L-psicose **6** (D₂O)

■ D-fructose **7** (D₂O)■ L-sorbose **8** (D₂O)

▪ D-sédoheptulose **9** (D₂O)▪ D-ido-heptulose **10** (D₂O)

▪ 1-désoxy-L-érythrose **12** (D₂O)

Références Bibliographiques

-
- [1] Anastas, P.T.; Warner, J.C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; 1. paperback.; Oxford Univ. Press: Oxford, **2000**.
- [2] Bornscheuer, U.T.; Huisman, G.W.; Kazlauskas, R.J.; Lutz, S.; Moore, J.C.; Robins, K. Engineering the Third Wave of Biocatalysis. *Nature*, **2012**, *485*, 185–194.
- [3] Stemmer, W.P. Rapid Evolution of a Protein in Vitro by DNA Shuffling. *Nature*, **1994**, *370*, 389–391.
- [4] Chen, K.; Arnold, F.H. Tuning the Activity of an Enzyme for Unusual Environments: Sequential Random Mutagenesis of Subtilisin E for Catalysis in Dimethylformamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1993**, *90*, 5618–5622.
- [5] Schmid, A.; Dordick, J.S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. Industrial Biocatalysis Today and Tomorrow. *Nature*, **2001**, *409*, 258–268.
- [6] Zaks, A. Industrial Biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2001**, *5*, 130–136.
- [7] Panke, S.; Held, M.; Wubbolts, M. Trends and Innovations in Industrial Biocatalysis for the Production of Fine Chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, **2004**, *15*, 272–279.
- [8] Beerens, K.; Desmet, T.; Soetaert, W. Enzymes for the Biocatalytic Production of Rare Sugars. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **2012**, *39*, 823–834.
- [9] Rakotoarivonina, H.; Hermant, B.; Monthe, N.; Rémond, C. The Hemicellulolytic Enzyme Arsenal of *Thermobacillus Xylanilyticus* Depends on the Composition of Biomass Used for Growth. *Microbial Cell Factories*, **2012**, *11*, 159.
- [10] Li, Z.; Gao, Y.; Nakanishi, H.; Gao, X.; Cai, L. Biosynthesis of Rare Hexoses Using Microorganisms and Related Enzymes. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **2013**, *9*, 2434–2445.
- [11] Grondal, C.; Enders, D. Direct Asymmetric Organocatalytic de Novo Synthesis of Carbohydrates. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 329–337.
- [12] Northrup, A.B.; Mangion, I.K.; Hettche, F.; MacMillan, D.W.C. Enantioselective Organocatalytic Direct Aldol Reactions of α -Oxyaldehydes: Step One in a Two-Step Synthesis of Carbohydrates. *Angewandte Chemie International Edition*, **2004**, *43*, 2152–2154.
- [13] Yang, J.; Li, J.; Men, Y.; Zhu, Y.; Zhang, Y.; Sun, Y.; Ma, Y. Biosynthesis of L-Sorbose and L-Psicose Based on C—C Bond Formation Catalyzed by Aldolases in an Engineered *Corynebacterium Glutamicum* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, **2015**, *81*, 4284–4294.
- [14] Windle, C.L.; Müller, M.; Nelson, A.; Berry, A. Engineering Aldolases as Biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2014**, *19*, 25–33.
- [15] Meher, G.; Krishnamurthy, R. An Expedient Synthesis of L-Ribulose and Derivatives. *Carbohydrate Research*, **2011**, *346*, 703–707.
- [16] Vanhessche, K.; Bello, C.G.; Vandewalle, M. Total Synthesis of (-)-Neplanocin A from L-Ribulose. *Synlett*, **1991**, *1991*, 921–922.
- [17] Lu, Y.; Levin, G.V.; Donner, T.W. Tagatose, a New Antidiabetic and Obesity Control Drug. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **2007**, *0*, 071018044430010–???
- [18] Ensor, M.; Banfield, A.B.; Smith, R.R.; Williams, J.; Lodder, R.A. Safety and Efficacy of D-Tagatose in Glycemic Control in Subjects with Type 2 Diabetes. *J Endocrinol Diabetes Obes*, **2015**, *3*.
- [19] Donner, T.W.; Magder, L.S.; Zarbalian, K. Dietary Supplementation with D-Tagatose in Subjects with Type 2 Diabetes Leads to Weight Loss and Raises High-Density Lipoprotein Cholesterol. *Nutrition Research*, **2010**, *30*, 801–806.

- [20] Leang, K.; Sultana, I.; Takada, G.; Izumori, K. A Novel Bioconversion of L-Fructose to L-Glucose by *Klebsiella Pneumoniae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2003**, *95*, 310–312.
- [21] Wamelink, M.M.C.; Struys, E.A.; Jansen, E.E.W.; Blom, H.J.; Vilboux, T.; Gahl, W.A.; Kömhoff, M.; Jakobs, C.; Levchenko, E.N. Elevated Concentrations of Sedoheptulose in Bloodspots of Patients with Cystinosis Caused by the 57-Kb Deletion: Implications for Diagnostics and Neonatal Screening. *Molecular Genetics and Metabolism*, **2011**, *102*, 339–342.
- [22] Wamelink, M.M.C.; Struys, E.A.; Valayannopoulos, V.; Gonzales, M.; Saudubray, J.-M.; Jakobs, C. Retrospective Detection of Transaldolase Deficiency in Amniotic Fluid: Implications for Prenatal Diagnosis. *Prenatal Diagnosis*, **2008**, *28*, 460–462.
- [23] Dong, H.; Mahmud, T.; Tornus, I.; Lee, S.; Floss, H.G. Biosynthesis of the Validamycins: Identification of Intermediates in the Biosynthesis of Validamycin A by *Streptomyces Hygroscopicus* Var. *Limoneus*. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 2733–2742.
- [24] Degwert, U.; van Hülst, R.; Pape, H.; Herrold, R.E.; Beale, J.M.; Keller, P.J.; Lee, J.P.; Floss, H.G. Studies on the Biosynthesis of the Alpha-Glucosidase Inhibitor Acarbose: Valienamine, a M-C7N Unit Not Derived from the Shikimate Pathway. *J. Antibiot.*, **1987**, *40*, 855–861.
- [25] Zhang, Q.; Linnemann, T.V.; Schreiber, L.; Bartels, D. The Role of Transketolase and Octulose in the Resurrection Plant *Craterostigma Plantagineum*. *Journal of Experimental Botany*, **2016**, *67*, 3551–3559.
- [26] Hricovíniová, Z.; Hricovíni, M.; Petruš, L. Stereospecific Synthesis of D-Glycero-D-Ido-Oct-2-Ulose. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, **2001**, *132*, 731–737.
- [27] Hailes, H.C.; Rother, D.; Müller, M.; Westphal, R.; Ward, J.M.; Pleiss, J.; Vogel, C.; Pohl, M. Engineering Stereoselectivity of ThDP-Dependent Enzymes. *FEBS Journal*, **2013**, *280*, 6374–6394.
- [28] Schenk, G.; Duggleby, R.G.; Nixon, P.F. Properties and Functions of the Thiamin Diphosphate Dependent Enzyme Transketolase. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **1998**, *30*, 1297–1318.
- [29] Malandrinou, G.; Louloudi, M.; Hadjiladis, N. Thiamine Models and Perspectives on the Mechanism of Action of Thiamine-Dependent Enzymes. *Chemical Society Reviews*, **2006**, *35*, 684.
- [30] Frank, R.A.W.; Leeper, F.J.; Luisi, B.F. Structure, Mechanism and Catalytic Duality of Thiamine-Dependent Enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2007**, *64*, 892–905.
- [31] Breslow, R. On the Mechanism of Thiamine Action. IV. ¹ Evidence from Studies on Model Systems. *Journal of the American Chemical Society*, **1958**, *80*, 3719–3726.
- [32] Pohl, M. A New Perspective on Thiamine Catalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, **2004**, *15*, 335–342.
- [33] Muller, Y.A.; Lindqvist, Y.; Furey, W.; Schulz, G.E.; Jordan, F.; Schneider, G. A Thiamin Diphosphate Binding Fold Revealed by Comparison of the Crystal Structures of Transketolase, Pyruvate Oxidase and Pyruvate Decarboxylase. *Structure*, **1993**, *1*, 95–103.
- [34] Costelloe, S.J.; Ward, J.M.; Dalby, P.A. Evolutionary Analysis of the TPP-Dependent Enzyme Family. *Journal of Molecular Evolution*, **2008**, *66*, 36–49.
- [35] Hawkins, C.F.; Borges, A.; Perham, R.N. A Common Structural Motif in Thiamin Pyrophosphate-Binding Enzymes. *FEBS Lett.*, **1989**, *255*, 77–82.

- [36] Widmann, M.; Radloff, R.; Pleiss, J. The Thiamine Diphosphate Dependent Enzyme Engineering Database: A Tool for the Systematic Analysis of Sequence and Structure Relations. *BMC Biochemistry*, **2010**, *11*, 9.
- [37] Sprenger, G.A.; Pohl, M. Synthetic Potential of Thiamin Diphosphate-Dependent Enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **1999**, *6*, 145–159.
- [38] Müller, M.; Gocke, D.; Pohl, M. Thiamin Diphosphate in Biological Chemistry: Exploitation of Diverse Thiamin Diphosphate-Dependent Enzymes for Asymmetric Chemoenzymatic Synthesis. *FEBS Journal*, **2009**, *276*, 2894–2904.
- [39] McCool, B.A.; Plonk, S.G.; Martin, P.R.; Singleton, C.K. Cloning of Human Transketolase cDNAs and Comparison of the Nucleotide Sequence of the Coding Region in Wernicke-Korsakoff and Non-Wernicke-Korsakoff Individuals. *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 1397–1404.
- [40] Sheu, K.F.; Clarke, D.D.; Kim, Y.T.; Blass, J.P.; Harding, B.J.; DeCicco, J. Studies of Transketolase Abnormality in Alzheimer's Disease. *Arch. Neurol.*, **1988**, *45*, 841–845.
- [41] Gibson, G.E.; Sheu, K.F.; Blass, J.P.; Baker, A.; Carlson, K.C.; Harding, B.; Perrino, P. Reduced Activities of Thiamine-Dependent Enzymes in the Brains and Peripheral Tissues of Patients with Alzheimer's Disease. *Arch. Neurol.*, **1988**, *45*, 836–840.
- [42] Thornalley, P.J.; Jahan, I.; Ng, R. Suppression of the Accumulation of Triosephosphates and Increased Formation of Methylglyoxal in Human Red Blood Cells during Hyperglycaemia by Thiamine in Vitro. *J. Biochem.*, **2001**, *129*, 543–549.
- [43] Cascante, M.; Centelles, J.J.; Veech, R.L.; Lee, W.-N.P.; Boros, L.G. Role of Thiamin (Vitamin B-1) and Transketolase in Tumor Cell Proliferation. *Nutrition and Cancer*, **2000**, *36*, 150–154.
- [44] Halma, M.; Doumèche, B.; Hecquet, L.; Prévot, V.; Mousty, C.; Charmantray, F. Thiamine Biosensor Based on Oxidative Trapping of Enzyme-Substrate Intermediate. *Biosensors and Bioelectronics*, **2017**, *87*, 850–857.
- [45] Flechner, A.; Dressen, U.; Westhoff, P.; Henze, K.; Schnarrenberger, C.; Martin, W. Molecular Characterization of Transketolase (EC 2.2.1.1) Active in the Calvin Cycle of Spinach Chloroplasts. *Plant Molecular Biology*, **1996**, *32*, 475–484.
- [46] Racker, E.; Haba, G.D.L.; Leder, I.G. THIAMINE PYROPHOSPHATE, A COENZYME OF TRANSKETOLASE. *Journal of the American Chemical Society*, **1953**, *75*, 1010–1011.
- [47] Schenk, G.; Duggleby, R.G.; Nixon, P.F. Properties and Functions of the Thiamin Diphosphate Dependent Enzyme Transketolase. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **1998**, *30*, 1297–1318.
- [48] Turner, N.J. Applications of Transketolases in Organic Synthesis. *Current opinion in biotechnology*, **2000**, *11*, 527–531.
- [49] Srere, P.A.; Cooper, J.R.; Klybas, V.; Racker, E. Xylulose-5-Phosphate, a New Intermediate in the Pentose Phosphate Cycle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1955**, *59*, 535–538.
- [50] Sprenger, G.A. Genetics of Pentose-Phosphate Pathway Enzymes of Escherichia Coli K-12. *Archives of Microbiology*, **1995**, *164*, 324–330.
- [51] Sundström, M.; Lindqvist, Y.; Schneider, G.; Hellman, U.; Ronne, H. Yeast TKL1 Gene Encodes a Transketolase That Is Required for Efficient Glycolysis and Biosynthesis of Aromatic Amino Acids. *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 24346–24352.
- [52] Schenk, G.; Layfield, R.; Candy, J.M.; Duggleby, R.G.; Nixon, P.F. Molecular Evolutionary Analysis of the Thiamine-Diphosphate-Dependent Enzyme, Transketolase. *Journal of Molecular Evolution*, **1997**, *44*, 552–572.

- [53] Demuynck, C.; Bolte, J.; Hecquet, L.; Samaki, H. Enzymes as Reagents in Organic Chemistry: Transketolase-Catalysed Synthesis of D-[1,2-¹³C₂]xylulose. *Carbohydrate Research*, **1990**, *206*, 79–85.
- [54] Horecker, B.L.; Hurwitz, J.; Smyrniotis, P.Z. The Role of Xylulose 5-Phosphate in the Transketolase Reaction. *J. Biol. Chem.*, **1956**, *223*, 1009–1019.
- [55] Kochetov, G.A. Transketolase from Yeast, Rat Liver, and Pig Liver. *Meth. Enzymol.*, **1982**, *90 Pt E*, 209–223.
- [56] Hobbs, G.R.; Lilly, M.D.; Turner, N.J.; Ward, J.M.; Willets, A.J.; Woodley, J.M. Enzyme-Catalysed Carbon-carbon Bond Formation: Use of Transketolase from *Escherichia Coli*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1993**, 165–166.
- [57] French, C.; Ward, J.M. Improved Production and Stability of *E. Coli* Recombinants Expressing Transketolase for Large Scale Biotransformation. *Biotechnology Letters*, **1995**, *17*, 247–252.
- [58] Sprenger, G.A.; Schörken, U.; Sprenger, G.; Sahn, H. Transketolase A of *Escherichia Coli* K12. Purification and Properties of the Enzyme from Recombinant Strains. *Eur. J. Biochem.*, **1995**, *230*, 525–532.
- [59] R. Hobbs, G.; K. Mitra, R.; P. Chauhan, R.; M. Woodley, J.; D. Lilly, M. Enzyme-Catalysed Carbon-Carbon Bond Formation: Large-Scale Production of *Escherichia Coli* Transketolase. *Journal of Biotechnology*, **1996**, *45*, 173–179.
- [60] Abdoul-Zabar, J.; Sorel, I.; Hélaine, V.; Charmantray, F.; Devamani, T.; Yi, D.; de Berardinis, V.; Louis, D.; Marlière, P.; Fessner, W.-D.; Hecquet, L. Thermostable Transketolase from *Geobacillus Stearothermophilus*: Characterization and Catalytic Properties. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2013**, *355*, 116–128.
- [61] Sundström, M.; Lindqvist, Y.; Schneider, G.; Hellman, U.; Ronne, H. Yeast TKL1 Gene Encodes a Transketolase That Is Required for Efficient Glycolysis and Biosynthesis of Aromatic Amino Acids. *Journal of Biological Chemistry*, **1993**, *268*, 24346–24352.
- [62] Schaaff-Gerstenschläger, I.; Mannhaupt, G.; Vetter, I.; Zimmermann, F.K.; Feldmann, H. TKL2, a Second Transketolase Gene of *Saccharomyces Cerevisiae*. Cloning, Sequence and Deletion Analysis of the Gene. *Eur. J. Biochem.*, **1993**, *217*, 487–492.
- [63] Wikner, C.; Meshalkina, L.; Nilsson, U.; Nikkola, M.; Lindqvist, Y.; Sundström, M.; Schneider, G. Analysis of an Invariant Cofactor-Protein Interaction in Thiamin Diphosphate-Dependent Enzymes by Site-Directed Mutagenesis. Glutamic Acid 418 in Transketolase Is Essential for Catalysis. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 32144–32150.
- [64] Iida, A.; Teshiba, S.; Mizobuchi, K. Identification and Characterization of the tktB Gene Encoding a Second Transketolase in *Escherichia Coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **1993**, *175*, 5375–5383.
- [65] Asztalos, P.; Parthier, C.; Golbik, R.; Kleinschmidt, M.; Hübner, G.; Weiss, M.S.; Friedemann, R.; Wille, G.; Tittmann, K. Strain and Near Attack Conformers in Enzymic Thiamin Catalysis: X-Ray Crystallographic Snapshots of Bacterial Transketolase in Covalent Complex with Donor Ketoses Xylulose 5-Phosphate and Fructose 6-Phosphate, and in Noncovalent Complex with Acceptor Aldose Ribose 5-Phosphate[†]. *Biochemistry*, **2007**, *46*, 12037–12052.
- [66] Yip, T.-T.; Hutchens, T.W. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. In: *Practical Protein Chromatography*; Humana Press: New Jersey, **1992**; Vol. 11, pp. 17–32.
- [67] Bornhorst, J.A.; Falke, J.J. [16] Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods in enzymology*, **2000**, *326*, 245–254.

- [68] Bloom, J.D.; Labthavikul, S.T.; Otey, C.R.; Arnold, F.H. Protein Stability Promotes Evolvability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2006**, *103*, 5869–5874.
- [69] Ivanov, M.V.; Lysenko, A.M.; Petrunyaka, V.V.; Ivanova, A.E.; Nazina, T.N.; Poltarau, A.B.; Tourova, T.P.; Belyaev, S.S.; Grigoryan, A.A.; Novikova, E.V.; Osipov, G.A. Taxonomic Study of Aerobic Thermophilic Bacilli: Descriptions of *Geobacillus Subterraneus* Gen. Nov., Sp. Nov. and *Geobacillus Uzenensis* Sp. Nov. from Petroleum Reservoirs and Transfer of *Bacillus Stearothermophilus*, *Bacillus Thermocatenulatus*, *Bacillus Thermoleovorans*, *Bacillus Kaustophilus*, *Bacillus Thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the New Combinations G. *Stearothermophilus*, G. Th. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2001**, *51*, 433–446.
- [70] Cheng, L.; Mu, W.; Jiang, B. Thermostable L-Arabinose Isomerase from *Bacillus Stearothermophilus* IAM 11001 for D-Tagatose Production: Gene Cloning, Purification and Characterisation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2010**, *90*, 1327–1333.
- [71] Garg, G.; Dhiman, S.S.; Mahajan, R.; Kaur, A.; Sharma, J. Bleach-Boosting Effect of Crude Xylanase from *Bacillus Stearothermophilus* SDX on Wheat Straw Pulp. *New Biotechnology*, **2011**, *28*, 58–64.
- [72] Nikkola, M.; Lindqvist, Y.; Schneider, G. Refined Structure of Transketolase from *Saccharomyces Cerevisiae* at 2.0 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, **1994**, *238*, 387–404.
- [73] Fiedler, E.; Thorell, S.; Sandalova, T.; Golbik, R.; König, S.; Schneider, G. Snapshot of a Key Intermediate in Enzymatic Thiamin Catalysis: Crystal Structure of the C⁻-Carbanion of (2,4-Dihydroxyethyl)-Thiamin Diphosphate in the Active Site of Transketolase from *Saccharomyces Cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2002**, *99*, 591–595.
- [74] Fullam, E.; Pojer, F.; Bergfors, T.; Jones, T.A.; Cole, S.T. Structure and Function of the Transketolase from *Mycobacterium Tuberculosis* and Comparison with the Human Enzyme. *Open Biology*, **2012**, *2*, 110026–110026.
- [75] Lukacik, P.; Lobley, C.M.C.; Bumann, M.; Arena de Souza, V.; Owens, R.J.; O'Toole, P.W.; Walsh, M.A. High-Resolution Structures of *Lactobacillus Salivarius* Transketolase in the Presence and Absence of Thiamine Pyrophosphate. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, **2015**, *71*, 1327–1334.
- [76] Pasquini, M.; Fermani, S.; Tedesco, D.; Sciabolini, C.; Crozet, P.; Naldi, M.; Henri, J.; Vothknecht, U.; Bertucci, C.; Lemaire, S.D.; Zaffagnini, M.; Francia, F. Structural Basis for the Magnesium-Dependent Activation of Transketolase from *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **2017**, *1861*, 2132–2145.
- [77] Lindqvist, Y.; Schneider, G.; Ermler, U.; Sundström, M. Three-Dimensional Structure of Transketolase, a Thiamine Diphosphate Dependent Enzyme, at 2.5 Å Resolution. *The EMBO journal*, **1992**, *11*, 2373.
- [78] Schneider, G.; Lindqvist, Y. Crystallography and Mutagenesis of Transketolase: Mechanistic Implications for Enzymatic Thiamin Catalysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1998**, *1385*, 387–398.

- [79] Lindqvist, Y.; Schneider, G. Thiamin Diphosphate Dependent Enzymes: Transketolase, Pyruvate Oxidase and Pyruvate Decarboxylase. *Current Opinion in Structural Biology*, **1993**, *3*, 896–901.
- [80] Meshalkina, L.; Nilsson, U.; Wikner, C.; Kostikowa, T.; Schneider, G. Examination of the Thiamin Diphosphate Binding Site in Yeast Transketolase by Site-Directed Mutagenesis. *Eur. J. Biochem.*, **1997**, *244*, 646–652.
- [81] Mitschke, L.; Parthier, C.; Schroder-Tittmann, K.; Coy, J.; Ludtke, S.; Tittmann, K. The Crystal Structure of Human Transketolase and New Insights into Its Mode of Action. *Journal of Biological Chemistry*, **2010**, *285*, 31559–31570.
- [82] Dyda, F.; Furey, W.; Swaminathan, S.; Sax, M.; Farrenkopf, B.; Jordan, F. Catalytic Centers in the Thiamin Diphosphate Dependent Enzyme Pyruvate Decarboxylase at 2.4-Å Resolution. *Biochemistry*, **1993**, *32*, 6165–6170.
- [83] Muller, Y.A.; Schulz, G.E. Structure of the Thiamine- and Flavin-Dependent Enzyme Pyruvate Oxidase. *Science*, **1993**, *259*, 965–967.
- [84] Wikner, C.; Meshalkina, L.; Nilsson, U.; Nikkola, M.; Lindqvist, Y.; Sundström, M.; Schneider, G. Analysis of an Invariant Cofactor-Protein Interaction in Thiamin Diphosphate-Dependent Enzymes by Site-Directed Mutagenesis. Glutamic Acid 418 in Transketolase Is Essential for Catalysis. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 32144–32150.
- [85] Sundström, M.; Lindqvist, Y.; Schneider, G. Three-Dimensional Structure of Apotransketolase Flexible Loops at the Active Site Enable Cofactor Binding. *FEBS letters*, **1992**, *313*, 229–231.
- [86] Nilsson, U.; Meshalkina, L.; Lindqvist, Y.; Schneider, G. Examination of Substrate Binding in Thiamin Diphosphate-Dependent Transketolase by Protein Crystallography and Site-Directed Mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 1864–1869.
- [87] Kochetov, G.A.; Solovjeva, O.N. Structure and Functioning Mechanism of Transketolase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, **2014**, *1844*, 1608–1618.
- [88] Wikner, C.; Nilsson, U.; Meshalkina, L.; Udekwu, C.; Lindqvist, Y.; Schneider, G. Identification of Catalytically Important Residues in Yeast Transketolase †. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 15643–15649.
- [89] Nilsson, U.; Hecquet, L.; Gefflaut, T.; Guerard, C.; Schneider, G. Asp477 Is a Determinant of the Enantioselectivity in Yeast Transketolase. *FEBS Lett.*, **1998**, *424*, 49–52.
- [90] Hübner, G.; Tittmann, K.; Killenberg-Jabs, M.; Schöffner, J.; Spinka, M.; Neef, H.; Kern, D.; Kern, G.; Schneider, G.; Wikner, C.; Ghisla, S. Activation of Thiamin Diphosphate in Enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1998**, *1385*, 221–228.
- [91] Meyer, D.; Neumann, P.; Ficner, R.; Tittmann, K. Observation of a Stable Carbene at the Active Site of a Thiamin Enzyme. *Nature Chemical Biology*, **2013**, *9*, 488–490.
- [92] Jordan, F. Semiempirical Calculations on the Electronic Structure and Preferred Conformation of Thiamine (Vitamin B1) and Thiamine Pyrophosphate (Coccarboxylase). *Journal of the American Chemical Society*, **1974**, *96*, 3623–3630.
- [93] Andrews, F.H.; McLeish, M.J. Using Site-Saturation Mutagenesis to Explore Mechanism and Substrate Specificity in Thiamin Diphosphate-Dependent Enzymes. *FEBS Journal*, **2013**, *280*, 6395–6411.
- [94] Nauton, L.; Hélaïne, V.; Théry, V.; Hecquet, L. Insights into the Thiamine Diphosphate Enzyme Activation Mechanism: Computational Model for Transketolase

- Using a Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Method. *Biochemistry*, **2016**, *55*, 2144–2152.
- [95] Ranoux, A.; Hanefeld, U. Improving Transketolase. *Topics in Catalysis*, **2013**, *56*, 750–764.
- [96] Gyamerah, M.; Willetts, A.J. Kinetics of Overexpressed Transketolase from *Escherichia Coli* JM 107/pQR 700. *Enzyme and Microbial Technology*, **1997**, *20*, 127–134.
- [97] Wikner, C.; Meshalkina, L.; Nilsson, U.; Bäckström, S.; Lindqvist, Y.; Schneider, G. His103 in Yeast Transketolase Is Required for Substrate Recognition and Catalysis. *Eur. J. Biochem.*, **1995**, *233*, 750–755.
- [98] Fiedler, E.; Golbik, R.; Schneider, G.; Tittmann, K.; Neef, H.; König, S.; Hubner, G. Examination of Donor Substrate Conversion in Yeast Transketolase. *Journal of Biological Chemistry*, **2001**, *276*, 16051–16058.
- [99] Hecquet, L.; Bolte, J.; Demuyneck, C. New Assays for Transketolase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **1993**, *57*, 2174–2176.
- [100] Villafranca, J.J.; Axelrod, B. Heptulose Synthesis from Nonphosphorylated Aldoses and Ketoses by Spinach Transketolase. *Journal of Biological Chemistry*, **1971**, *246*, 3126–3131.
- [101] Dickens, F.; Williamson, D.H. The Preparation and Properties of Lithium Hydroxypyruvate and Hydroxypyruvic Acid. *Biochem. J.*, **1958**, *68*, 74–81.
- [102] Wohlgemuth, R. C2-Ketol Elongation by Transketolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2009**, *61*, 23–29.
- [103] Bolte, J.; Demuyneck, C.; Constant, O.; Hecquet, L. Transferase Catalyzed Synthesis: Applications in Series of Aminoacids and Monosaccharides. In: *Microbial Reagents in Organic Synthesis*; Servi, S., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, **1992**; pp. 57–66.
- [104] Esakova, O.A.; Meshalkina, L.E.; Kochetov, G.A.; Golbik, R. Halogenated Pyruvate Derivatives as Substrates of Transketolase from *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biochemistry Mosc.*, **2009**, *74*, 1234–1238.
- [105] Besse, P.; Bolte, J.; Demuyneck, C.; Hecquet, L.; Veschambre, H. ChemInform Abstract: Recent Progress in the Formation of Asymmetric Carbons by the Bioconversion Methodology. *ChemInform*, **2010**, *30*, no-no.
- [106] Ranoux, A.; Karmee, S.K.; Jin, J.; Bhaduri, A.; Caiazza, A.; Arends, I.W.C.E.; Hanefeld, U. Enhancement of the Substrate Scope of Transketolase. *ChemBioChem*, **2012**, *13*, 1921–1931.
- [107] Solovjeva, O.N.; Kochetov, G.A. Inhibition of Transketolase by *p*-Hydroxyphenylpyruvate. *FEBS Letters*, **1999**, *462*, 246–248.
- [108] Datta, A.G.; Racker, E. Mechanism of Action of Transketolase. I. Properties of the Crystalline Yeast Enzyme. *J. Biol. Chem.*, **1961**, *236*, 617–623.
- [109] Bolte, J.; Demuyneck, C.; Samaki, H. Utilization of Enzymes in Organic Chemistry: Transketolase Catalyzed Synthesis of Ketoses. *Tetrahedron Letters*, **1987**, *28*, 5525–5528.
- [110] Wood, T. The Preparation Of Xylulose 5-Phosphate Using Transketolase. *Preparative Biochemistry*, **1973**, *3*, 509–515.
- [111] Schürken, U.; Sprenger, G.A. Thiamin-Dependent Enzymes as Catalysts in Chemoenzymatic Syntheses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1998**, *1385*, 229–243.

- [112] Kobori, Y.; Myles, D.C.; Whitesides, G.M. Substrate Specificity and Carbohydrate Synthesis Using Transketolase. *The Journal of Organic Chemistry*, **1992**, *57*, 5899–5907.
- [113] Dalmas, V.; Demuynck, C. Study of the Specificity of a Spinach Transketolase on Achiral Substrates. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, *4*, 2383–2388.
- [114] Demuynck, C.; Bolte, J.; Hecquet, L.; Dalmas, V. Enzyme-Catalyzed Synthesis of Carbohydrates: Synthetic Potential of Transketolase. *Tetrahedron Letters*, **1991**, *32*, 5085–5088.
- [115] Morris, K.G.; Smith, M.E.B.; Turner, N.J.; Lilly, M.D.; Mitra, R.K.; Woodley, J.M. Transketolase from *Escherichia Coli*: A Practical Procedure for Using the Biocatalyst for Asymmetric Carbon-Carbon Bond Synthesis. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, *7*, 2185–2188.
- [116] Kobori, Y.; Myles, D.C.; Whitesides, G.M. Substrate Specificity and Carbohydrate Synthesis Using Transketolase. *The Journal of Organic Chemistry*, **1992**, *57*, 5899–5907.
- [117] Effenberger, F.; Null, V.; Ziegler, T. Preparation of Optically Pure L-2-Hydroxyaldehydes with Yeast Transketolase. *Tetrahedron Letters*, **1992**, *33*, 5157–5160.
- [118] Hecquet, L.; Demuynck, C.; Schneider, G.; Bolte, J. Enzymatic Syntheses of Ketoses: Study and Modification of the Substrate Specificity of the Transketolase from *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2001**, *11*, 771–776.
- [119] André, C.; Guérard, C.; Hecquet, L.; Demuynck, C.; Bolte, J. Modified L-Threose and D-Erythrose as Substrates of Transketolase and Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase. Application to the Synthesis of New Heptulose Analogues. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **1998**, *5*, 459–466.
- [120] Cázares, A.; Galman, J.L.; Crago, L.G.; Smith, M.E.B.; Strafford, J.; Ríos-Solís, L.; Lye, G.J.; Dalby, P.A.; Hailes, H.C. Non- α -Hydroxylated Aldehydes with Evolved Transketolase Enzymes. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2010**, *8*, 1301.
- [121] Corbett, M.D.; Corbett, B.R. Effect of Ring Substituents on the Transketolase-Catalyzed Conversion of Nitroso Aromatics to Hydroxamic Acids. *Biochem. Pharmacol.*, **1986**, *35*, 3613–3621.
- [122] Yi, D.; Devamani, T.; Abdoul-Zabar, J.; Charmantray, F.; Helaine, V.; Hecquet, L.; Fessner, W.-D. A pH-Based High-Throughput Assay for Transketolase: Fingerprinting of Substrate Tolerance and Quantitative Kinetics. *ChemBioChem*, **2012**, *13*, 2290–2300.
- [123] Arnold, F.H. Directed Evolution: Creating Biocatalysts for the Future. *Chemical Engineering Science*, **1996**, *51*, 5091–5102.
- [124] Brakmann, S. Discovery of Superior Enzymes by Directed Molecular Evolution. *ChemBiochem*, **2001**, *2*, 865–871.
- [125] Behrens, G.A.; Hummel, A.; Padhi, S.K.; Schätzle, S.; Bornscheuer, U.T. Discovery and Protein Engineering of Biocatalysts for Organic Synthesis. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2011**, *353*, 2191–2215.
- [126] Reetz, M.T.; Zonta, A.; Schimossek, K.; Jaeger, K.-E.; Liebeton, K. Creation of Enantioselective Biocatalysts for Organic Chemistry by In Vitro Evolution. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **1997**, *36*, 2830–2832.

- [127] Kazlauskas, R.J. Quantitative Assay of Hydrolases for Activity and Selectivity Using Color Changes. In: *Enzyme Assays*; Reymond, J.-L., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, FRG, **2006**; pp. 15–39.
- [128] Reetz, M.T. Controlling the Enantioselectivity of Enzymes by Directed Evolution: Practical and Theoretical Ramifications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2004**, *101*, 5716–5722.
- [129] Leung, D.W., Chen, E. and Goeddel, D.V. A Method for Random Mutagenesis of a Defined DNA Segment Using a Modified Polymerase Chain Reaction. *Technique*, **1989**, *1*: 11-15.
- [130] Cadwell, R.C.; Joyce, G.F. Randomization of Genes by PCR Mutagenesis. *Genome Research*, **1992**, *2*, 28–33.
- [131] Tindall, K.R.; Kunkel, T.A. Fidelity of DNA Synthesis by the Thermus Aquaticus DNA Polymerase. *Biochemistry*, **1988**, *27*, 6008–6013.
- [132] Kim, Y.-G.; Maas, S. Multiple Site-Directed Mutagenesis in Vitro. *Methods Mol. Biol.*, **2002**, *182*, 29–36.
- [133] Kirsch, R.D.; Joly, E. An Improved PCR-Mutagenesis Strategy for Two-Site Mutagenesis or Sequence Swapping between Related Genes. *Nucleic Acids Res.*, **1998**, *26*, 1848–1850.
- [134] Chica, R.A.; Doucet, N.; Pelletier, J.N. Semi-Rational Approaches to Engineering Enzyme Activity: Combining the Benefits of Directed Evolution and Rational Design. *Current Opinion in Biotechnology*, **2005**, *16*, 378–384.
- [135] Patrick, W.M.; Firth, A.E. Strategies and Computational Tools for Improving Randomized Protein Libraries. *Biomolecular Engineering*, **2005**, *22*, 105–112.
- [136] Cedrone, F.; Ménez, A.; Quéméneur, E. Tailoring New Enzyme Functions by Rational Redesign. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2000**, *10*, 405–410.
- [137] Kotzia, G.A.; Labrou, N.E. Engineering Thermal Stability of L-Asparaginase by in Vitro Directed Evolution: Engineering Thermal Stability of L-Asparaginase. *FEBS Journal*, **2009**, *276*, 1750–1761.
- [138] Andreadeli, A.; Platis, D.; Tishkov, V.; Popov, V.; Labrou, N.E. Structure-Guided Alteration of Coenzyme Specificity of Formate Dehydrogenase by Saturation Mutagenesis to Enable Efficient Utilization of NADP⁺: Engineering Coenzyme Specificity of CboFDH. *FEBS Journal*, **2008**, *275*, 3859–3869.
- [139] Smith, M.E.B.; Hibbert, E.G.; Jones, A.B.; Dalby, P.A.; Hailes, H.C. Enhancing and Reversing the Stereoselectivity of *Escherichia Coli* Transketolase via Single-Point Mutations. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2008**, *350*, 2631–2638.
- [140] Reetz, M.T.; Bocola, M.; Carballeira, J.D.; Zha, D.; Vogel, A. Expanding the Range of Substrate Acceptance of Enzymes: Combinatorial Active-Site Saturation Test. *Angewandte Chemie International Edition*, **2005**, *44*, 4192–4196.
- [141] Payongsri, P.; Steadman, D.; Strafford, J.; MacMurray, A.; Hailes, H.C.; Dalby, P.A. Rational Substrate and Enzyme Engineering of Transketolase for Aromatics. *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 9021–9029.
- [142] Payongsri, P.; Steadman, D.; Hailes, H.C.; Dalby, P.A. Second Generation Engineering of Transketolase for Polar Aromatic Aldehyde Substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, **2015**, *71*, 45–52.
- [143] Reetz, M.T.; Wang, L.-W.; Bocola, M. Directed Evolution of Enantioselective Enzymes: Iterative Cycles of CASTing for Probing Protein-Sequence Space. *Angewandte Chemie International Edition*, **2006**, *45*, 1236–1241.

- [144] Reetz, M.T.; Prasad, S.; Carballeira, J.D.; Gumulya, Y.; Bocola, M. Iterative Saturation Mutagenesis Accelerates Laboratory Evolution of Enzyme Stereoselectivity: Rigorous Comparison with Traditional Methods. *Journal of the American Chemical Society*, **2010**, *132*, 9144–9152.
- [145] Acevedo-Rocha, C.G.; Hoebenreich, S.; Reetz, M.T. Iterative Saturation Mutagenesis: A Powerful Approach to Engineer Proteins by Systematically Simulating Darwinian Evolution. In: *Directed Evolution Library Creation*; Gillam, E.M.J.; Copp, J.N.; Ackerley, D., Eds.; Springer New York: New York, NY, **2014**; Vol. 1179, pp. 103–128.
- [146] Reetz, M.T.; Kahakeaw, D.; Lohmer, R. Addressing the Numbers Problem in Directed Evolution. *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 1797–1804.
- [147] Reetz, M.T.; Bocola, M.; Carballeira, J.D.; Zha, D.; Vogel, A. Expanding the Range of Substrate Acceptance of Enzymes: Combinatorial Active-Site Saturation Test. *Angewandte Chemie International Edition*, **2005**, *44*, 4192–4196.
- [148] Reetz, M.T.; Carballeira, J.D. Iterative Saturation Mutagenesis (ISM) for Rapid Directed Evolution of Functional Enzymes. *Nature Protocols*, **2007**, *2*, 891–903.
- [149] Bassegoda, A.; Cesarini, S.; Diaz, P. LIPASE IMPROVEMENT: GOALS AND STRATEGIES. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **2012**, *2*, e201209005.
- [150] Hibbert, E.G.; Senussi, T.; Costelloe, S.J.; Lei, W.; Smith, M.E.B.; Ward, J.M.; Hailes, H.C.; Dalby, P.A. Directed Evolution of Transketolase Activity on Non-Phosphorylated Substrates. *Journal of Biotechnology*, **2007**, *131*, 425–432.
- [151] Leemhuis, H.; Kelly, R.M.; Dijkhuizen, L. Directed Evolution of Enzymes: Library Screening Strategies. *IUBMB Life*, **2009**, *61*, 222–228.
- [152] Wahler, D.; Reymond, J.-L. Novel Methods for Biocatalyst Screening. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2001**, *5*, 152–158.
- [153] Brakmann, S. Discovery of Superior Enzymes by Directed Molecular Evolution. *Chembiochem*, **2001**, *2*, 865–871.
- [154] Taylor, S.V.; Kast, P.; Hilvert, D. Investigating and Engineering Enzymes by Genetic Selection. *Angewandte Chemie International Edition*, **2001**, *40*, 3310–3335.
- [155] Boersma, Y.L.; Dröge, M.J.; van der Sloot, A.M.; Pijning, T.; Cool, R.H.; Dijkstra, B.W.; Quax, W.J. A Novel Genetic Selection System for Improved Enantioselectivity of *Bacillus Subtilis* Lipase A. *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 1110–1115.
- [156] Lee, S.-J.; Kang, H.-Y.; Lee, Y. High-Throughput Screening Methods for Selecting L-Threonine Aldolases with Improved Activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2003**, *26*, 265–272.
- [157] You, L.; Arnold, F.H. Directed Evolution of Subtilisin E in *Bacillus Subtilis* to Enhance Total Activity in Aqueous Dimethylformamide. *Protein Eng.*, **1996**, *9*, 77–83.
- [158] Brustad, E.M.; Arnold, F.H. Optimizing Non-Natural Protein Function with Directed Evolution. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2011**, *15*, 201–210.
- [159] Fernandes, P.B. Technological Advances in High-Throughput Screening. *Curr Opin Chem Biol*, **1998**, *2*, 597–603.
- [160] Sayer, C.; Bommer, M.; Isupov, M.; Ward, J.; Littlechild, J. Crystal Structure and Substrate Specificity of the Thermophilic Serine:pyruvate Aminotransferase from *Sulfolobus Solfataricus*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, **2012**, *68*, 763–772.
- [161] Reetz, M.T.; Eipper, A.; Tielmann, P.; Mynott, R. A Practical NMR-Based High-Throughput Assay for Screening Enantioselective Catalysts and Biocatalysts. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2002**, *344*, 1008–1016.

- [162] Dean, K.E.S.; Klein, G.; Renaudet, O.; Reymond, J.-L. A Green Fluorescent Chemosensor for Amino Acids Provides a Versatile High-Throughput Screening (HTS) Assay for Proteases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2003**, *13*, 1653–1656.
- [163] Klein, G.; Reymond, J.-L. An Enantioselective Fluorimetric Assay for Alcohol Dehydrogenases Using Albumin-Catalyzed β -Elimination of Umbelliferone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **1998**, *8*, 1113–1116.
- [164] Mayer, K.M.; Arnold, F.H. A Colorimetric Assay to Quantify Dehydrogenase Activity in Crude Cell Lysates. *Journal of Biomolecular Screening*, **2002**, *7*, 135–140.
- [165] Simon, G.; Bouzon, M.; Charmantray, F.; Hélaïne, V.; Légeret, B.; Marlière, P.; Hecquet, L. Amino Acid Precursors for the Detection of Transketolase Activity in Escherichia Coli Auxotrophs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2009**, *19*, 3767–3770.
- [166] Simon, G.; Eljezi, T.; Legeret, B.; Charmantray, F.; Castillo, J.A.; Guérard-Hélaïne, C.; Lemaire, M.; Bouzon, M.; Marlière, P.; Hélaïne, V.; Hecquet, L. Synthesis of Specially Designed Probes to Broaden Transketolase Scope. *ChemCatChem*, **2013**, *5*, 784–795.
- [167] Sevestre, A.; Hélaïne, V.; Guyot, G.; Martin, C.; Hecquet, L. A Fluorogenic Assay for Transketolase from Saccharomyces Cerevisiae. *Tetrahedron Letters*, **2003**, *44*, 827–830.
- [168] Sevestre, A.; Charmantray, F.; Hélaïne, V.; Lásiková, A.; Hecquet, L. Synthesis of Stereochemical Probes for New Fluorogenic Assays for Yeast Transketolase Variants. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 3969–3976.
- [169] Charmantray, F.; Légeret, B.; Hélaïne, V.; Hecquet, L. Fluorogenic Substrates for the Screening Assay of Transketolase through Beta-Elimination of umbelliferone—Development, Scope and Limitations. *Journal of Biotechnology*, **2010**, *145*, 359–366.
- [170] Smith, M.E.B.; Kaulmann, U.; Ward, J.M.; Hailes, H.C. A Colorimetric Assay for Screening Transketolase Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2006**, *14*, 7062–7065.
- [171] Subrizi, F.; Cárdenas-Fernández, M.; Lye, G.J.; Ward, J.M.; Dalby, P.A.; Sheppard, T.D.; Hailes, H.C. Transketolase Catalysed Upgrading of α -Arabinose: The One-Step Stereoselective Synthesis of α -Gluco-Heptulose. *Green Chem.*, **2016**, *18*, 3158–3165.
- [172] Seliwanoff, T. Notiz über eine Fruchtzuckerreaction. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **1887**, *20*, 181–182.
- [173] Chapman, E.; Wong, C.-H. A pH Sensitive Colorimetric Assay for the High-Throughput Screening of Enzyme Inhibitors and Substrates: A Case Study Using Kinases. *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 551–555.
- [174] Grognum, J.; Reymond, J.-L. Enzyme Activity Fingerprinting Methods for Hydrolases. In: *Protein Science Encyclopedia*; Fersht, A.R., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, **2008**.
- [175] Yi, D.; Saravanan, T.; Devamani, T.; Charmantray, F.; Hecquet, L.; Fessner, W.-D. A Thermostable Transketolase Evolved for Aliphatic Aldehyde Acceptors. *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 480–483.
- [176] Hibbert, E.; Senussi, T.; Smith, M.; Costelloe, S.; Ward, J.; Hailes, H.; Dalby, P. Directed Evolution of Transketolase Substrate Specificity towards an Aliphatic Aldehyde. *Journal of Biotechnology*, **2008**, *134*, 240–245.

- [177] Strafford, J.; Payongsri, P.; Hibbert, E.G.; Morris, P.; Batth, S.S.; Steadman, D.; Smith, M.E.B.; Ward, J.M.; Hailes, H.C.; Dalby, P.A. Directed Evolution to Re-Adapt a Co-Evolved Network within an Enzyme. *Journal of Biotechnology*, **2012**, *157*, 237–245.
- [178] Affaticati, P.E.; Dai, S.-B.; Payongsri, P.; Hailes, H.C.; Tittmann, K.; Dalby, P.A. Structural Analysis of an Evolved Transketolase Reveals Divergent Binding Modes. *Scientific Reports*, **2016**, *6*.
- [179] Galman, J.L.; Steadman, D.; Bacon, S.; Morris, P.; Smith, M.E.B.; Ward, J.M.; Dalby, P.A.; Hailes, H.C. A, α' -Dihydroxyketone Formation Using Aromatic and Heteroaromatic Aldehydes with Evolved Transketolase Enzymes. *Chemical Communications*, **2010**, *46*, 7608.
- [180] Morris, P.; Rios-Solis, L.; García-Arazola, R.; Lye, G.J.; Dalby, P.A. Impact of Cofactor-Binding Loop Mutations on Thermotolerance and Activity of *E. Coli* Transketolase. *Enzyme and Microbial Technology*, **2016**, *89*, 85–91.
- [181] Affaticati, P.E.; Dai, S.-B.; Payongsri, P.; Hailes, H.C.; Tittmann, K.; Dalby, P.A. Structural Analysis of an Evolved Transketolase Reveals Divergent Binding Modes. *Scientific Reports*, **2016**, *6*.
- [182] Ranoux, A.; Arends, I.W.C.E.; Hanefeld, U. Development of Screening Methods for Transketolase Activity and Substrate Scope. *Tetrahedron Letters*, **2012**, *53*, 790–793.
- [183] Board, M.; Colquhoun, A.; Newsholme, E.A. High Km Glucose-Phosphorylating (Glucokinase) Activities in a Range of Tumor Cell Lines and Inhibition of Rates of Tumor Growth by the Specific Enzyme Inhibitor Mannoheptulose. *Cancer research*, **1995**, *55*, 3278–3285.
- [184] Iino, H.; Naitow, H.; Nakamura, Y.; Nakagawa, N.; Agari, Y.; Kanagawa, M.; Ebihara, A.; Shinkai, A.; Sugahara, M.; Miyano, M.; Kamiya, N.; Yokoyama, S.; Hirotsu, K.; Kuramitsu, S. Crystallization Screening Test for the Whole-Cell Project on *Thermus Thermophilus* HB8. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, **2008**, *64*, 487–491.
- [185] Charmantray, F.; Hélaine, V.; Legeret, B.; Hecquet, L. Preparative Scale Enzymatic Synthesis of D-Sedoheptulose-7-Phosphate from β -Hydroxypyruvate and D-Ribose-5-Phosphate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2009**, *57*, 6–9.
- [186] Dalmas, V.; Demuynck, C. An Efficient Synthesis of Sedoheptulose Catalyzed by Spinach Transketolase. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, *4*, 1169–1172.
- [187] Witte, J.F.; McClard, R.W. Synthesis of a Potent α -Glucosidase Inhibitor Epimeric to Fr 900483. *Tetrahedron Letters*, **1991**, *32*, 3927–3930.
- [188] Evans, S.V.; Fellows, L.E.; Shing, T.K.M.; Fleet, G.W.J. Glycosidase Inhibition by Plant Alkaloids Which Are Structural Analogues of Monosaccharides. *Phytochemistry*, **1985**, *24*, 1953–1955.
- [189] Humphrey, A.J.; Parsons, S.F.; Smith, M.E.; Turner, N.J. Synthesis of a Novel N-Hydroxypyrrrolidine Using Enzyme Catalysed Asymmetric Carbon–carbon Bond Synthesis. *Tetrahedron Letters*, **2000**, *41*, 4481–4485.
- [190] Effenberger, F.; Null, V. Eine neue, effiziente Synthese von Fagomin (Enzymkatalysierte Reaktionen; 13), **2009**.
- [191] Ziegler, T.; Straub, A.; Effenberger, F. Enzyme-Catalyzed Synthesis of 1-Deoxymannojirimycin, 1-Deoxyojirimycin, and 1,4-Dideoxy-1,4-Imino-D-Arabinitol. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **1988**, *27*, 716–717.

- [192] Hecquet, L.; Lemaire, M.; Bolte, J.; Demuynck, C. Chemo-Enzymatic Synthesis of Precursors of Fagomine and 1,4-Dideoxy-1,4-Imino-D-Arabinitol. *Tetrahedron Letters*, **1994**, *35*, 8791–8794.
- [193] Myles, D.C.; Andrusis, P.J.; Whitesides, G.M. A Transketolase-Based Synthesis of (+)-Exo-Brevicomine. *Tetrahedron Letters*, **1991**, *32*, 4835–4838.
- [194] Ricca, E.; Brucher, B.; Schrittwieser, J.H. Multi-Enzymatic Cascade Reactions: Overview and Perspectives. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2011**, *353*, 2239–2262.
- [195] Oroz-Guinea, I.; García-Junceda, E. Enzyme Catalysed Tandem Reactions. *Curr Opin Chem Biol*, **2013**, *17*, 236–249.
- [196] Robina, I.; Vogel, P. The Synthesis of Disaccharides, Oligosaccharides and Analogues Containing Thiosugars. *Current Organic Chemistry*, **2002**, *6*, 471–491.
- [197] Charmantray, F.; Dellis, P.; Hélaine, V.; Samreth, S.; Hecquet, L. Chemoenzymatic Synthesis of 5-Thio-D-Xylopyranose. *European Journal of Organic Chemistry*, **2006**, *2006*, 5526–5532.
- [198] Kwon, S.J.; Ko, S.Y. Synthesis of Statine Employing a General Syn-Amino Alcohol Building Block. *Tetrahedron Letters*, **2002**, *43*, 639–641.
- [199] Kaldor, S.W.; Kalish, V.J.; Davies, J.F.; Shetty, B.V.; Fritz, J.E.; Appelt, K.; Burgess, J.A.; Campanale, K.M.; Chirgadze, N.Y.; Clawson, D.K.; Dressman, B.A.; Hatch, S.D.; Khalil, D.A.; Kosa, M.B.; Lubbehusen, P.P.; Muesing, M.A.; Patick, A.K.; Reich, S.H.; Su, K.S.; Tatlock, J.H. Viracept (Nelfinavir Mesylate, AG1343): A Potent, Orally Bioavailable Inhibitor of HIV-1 Protease. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1997**, *40*, 3979–3985.
- [200] Delle Monache, G.; Misiti, D.; Zappia, G. A Stereocontrolled Synthesis of (–)-Detoxinine from L-Ascorbic Acid. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 2961–2973.
- [201] Contestabile, R.; John, R.A. The Mechanism of High-Yielding Chiral Syntheses Catalysed by Wild-Type and Mutant Forms of Aspartate Aminotransferase. *European Journal of Biochemistry*, **1996**, *240*, 150–155.
- [202] Ingram, C.U.; Bommer, M.; Smith, M.E.B.; Dalby, P.A.; Ward, J.M.; Hailes, H.C.; Lye, G.J. One-Pot Synthesis of Amino-Alcohols Using a de-Novo Transketolase and β -Alanine: Pyruvate Transaminase Pathway in *Escherichia Coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, **2007**, *96*, 559–569.
- [203] Rios-Solis, L.; Halim, M.; Cázares, A.; Morris, P.; Ward, J.M.; Hailes, H.C.; Dalby, P.A.; Baganz, F.; Lye, G.J. A Toolbox Approach for the Rapid Evaluation of Multi-Step Enzymatic Syntheses Comprising a “mix and Match” *E. Coli* Expression System with Microscale Experimentation. *Biocatalysis and Biotransformation*, **2011**, *29*, 192–203.
- [204] Rios-Solis, L.; Morris, P.; Grant, C.; Odeleye, A.O.O.; Hailes, H.C.; Ward, J.M.; Dalby, P.A.; Baganz, F.; Lye, G.J. Modelling and Optimisation of the One-Pot, Multi-Enzymatic Synthesis of Chiral Amino-Alcohols Based on Microscale Kinetic Parameter Determination. *Chemical Engineering Science*, **2015**, *122*, 360–372.
- [205] Smith, M.E.B.; Chen, B.H.; Hibbert, E.G.; Kaulmann, U.; Smithies, K.; Galman, J.L.; Baganz, F.; Dalby, P.A.; Hailes, H.C.; Lye, G.J.; Ward, J.M.; Woodley, J.M.; Micheletti, M. A Multidisciplinary Approach Toward the Rapid and Preparative-Scale Biocatalytic Synthesis of Chiral Amino Alcohols: A Concise Transketolase-/ ω -Transaminase-Mediated Synthesis of (2 S , 3 S)-2-Aminopentane-1,3-Diol. *Organic Process Research & Development*, **2010**, *14*, 99–107.
- [206] Guérard, C.; Alphand, V.; Archelas, A.; Demuynck, C.; Hecquet, L.; Furstoss, R.; Bolte, J. Transketolase-Mediated Synthesis of 4-Deoxy-D-Fructose 6-Phosphate by

- Epoxide Hydrolase-Catalysed Resolution of 1,1-Diethoxy-3,4-Epoxybutane. *European Journal of Organic Chemistry*, **1999**, 1999, 3399–3402.
- [207] Zimmermann, F.T.; Schneider, A.; Schörken, U.; Sprenger, G.A.; Fessner, W.-D. Efficient Multi-Enzymatic Synthesis of D-Xylulose 5-Phosphate. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 1643–1646.
- [208] Shaeri, J.; Wright, I.; Rathbone, E.B.; Wohlgemuth, R.; Woodley, J.M. Characterization of Enzymatic D-Xylulose 5-Phosphate Synthesis. *Biotechnology and Bioengineering*, **2008**, 101, 761–767.
- [209] Hecquet, L.; Bolte, J.; Demuynck, C. Enzymatic Synthesis of “natural-Labeled” 6-Deoxy-L-Sorbose Precursor of an Important Food Flavor. *Tetrahedron*, **1996**, 52, 8223–8232.
- [210] Villegas-Torres, M.F.; Martinez-Torres, R.J.; Cázares-Körner, A.; Hailes, H.; Baganz, F.; Ward, J. Multi-Step Biocatalytic Strategies for Chiral Amino Alcohol Synthesis. *Enzyme and Microbial Technology*, **2015**, 81, 23–30.
- [211] Hricovíniová, Z.; Hricovíni, M.; Petruš, L. Molybdcic Acid-Catalysed Isomerization of D-Ribulose and D-Xylulose to the Corresponding 2- C -(Hydroxymethyl)-D-Tetroses. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **2000**, 19, 827–836.
- [212] Demuynck, C.; Bolte, J.; Hecquet, L.; Samaki, H. Enzymes as Reagents in Organic Chemistry: Transketolase-Catalysed Synthesis of D-[1,2-¹³C₂]xylulose. *Carbohydrate Research*, **1990**, 206, 79–85.
- [213] Lee, S.; Kirschning, A.; Müller, M.; Way, C.; Floss, H.G. Enzymatic Synthesis of - and Sedoheptulose 7-Phosphate and Ido-Heptulose 7-Phosphate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **1999**, 6, 369–377.
- [214] Kochetov, G.A.; Solovieva, O.N. Active Subunits of Transketolase from Baker’s Yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1978**, 84, 515–519.
- [215] Reimer, L.M.; Conley, D.L.; Pompliano, D.L.; Frost, J.W. Construction of an Enzyme-Targeted Organophosphonate Using Immobilized Enzyme and Whole-Cell Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, **1986**, 108, 8010–8015.
- [216] Brocklebank, S.P.; Mitra, R.K.; Woodley, J.M.; Lilly, M.D. Carbon-Carbon Bond Synthesis.: Preparation and Use of Immobilized Transketolase. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1996**, 799, 729–736.
- [217] Brocklebank, S.; Woodley, J.M.; Lilly, M.D. Immobilised Transketolase for Carbon-carbon Bond Synthesis: Biocatalyst Stability. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **1999**, 7, 223–231.
- [218] Bhattacharya, S.; Schiavone, M.; Gomes, J.; Bhattacharya, S.K. Cascade of Bioreactors in Series for Conversion of 3-Phospho-D-Glycerate into D-Ribulose-1,5-Bisphosphate: Kinetic Parameters of Enzymes and Operation Variables. *Journal of Biotechnology*, **2004**, 111, 203–217.
- [219] Abdul Halim, A.; Szita, N.; Baganz, F. Characterization and Multi-Step Transketolase- ω -Transaminase Bioconversions in an Immobilized Enzyme Microreactor (IEMR) with Packed Tube. *Journal of Biotechnology*, **2013**, 168, 567–575.
- [220] Matosevic, S.; Lye, G.J.; Baganz, F. Immobilised Enzyme Microreactor for Screening of Multi-Step Bioconversions: Characterisation of a de Novo Transketolase- ω -Transaminase Pathway to Synthesise Chiral Amino Alcohols. *Journal of Biotechnology*, **2011**, 155, 320–329.
- [221] Matosevic, S.; Lye, G.J.; Baganz, F. Design and Characterization of a Prototype Enzyme Microreactor: Quantification of Immobilized Transketolase Kinetics. *Biotechnology Progress*, **2009**, NA-NA.

- [222] Fernandes, F.V. Towards the Automated High-Throughput Characterization of Immobilized Enzymes.
- [223] Benaissi, K.; Hélaine, V.; Prévot, V.; Forano, C.; Hecquet, L. Efficient Immobilization of Yeast Transketolase on Layered Double Hydroxides and Application for Ketose Synthesis. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2011**, *353*, 1497–1509.
- [224] Touisni, N.; Charmantray, F.; Hélaine, V.; Forano, C.; Hecquet, L.; Mousty, C. Optimized Immobilization of Transketolase from *E. Coli* in MgAl-Layered Double Hydroxides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2013**, *112*, 452–459.
- [225] Ali, G.; Moreau, T.; Forano, C.; Mousty, C.; Prévot, V.; Charmantray, F.; Hecquet, L. Chiral Polyol Synthesis Catalyzed by a Thermostable Transketolase Immobilized on Layered Double Hydroxides in Ionic Liquids. *ChemCatChem*, **2015**, *7*, 3163–3170.
- [226] Pascu, O.; Marre, S.; Cacciuttolo, B.; Ali, G.; Hecquet, L.; Pucheault, M.; Prévot, V.; Aymonier, C. Instant One-Pot Preparation of Functional Layered Double Hydroxides (LDHs) via a Continuous Hydrothermal Approach. *ChemNanoMat*, **2017**.
- [227] Cowan, D.A. Thermophilic Proteins: Stability and Function in Aqueous and Organic Solvents. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.*, **1997**, *118*, 429–438.
- [228] Juliane Abdoul-Zabar. *Thèse de Doctorat - Etude de La Transcétolase de Geobacillus Stearothermophilus et Modification de Son Énantiosélectivité Par Ingénierie Enzymatique*, **2014**.
- [229] Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, *227*, 680–685.
- [230] Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*, **1976**, *72*, 248–254.
- [231] Nadia Touisni. *Thèse de Doctorat - Développement de Biocapteurs Ampérométriques Pour La Détermination de L'activité de La Transcétolase et Pour La Détection D'inhibiteurs de Cette Enzyme*, **2013**.
- [232] Heinrich, P.C.; Steffen, H.; Janser, P.; Wiss, O. Studies on the Reconstitution of Apotransketolase with Thiamine Pyrophosphate and Analogs of the Coenzyme. *European Journal of Biochemistry*, **1972**, *30*, 533–541.
- [233] Srere, P.; Cooper, J.R.; Tabachnick, M.; Racker, E. The Oxidative Pentose Phosphate Cycle. I. Preparation of Substrates and Enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1958**, *74*, 295–305.
- [234] Saravanan, T.; Junker, S.; Kickstein, M.; Hein, S.; Link, M.-K.; Ranglack, J.; Witt, S.; Lorillière, M.; Hecquet, L.; Fessner, W.-D. Donor Promiscuity of a Thermostable Transketolase by Directed Evolution: Efficient Complementation of 1-Deoxy- d-Xylulose-5-Phosphate Synthase Activity. *Angewandte Chemie International Edition*, **2017**, *56*, 5358–5362.
- [235] Pinsolle, A.; Charmantray, F.; Hecquet, L.; Sarrazin, F. Droplet Microfluidics for Kinetic Study of Transketolase. *Biomicrofluidics*, **2016**, *10*, 064103.
- [236] Gyamerah, M.; Willetts, A.J. Kinetics of Overexpressed Transketolase from *Escherichia Coli* JM 107/pQR 700. *Enzyme and Microbial Technology*, **1997**, *20*, 127–134.
- [237] Abdoul Zabar, J.; Lorillière, M.; Yi, D.; Saravanan, T.; Devamani, T.; Nauton, L.; Charmantray, F.; Hélaine, V.; Fessner, W.-D.; Hecquet, L. Engineering a Thermostable Transketolase for Unnatural Conversion of (2 S)-Hydroxyaldehydes. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2015**, *357*, 1715–1720.

- [238] Saravanan, T.; Reif, M.-L.; Yi, D.; Lorillière, M.; Charmantray, F.; Hecquet, L.; Fessner, W.-D. Engineering a Thermostable Transketolase for Arylated Substrates. *Green Chem.*, **2017**, *19*, 481–489.
- [239] Zhou, C.; Saravanan, T.; Lorillière, M.; Wei, D.; Charmantray, F.; Hecquet, L.; Fessner, W.-D.; Yi, D. Second-Generation Engineering of a Thermostable Transketolase (TK_{Gst}) for Aliphatic Aldehyde Acceptors with Either Improved or Reversed Stereoselectivity. *ChemBioChem*, **2017**, *18*, 455–459.
- [240] Muniruzzaman, S.; McIntosh, M.; Hossain, A.; Izumori, K.; Bhattacharjee, P.S. A Novel Rare Sugar Inhibitor of Murine Herpes Simplex Keratitis. *Journal of Pharmacological Sciences*, **2016**, *131*, 126–130.
- [241] Reetz, M.T. Combinatorial and Evolution-Based Methods in the Creation of Enantioselective Catalysts. *Angewandte Chemie International Edition*, **2001**, *40*, 284–310.
- [242] Persson, M.; Palcic, M.M. A High-Throughput pH Indicator Assay for Screening Glycosyltransferase Saturation Mutagenesis Libraries. *Analytical Biochemistry*, **2008**, *378*, 1–7.
- [243] Berland, M.; Offmann, B.; Andre, I.; Remaud-Simeon, M.; Charton, P. A Web-Based Tool for Rational Screening of Mutants Libraries Using ProSAR. *Protein Engineering Design and Selection*, **2014**, *27*, 375–381.
- [244] Zagalak, B.; Frey, P.A.; Karabatsos, G.L.; Abeles, R.H. The Stereochemistry of the Conversion of D and L 1,2-Propanediols to Propionaldehyde. *J. Biol. Chem.*, **1966**, *241*, 3028–3035.
- [245] Lindqvist, Y.; Schneider, G.; Ermler, U.; Sundström, M. Three-Dimensional Structure of Transketolase, a Thiamine Diphosphate Dependent Enzyme, at 2.5 Å Resolution. *EMBO J.*, **1992**, *11*, 2373–2379.
- [246] Mitra, R.K.; Woodley, J.M.; Lilly, M.D. Escherichia Coli Transketolase-Catalyzed Carbon-Carbon Bond Formation: Biotransformation Characterization for Reactor Evaluation and Selection. *Enzyme and Microbial Technology*, **1998**, *22*, 64–70.
- [247] Dickens, F.; Williamson, D.H. The Preparation and Properties of Lithium Hydroxypyruvate and Hydroxypyruvic Acid. *Biochem. J.*, **1958**, *68*, 74–81.
- [248] Sprinson, D.B.; Chargaff, E. A Study of Beta-Hydroxy-Alpha-Keto Acids. *J. Biol. Chem.*, **1946**, *164*, 417–432.
- [249] Delidovich, I.; Palkovits, R. Catalytic Isomerization of Biomass-Derived Aldoses: A Review. *ChemSusChem*, **2016**, *9*, 547–561.
- [250] Li, H.; Yang, S.; Saravanamurugan, S.; Riisager, A. Glucose Isomerization by Enzymes and Chemo-Catalysts: Status and Current Advances. *ACS Catalysis*, **2017**, *7*, 3010–3029.
- [251] Bermejo-Deval, R.; Assary, R.S.; Nikolla, E.; Moliner, M.; Roman-Leshkov, Y.; Hwang, S.-J.; Palsdottir, A.; Silverman, D.; Lobo, R.F.; Curtiss, L.A.; Davis, M.E. Metalloenzyme-like Catalyzed Isomerizations of Sugars by Lewis Acid Zeolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2012**, *109*, 9727–9732.
- [252] Borges da Silva, E.A.; Ulson de Souza, A.A.; de Souza, S.G.U.; Rodrigues, A.E. Analysis of the High-Fructose Syrup Production Using Reactive SMB Technology. *Chemical Engineering Journal*, **2006**, *118*, 167–181.
- [253] Straatsma, J.; Vellenga, K.; De Wilt, H.G.J.; Joosten, G.E.H. Isomerization of Glucose to Fructose. 2. Optimization of Reaction Conditions in the Production of High Fructose Syrup by Isomerization of Glucose Catalyzed by a Whole Cell Immobilized

- Glucose Isomerase Catalyst. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, **1983**, 22, 356–361.
- [254] Oh, D.-K. Tagatose: Properties, Applications, and Biotechnological Processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2007**, 76, 1–8.
- [255] Dalmas, V.; Demuynck, C. An Efficient Synthesis of Sedoheptulose Catalyzed by Spinach Transketolase. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, 4, 1169–1172.
- [256] Kim, H.-J.; Ryu, S.-A.; Kim, P.; Oh, D.-K. A Feasible Enzymatic Process for D-Tagatose Production by an Immobilized Thermostable L-Arabinose Isomerase in a Packed-Bed Bioreactor. *Biotechnology Progress*, **2003**, 19, 400–404.
- [257] Kim, P.; Yoon, S.-H.; Roh, H.-J.; Choi, J.-H. High Production of D-Tagatose, a Potential Sugar Substitute, Using Immobilized L-Arabinose Isomerase. *Biotechnology Progress*, **2001**, 17, 208–210.
- [258] Helanto, M.; Kiviharju, K.; Leisola, M.; Nyssola, A. Metabolic Engineering of *Lactobacillus Plantarum* for Production of L-Ribulose. *Applied and Environmental Microbiology*, **2007**, 73, 7083–7091.
- [259] Zhang, Y.-W.; Prabhu, P.; Lee, J.-K. Alginate Immobilization of Recombinant *Escherichia Coli* Whole Cells Harboring L-Arabinose Isomerase for L-Ribulose Production. *Bioprocess Biosyst Eng*, **2010**, 33, 741–748.
- [260] De Muynck, C.; Pereira, C.; Soetaert, W.; Vandamme, E. Dehydrogenation of Ribitol with *Gluconobacter Oxydans*: Production and Stability of L-Ribulose. *Journal of Biotechnology*, **2006**, 125, 408–415.
- [261] Dean, S.M.; Greenberg, W.A.; Wong, C.-H. Recent Advances in Aldolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2007**, 349, 1308–1320.
- [262] Lorillière, M.; De Sousa, M.; Bruna, F.; Heuson, E.; Gefflaut, T.; de Berardinis, V.; Saravanan, T.; Yi, D.; Fessner, W.-D.; Charmantray, F.; Hecquet, L. One-Pot, Two-Step Cascade Synthesis of Naturally Rare α -Erythro (3S,4S) Ketoses by Coupling a Thermostable Transaminase and Transketolase. *Green Chem.*, **2017**, 19, 425–435.
- [263] Sprinson, D.B.; Chargaff, E. A Study of Beta-Hydroxy-Alpha-Keto Acids. *J. Biol. Chem.*, **1946**, 164, 417–432.
- [264] Hecquet, L.; Bolte, J.; Demuynck, C. Enzymatic Synthesis of “natural-Labeled” 6-Deoxy-L-Sorbose Precursor of an Important Food Flavor. *Tetrahedron*, **1996**, 52, 8223–8232.
- [265] Demuynck, C.; Bolte, J.; Hecquet, L.; Samaki, H. Enzymes as Reagents in Organic Chemistry: Transketolase-Catalysed Synthesis of D-[1,2-¹³C₂]xylulose. *Carbohydrate Research*, **1990**, 206, 79–85.
- [266] Villegas-Torres, M.F.; Martinez-Torres, R.J.; Cázares-Körner, A.; Hailes, H.; Baganz, F.; Ward, J. Multi-Step Biocatalytic Strategies for Chiral Amino Alcohol Synthesis. *Enzyme and Microbial Technology*, **2015**, 81, 23–30.
- [267] Lee, S.; Kirschning, A.; Müller, M.; Way, C.; Floss, H.G. Enzymatic Synthesis of α - and Sedoheptulose 7-Phosphate and Ido-Heptulose 7-Phosphate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **1999**, 6, 369–377.
- [268] Metzler, D.E.; Ikawa, M.; Snell, E.E. A General Mechanism for Vitamin B₆-Catalyzed Reactions¹. *Journal of the American Chemical Society*, **1954**, 76, 648–652.
- [269] Steffen-Munsberg, F.; Vickers, C.; Kohls, H.; Land, H.; Mallin, H.; Nobili, A.; Skalden, L.; van den Bergh, T.; Joosten, H.-J.; Berglund, P.; Höhne, M.; Bornscheuer, U.T. Bioinformatic Analysis of a PLP-Dependent Enzyme Superfamily Suitable for Biocatalytic Applications. *Biotechnology Advances*, **2015**, 33, 566–604.

- [270] Mehta, P.K.; Hale, T.I.; Christen, P. Aminotransferases: Demonstration of Homology and Division into Evolutionary Subgroups. *Eur. J. Biochem.*, **1993**, *214*, 549–561.
- [271] Grishin, N.V.; Phillips, M.A.; Goldsmith, E.J. Modeling of the Spatial Structure of Eukaryotic Ornithine Decarboxylases. *Protein Science*, **1995**, *4*, 1291–1304.
- [272] Heuson, E.; Petit, J.-L.; Debard, A.; Job, A.; Charmantray, F.; de Berardinis, V.; Gefflaut, T. Continuous Colorimetric Screening Assays for the Detection of Specific L- or D- α -Amino Acid Transaminases in Enzyme Libraries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2016**, *100*, 397–408.
- [273] Ishiyama, M.; Shiga, M.; Sasamoto, K.; Mizoguchi, M.; He, P. A New Sulfonated Tetrazolium Salt That Produces a Highly Water-Soluble Formazan Dye. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, **1993**, *41*, 1118–1122.
- [274] Bommer, M.; Ward, J.M. Micromolar Colorimetric Detection of 2-Hydroxy Ketones with the Water-Soluble Tetrazolium WST-1. *Analytical Biochemistry*, **2016**, *493*, 8–10.
- [275] *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook*; Drauz, K.; Waldmann, H.; Gröger, H.; May, O., Eds.; 2. ed. ff.; Wiley-VCH: Weinheim, **2002**.
- [276] Spring, S.; Lapidus, A.; Schröder, M.; Gleim, D.; Sims, D.; Meincke, L.; Glavina Del Rio, T.; Tice, H.; Copeland, A.; Cheng, J.-F.; Lucas, S.; Chen, F.; Nolan, M.; Bruce, D.; Goodwin, L.; Pitluck, S.; Ivanova, N.; Mavromatis, K.; Mikhailova, N.; Pati, A.; Chen, A.; Palaniappan, K.; Land, M.; Hauser, L.; Chang, Y.-J.; Jeffries, C.D.; Chain, P.; Saunders, E.; Brettin, T.; Detter, J.C.; Göker, M.; Bristow, J.; Eisen, J.A.; Markowitz, V.; Hugenholtz, P.; Kyrpides, N.C.; Klenk, H.-P.; Han, C. Complete Genome Sequence of *Desulfotomaculum Acetoxidans* Type Strain (5575T). *Standards in Genomic Sciences*, **2009**, *1*, 242–253.
- [277] Parshina, S.N. *Desulfotomaculum Carboxydivorans* Sp. Nov., a Novel Sulfate-Reducing Bacterium Capable of Growth at 100 % CO. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, **2005**, *55*, 2159–2165.
- [278] Sokolova, T.G. *Thermosinus Carboxydivorans* Gen. Nov., Sp. Nov., a New Anaerobic, Thermophilic, Carbon-Monoxide-Oxidizing, Hydrogenogenic Bacterium from a Hot Pool of Yellowstone National Park. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, **2004**, *54*, 2353–2359.
- [279] *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook*; Drauz, K.; Waldmann, H.; Gröger, H.; May, O., Eds.; 2. ed. ff.; Wiley-VCH: Weinheim, **2002**.
- [280] Villegas-Torres, M.F.; Martínez-Torres, R.J.; Cázares-Körner, A.; Hailes, H.; Baganz, F.; Ward, J. Multi-Step Biocatalytic Strategies for Chiral Amino Alcohol Synthesis. *Enzyme and Microbial Technology*, **2015**, *81*, 23–30.
- [281] Basurko, M.-J.; Marche, M.; Darriet, M.; Cassaigne, A. Phosphoserine Aminotransferase, the Second Step-Catalyzing Enzyme for Serine Biosynthesis. *IUBMB Life*, **1999**, *48*, 525–529.
- [282] Kendziorek, M.; Paszkowski, A. Properties of Serine:glyoxylate Aminotransferase Purified from *Arabidopsis Thaliana* Leaves. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **2008**, *40*, 102–110.
- [283] Izumi, Y.; Yoshida, T.; Yamada, H. Purification and Characterization of Serine-Glyoxylate Aminotransferase from a Serine-Producing Methylophilic, *Hyphomicrobium Methylovorum* GM2. *Eur. J. Biochem.*, **1990**, *190*, 285–290.
- [284] Truszkiewicz, W.; Paszkowski, A. Serine:Glyoxylate Aminotransferases from Maize and Wheat Leaves: Purification and Properties. *Photosynthesis Research*, **2004**, *82*, 35–47.

- [285] Sheldon, R.A. E Factors, Green Chemistry and Catalysis: An Odyssey. *Chemical Communications*, **2008**, 3352.
- [286] Motta, P.; Molla, G.; Pollegioni, L.; Nardini, M. Structure-Function Relationships in L-Amino Acid Deaminase, a Flavoprotein Belonging to a Novel Class of Biotechnologically Relevant Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, **2016**, *291*, 10457–10475.
- [287] Joosten, V.; van Berkel, W.J. Flavoenzymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2007**, *11*, 195–202.
- [288] Pollegioni, L.; Piubelli, L.; Sacchi, S.; Pilone, M.S.; Molla, G. Physiological Functions of D-Amino Acid Oxidases: From Yeast to Humans. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2007**, *64*, 1373–1394.
- [289] Takahashi, S.; Abe, K.; Kera, Y. Bacterial D-Amino Acid Oxidases: Recent Findings and Future Perspectives. *Bioengineered*, **2015**, *6*, 237–241.
- [290] Pollegioni, L.; Molla, G. New Biotech Applications from Evolved D-Amino Acid Oxidases. *Trends in Biotechnology*, **2011**, *29*, 276–283.
- [291] de la Mata, I.; Ramón, F.; Obregón, V.; Castellón, M.P.; Acebal, C. Effect of Hydrogen Peroxide on D-Amino Acid Oxidase from *Rhodotorula Gracilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, **2000**, *27*, 234–239.
- [292] Kuan, I.; Liao, R.; Hsieh, H.; Chen, K.; Yu, C. Properties of *Rhodotorula Gracilis* D-Amino Acid Oxidase Immobilized on Magnetic Beads through His-Tag. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2008**, *105*, 110–115.
- [293] Krebs, H.A. Metabolism of Amino-Acids: Deamination of Amino-Acids. *Biochem. J.*, **1935**, *29*, 1620–1644.
- [294] Simonetta, M.P.; Vanoni, M.A.; Casalin, P. Purification and Properties of D-Amino-Acid Oxidase, an Inducible Flavoenzyme from *Rhodotorula Gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1987**, *914*, 136–142.
- [295] D’Aniello, A.; Vetere, A.; Petrucelli, L. Further Study on the Specificity of D-Amino Acid Oxidase and of D-Aspartate Oxidase and Time Course for Complete Oxidation of D-Amino Acids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **1993**, *105*, 731–734.
- [296] Sonia, F.; Loredano, P.; Mirella, P.S. Engineering, Expression and Purification of a His-Tagged Chimeric D-Amino Acid Oxidase from *Rhodotorula Gracilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, **2001**, *29*, 407–412.
- [297] Khoronenkova, S.V.; Tishkov, V.I. D-Amino Acid Oxidase: Physiological Role and Applications. *Biochemistry Mosc.*, **2008**, *73*, 1511–1518.
- [298] Elander, R.P. Industrial Production of β -Lactam Antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2003**, *61*, 385–392.
- [299] Pollegioni, L.; Molla, G.; Sacchi, S.; Rosini, E.; Verga, R.; Pilone, M.S. Properties and Applications of Microbial D-Amino Acid Oxidases: Current State and Perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2008**, *78*, 1–16.
- [300] Alonso, J.; Barredo, J.L.; Diez, B.; Mellado, E.; Salto, F.; Garcia, J.L.; Cortes, E. D-Amino-Acid Oxidase Gene from *Rhodotorula Gracilis* (*Rhodospiridium Toruloides*) ATCC 26217. *Microbiology*, **1998**, *144*, 1095–1101.
- [301] Takahashi, S.; Furukawara, M.; Omae, K.; Tadokoro, N.; Saito, Y.; Abe, K.; Kera, Y. A Highly Stable D-Amino Acid Oxidase of the Thermophilic Bacterium *Rubrobacter Xylanophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **2014**, *80*, 7219–7229.

- [302] Bergmeyer, H.U.; Gawehn, K. *Methods of Enzymatic Analysis. Volume 4 Volume 4*; Verlag Chemie: Weinheim, **1974**.
- [303] Gabler, M.; Hensel, M.; Fischer, L. Detection and Substrate Selectivity of New Microbial D-Amino Acid Oxidases. *Enzyme and Microbial Technology*, **2000**, *27*, 605–611.
- [304] Pollegioni, L.; Falbo, A.; Pilone, M.S. Specificity and Kinetics of Rhodotorula Gracillid-Amino Acid Oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1992**, *1120*, 11–16.
- [305] Szekrenyi, A.; Garrabou, X.; Parella, T.; Joglar, J.; Bujons, J.; Clapés, P. Asymmetric Assembly of Aldose Carbohydrates from Formaldehyde and Glycolaldehyde by Tandem Biocatalytic Aldol Reactions. *Nature Chemistry*, **2015**, *7*, 724–729.
- [306] Clapés, P.; Fessner, W.-D.; Sprenger, G.A.; Samland, A.K. Recent Progress in Stereoselective Synthesis with Aldolases. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2010**, *14*, 154–167.
- [307] Rima Mahdi. *Thèse de Doctorat - Nouveaux Matériaux Biohybrides Multifonctionnels Pour La Biocatalyse*, **2015**.
- [308] Schurmann, M. Fructose-6-Phosphate Aldolase Is a Novel Class I Aldolase from Escherichia Coli and Is Related to a Novel Group of Bacterial Transaldolases. *Journal of Biological Chemistry*, **2001**, *276*, 11055–11061.
- [309] Garrabou, X.; Castillo, J.A.; Guérard-Hélaine, C.; Parella, T.; Joglar, J.; Lemaire, M.; Clapés, P. Asymmetric Self- and Cross-Aldol Reactions of Glycolaldehyde Catalyzed by D-Fructose-6-Phosphate Aldolase. *Angewandte Chemie International Edition*, **2009**, *48*, 5521–5525.
- [310] Roldán, R.; Sanchez-Moreno, I.; Scheidt, T.; Hélaine, V.; Lemaire, M.; Parella, T.; Clapés, P.; Fessner, W.-D.; Guérard-Hélaine, C. Breaking the Dogma of Aldolase Specificity: Simple Aliphatic Ketones and Aldehydes Are Nucleophiles for Fructose-6-Phosphate Aldolase. *Chemistry - A European Journal*, **2017**, *23*, 5005–5009.
- [311] Güclü, D.; Szekrenyi, A.; Garrabou, X.; Kickstein, M.; Junker, S.; Clapés, P.; Fessner, W.-D. Minimalist Protein Engineering of an Aldolase Provokes Unprecedented Substrate Promiscuity. *ACS Catalysis*, **2016**, *6*, 1848–1852.
- [312] Oh, D.-K. Tagatose: Properties, Applications, and Biotechnological Processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2007**, *76*, 1–8.
- [313] Daegelen, P.; Studier, F.W.; Lenski, R.E.; Cure, S.; Kim, J.F. Tracing Ancestors and Relatives of Escherichia Coli B, and the Derivation of B Strains REL606 and BL21(DE3). *Journal of Molecular Biology*, **2009**, *394*, 634–643.
- [314] Villarejo, M.R.; Zabin, I. Beta-Galactosidase from Termination and Deletion Mutant Strains. *J. Bacteriol.*, **1974**, *120*, 466–474.
- [315] Aslanidis, C.; de Jong, P.J. Ligation-Independent Cloning of PCR Products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res.*, **1990**, *18*, 6069–6074.
- [316] Compton, S.J.; Jones, C.G. Mechanism of Dye Response and Interference in the Bradford Protein Assay. *Anal. Biochem.*, **1985**, *151*, 369–374.
- [317] Wood, E. Data for Biochemical Research (Third Edition). *Biochemical Education*, **1987**, *15*, 97.
- [318] Benaissi, K.; Hélaine, V.; Prévot, V.; Forano, C.; Hecquet, L. Efficient Immobilization of Yeast Transketolase on Layered Double Hydroxides and Application for Ketose Synthesis. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2011**, *353*, 1497–1509.

- [319] Habe, H.; Fukuoka, T.; Kitamoto, D.; Sakaki, K. Glycerol Conversion to D-Xylulose by a Two-Stage Microbial Reaction Using *Candida Parapsilosis* and *Gluconobacter Oxydans*. *J Oleo Sci*, **2009**, *58*, 595–600.
- [320] Vuorinen, T.; Serianni, A.S. Synthesis of D-Erythro-2-Pentulose and D-Threo-2-Pentulose and Analysis of the ¹³C- and ¹H-N.m.r. Spectra of the 1-¹³C- and 2-¹³C-Substituted Sugars. *Carbohydr. Res.*, **1991**, *209*, 13–31.
- [321] Wu, J.; Serianni, A.S.; Vuorinen, T. Furanose Ring Anomerization: Kinetic and Thermodynamic Studies of the D-2-Pentuloses by ¹³C-N.m.r. Spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, **1990**, *206*, 1–12.
- [322] Levene, P.A.; Tipson, R.S. An Improved Method for the Preparation of Xylulose and Ribulose. *Journal of Biological Chemistry*, **1936**, *115*, 731–747.
- [323] Barili, P.L.; Berti, G.; Catelani, G.; D'Andrea, F.; Miarelli, L. New Syntheses of D-Tagatose and of 1,5-Anhydro-D-Tagatose from D-Galactose Derivatives. *Carbohydr. Res.*, **1995**, *274*, 197–208.
- [324] Sauvage, J.-P.; Chapelle, S.; Verchère, J.-F. Evidence for Molybdate Complexes of Ketoses and Aldoses in the Furanose Form: A ¹³C and ¹H NMR Study. *Carbohydrate Research*, **1992**, *237*, 23–32.
- [325] Köpper, S.; Freimund, S. The Composition of Keto Aldoses in Aqueous Solution as Determined by NMR Spectroscopy. *Helvetica Chimica Acta*, **2003**, *86*, 827–843.
- [326] Takeshita, K.; Shimonishi, T.; Izumori, K. Production of L- Psicose from Allitol by *Gluconobacter Frateurii* IFO 3254. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **1996**, *81*, 212–215.
- [327] Enders, D.; Grondal, C. Direct Organocatalytic De Novo Synthesis of Carbohydrates. *Angewandte Chemie International Edition*, **2005**, *44*, 1210–1212.
- [328] Tsuzuki, Y.; Yamazaki, J.; Kagami, K. The Specific Rotation of Fructose. *Journal of the American Chemical Society*, **1950**, *72*, 1071–1073.
- [329] Funcke, W.; von Sonntag, C.; Triantaphylides, C. Detection of the Open-Chain Forms of D-Fructose and L-Sorbose in Aqueous Solution by Using ¹³C-N.m.r. Spectroscopy. *Carbohydrate Research*, **1979**, *75*, 305–309.
- [330] Prince, R.C.; Gunson, D.E.; Leigh, J.S.; McDonald, G.G. The Predominant Form of Fructose Is a Pyranose, Not a Furanose Ring. *Trends in Biochemical Sciences*, **1982**, *7*, 239–240.
- [331] Pigman, W.W.; Isbell, H.S. Mutarotation of L-Sorbose. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, **1937**, *19*, 443.
- [332] Funcke, W.; von Sonntag, C.; Triantaphylides, C. Detection of the Open-Chain Forms of D-Fructose and L-Sorbose in Aqueous Solution by Using ¹³C-N.m.r. Spectroscopy. *Carbohydrate Research*, **1979**, *75*, 305–309.
- [333] Ceusters, J.; Godts, C.; Peshev, D.; Vergauwen, R.; Dyubankova, N.; Lescrinier, E.; De Proft, M.P.; Van den Ende, W. Sedoheptulose Accumulation under CO₂ Enrichment in Leaves of *Kalanchoë Pinnata*: A Novel Mechanism to Enhance C and P Homeostasis? *Journal of Experimental Botany*, **2013**, *64*, 1497–1507.
- [334] Gorin, P.A.J.; Jones, J.K.N. 312. The Synthesis of Sugars from Simpler Substances. Part VI. Enzymic Synthesis of D-Idoheptulose. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, **1953**, 1537.
- [335] Bianchi, G.; Gamba, A.; Murelli, C.; Salamini, F.; Bartels, D. Novel Carbohydrate Metabolism in the Resurrection Plant *Craterostigma Plantagineum*. *The Plant Journal*, **1991**, *1*, 355–359.

- [336] Serianni, A.S.; Clark, E.L.; Barker, R. Carbon-13-Enriched Carbohydrates. Preparation of Erythrose, Threose, Glyceraldehyde, and Glycolaldehyde with ^{13}C -Enrichment in Various Carbon Atoms. *Carbohydrate Research*, **1979**, 72, 79–91.
- [337] Serianni, A.S.; Clark, E.L.; Barker, R. Carbon-13-Enriched Carbohydrates. Preparation of Erythrose, Threose, Glyceraldehyde, and Glycolaldehyde with ^{13}C -Enrichment in Various Carbon Atoms. *Carbohydrate Research*, **1979**, 72, 79–91.
- [338] André, C.; Bolte, J.; Demuynck, C. Syntheses of L-Threose and D-Erythrose Analogues Modified at Position 2. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 1359–1367.

Publications

Engineering a Thermostable Transketolase for Unnatural Conversion of (2*S*)-Hydroxyaldehydes

Juliane Abdoul Zabar,^{a,b} Marion Lorillière,^{a,b} Dong Yi,^c Thangavelu Saravanan,^c Titu Devamani,^c Lionel Nauton,^{a,b} Franck Charmantray,^{a,b} Virgil Hélaine,^{a,b} Wolf-Dieter Fessner,^{c,*} and Laurence Hecquet^{a,b,*}

^a Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

Fax: (+33)-4-7340-7717; phone: (+33)-4-7340-7871; e-mail: laurence.hecquet@univ-bpclermont.fr

^b CNRS, UMR 6296, ICCF, F-63177 Aubière, France

^c Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt, Alarich-Weiss-Str. 4, D-64287 Darmstadt, Germany

Fax: (+49)-6151-166-636; phone: (+49)-6151-166-666; e-mail: fessner@tu-darmstadt.de

Received: February 27, 2015; Revised: April 22, 2015; Published online: May 12, 2015

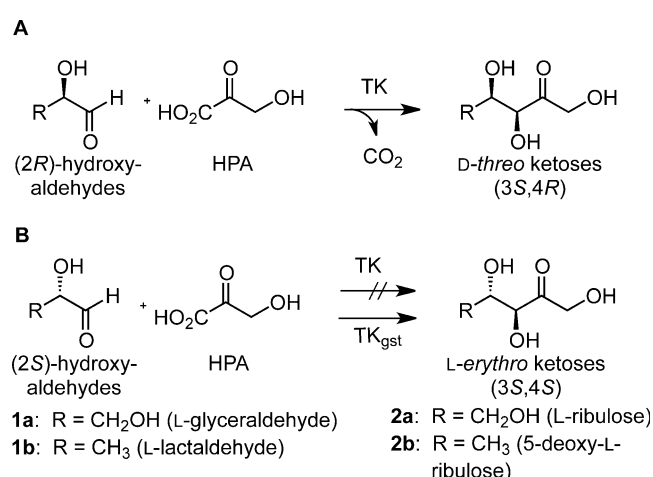
Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.201500207>.

Abstract: Transketolase (TK) from various origins (including *Escherichia coli* and yeast) has been described to be fully enantiomer specific for (2*R*)-hydroxyaldehyde substrates. A thermostable TK from *Geobacillus stearothermophilus* (TK_{gst}) was found to display a minor reactivity for (2*S*)-hydroxylated aldehydes. To improve this activity by directed protein evolution, we have built a library of TK_{gst} variants by site saturation mutagenesis on two key positions L382 and D470. The best TK_{gst} double mutant L382D/D470S shows up to 4- and 5-fold higher activities towards L-lactaldehyde and L-glyceraldehyde as acceptor substrates, respectively. Preparative utility of this mutant was demonstrated by the one-step synthesis of valuable L-ribulose and its 5-deoxy analogue with the L-erythro (3*S*,4*S*) configuration, which were previously inaccessible by using common TK sources.

Keywords: carboligation; α -hydroxylated aldehydes; mutagenesis; stereoselectivity; transketolase

Transketolase (TK) (EC 2.2.1.1) is an important thiamine diphosphate (ThDP) dependent enzyme which *in vivo* catalyzes a carboligation reaction by transferring a two-carbon ketol unit from a donor to an aldehyde acceptor. While this transfer is reversible, the use of hydroxypyruvate (HPA) as the donor *in vitro* renders the reaction irreversible.^[1] For biocatalytic applications, enzymes from yeast (TK_{yst})^[2] or from *E. coli* (TK_{eco})^[3] have been used most often

(Scheme 1A). The ability to achieve highly stereoselective carbon-carbon bond formation to create (3*S*)-hydroxy ketones on the one hand, and tolerance for a wide range of aldehyde acceptors on the other hand, made these enzymes attractive tools for biocatalytic synthesis. Kinetically, best substrates are 2-hydroxylated aldehydes as acceptors, for which TK from various sources show strict enantiomer preference for the (2*R*)-configured antipodes producing ketoses with a common D-threo (3*S*,4*R*) configuration (Scheme 1A).^[4] This enantiomer preference has even been suggested as a practical method to prepare (2*S*)-configured hydroxyaldehydes by kinetic resolution *via*



Scheme 1. Conversion of (2*R*)-hydroxyaldehydes catalyzed by TK enzymes from various sources to yield the natural D-threo configuration (A), and the complementary reaction of (2*S*)-hydroxyaldehydes by TK_{gst} (B).

consumption of the reactive enantiomer from racemic substrates.^[4b] To the best of our knowledge, no TK-catalyzed conversion of (2*S*)-configured hydroxyaldehydes has been hitherto reported. However, a TK catalyst with inverse stereoselectivity is of high interest for applications in *systems biocatalysis*,^[5] a novel strategy to build artificial metabolic pathways *in vitro* for the synthesis of non-natural targets.

Recently, we have identified the TK from *Geobacillus stearothermophilus* (TK_{gst}) as a novel thermostable catalyst with high potential for biocatalyst development.^[6] TK_{gst} retained 100% activity for 7 days at 50 °C and for 3 days at 65 °C, and has an optimum temperature range around 65 °C, which offers a broad window for synthetic applications. From an industrial point of view, enzymatic processes at elevated temperature have many advantages, such as higher reaction rates and improved solubility of hydrophobic organic acceptor substrates. In addition, the thermostability of TK_{gst} also offers better robustness against protein destabilizing factors introduced by mutagenesis when engineering the protein for improved properties. In previous studies we showed that TK_{gst} catalyzes the carbon-carbon bond formation in a stereospecific manner to yield (3*S*)-hydroxy ketones,^[6] as reported for other TK sources. While TK_{gst} showed only moderate reaction rates with non-hydroxylated aldehydes, recently we reported the directed evolution of TK_{gst} for improved conversion of non-hydroxylated aldehydes, which furnished several variants having up to 16-fold higher activity and strongly improved stereoselectivity (>95% *ee*) relative to the wild-type TK_{gst}.^[7] These findings complemented studies conducted previously with mesophilic TK_{eco}.^[8]

In this work, we have investigated the activity of TK_{gst} towards 2-hydroxylated aldehyde acceptors (Figure 1). The substrate profile was the same as that observed with other TK sources,^[1,4,9] showing high activity towards short chain (C₂–C₄) hydroxylated aldehydes, lower activity for aldehydes lacking 3-hydroxylation (D- and L-lactaldehyde, **1b**) and D-ribose (C₅) and no detectable activity with D-glucose (C₆). Although common TK sources exclusively accept (2*R*)-hydroxyaldehydes,^[4b] surprisingly we observed a slight activity of TK_{gst} with (2*S*)-hydroxylated aldehydes such as L-glyceraldehyde (L-**1a**) and L-**1b** (Scheme 1B).

The kinetic parameters K_M and v_{max} of wild-type TK_{gst} were determined for both enantiomers of **1a** and **1b** by the Hanes–Wolf method and are summarized in Table 1. As expected, wild-type TK_{gst} shows high affinity for (2*R*)-hydroxyaldehydes (K_M values for D-**1a** and D-**1b** are 6 mM and 8.4 mM, respectively). On the contrary, high K_M values were measured for the antipodes L-**1a** ($K_M > 300$ mM) and L-**1b** ($K_M > 400$ mM). However, the v_{max} values with both L-**1a**

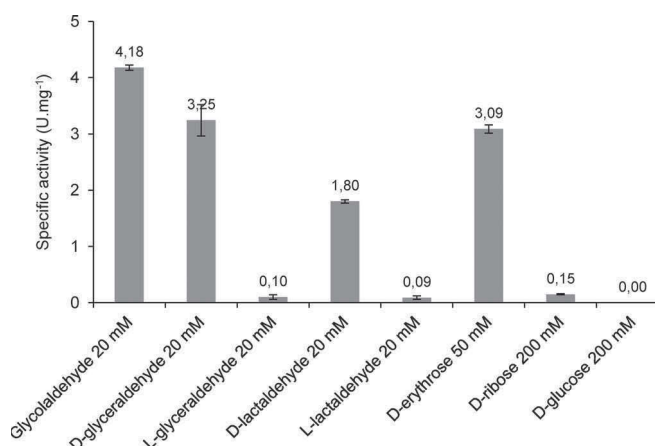


Figure 1. Acceptor substrate scope of wild-type TK_{gst}. The assay solution contained 20 mM acceptor except for D-erythrose (50 mM), D-ribose (0.2 M) and D-glucose (0.2 M), 4–90 μg TK, 2.4 mM ThDP, 9 mM MgCl₂, 84 μM phenol red and 2 mM triethanolamine buffer (pH 7.15).

Table 1. Kinetic parameters of wild-type TK_{gst}.

Acceptor Substrates	Kinetic parameters		
	K_M [a] [mM]	v_{max} [a] [U·mg ⁻¹]	v_{max}/K_M [U·mg ⁻¹ ·mM]
D- 1a	6 ± 2	16 ± 1	2.7
L- 1a	> 300	2.3 ± 0.6	< 0.008
D- 1b	8.4 ± 0.7	11.4 ± 0.5	1.4
L- 1b	> 400	1.4 ± 0.4	< 0.004

[a] Kinetic constants were determined by varying the concentration of individual acceptor substrates. The assay solution contained 12.5–63 μg TK, 2.4 mM ThDP, 9 mM MgCl₂, 84 μM of phenol red and 2 mM triethanolamine buffer (pH 7.15).

and L-**1b** suggested that the catalytic reaction is feasible (Table 1).

To confirm these results, preparative-scale syntheses were performed with HPA as donor and enantiomerically pure L-**1a** and L-**1b** as acceptors. All reactions were carried out at elevated temperature (50 °C), in the presence of wild-type TK_{gst}. The temperature was chosen as a compromise because TK_{gst} activity was 7-fold higher at 50 °C than at 20 °C while HPA degrades more rapidly at higher temperatures.^[6] Both L-**1a** and L-**1b** were stable in aqueous solution at 50 °C. The pH was kept constant by pH-stat control. Consumption of donor and acceptor substrates proceeded completely in 24 h to furnish exclusively products **2a** and **2b** with isolated yields of 11% and 33%, respectively, and high diastereoselectivity (*de* > 95%, determined by ¹H NMR). This indicates that TK_{gst} consistently led to the formation of L-*erythro* ketoses (3*S*,4*S*). For comparison, TK_{eco} at 20 °C with the same

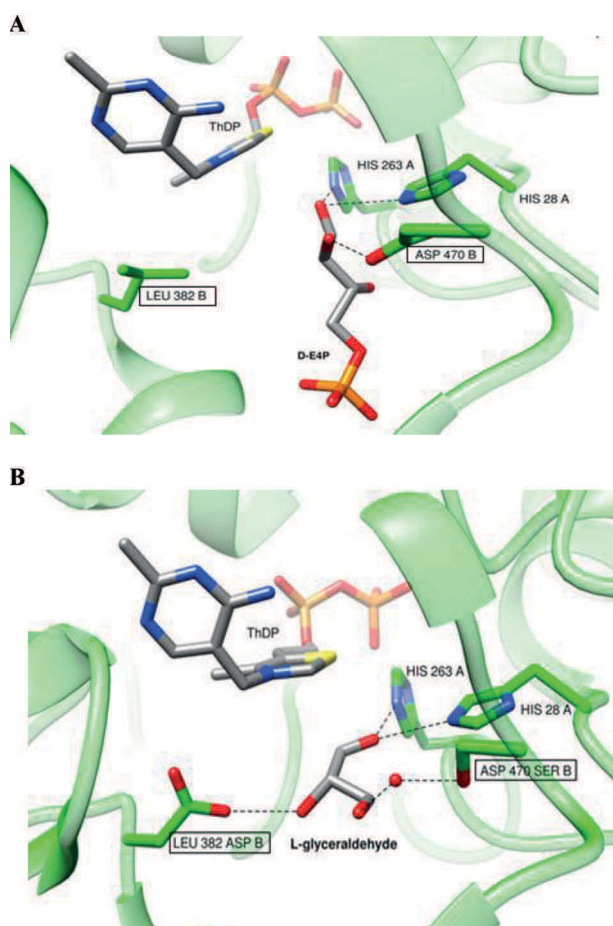


Figure 2. Model of the TK_{gst} substrate binding pocket based on the X-ray crystal structure of TK_{ban} (PDB entry 3M49) with D-E4P, the natural acceptor substrate (**A**), and with L-**1a** as unnatural acceptor substrate (**B**). The model was built using *Modeler 9.14* and *Chimera*. Graphic was created with *Chimera*.

substrates was unable to catalyze the reaction (data not shown).

To improve the unnatural TK_{gst} activity towards (2*S*)-hydroxylated aldehydes for the synthesis of rare L-sugars, we followed a directed evolution strategy similar to the one that we recently reported to enhance TK_{gst} activity for non-hydroxylated aldehydes.^[7]

First, a model of the TK_{gst} active-site pocket was built containing its natural acceptor substrate, D-(2*R*,3*R*) erythrose 4-phosphate (D-E4P) (Figure 2A). Since the three-dimensional structure of TK_{gst} is unknown, the model was based on the X-ray crystal structure of the TK from *Bacillus anthracis* (TK_{ban}) as a template (PDB ID: 3M49), which has high sequence similarity (74% identity). We identified the two key positions Asp470 and Leu382 as plausible targets for mutagenesis. The highly conserved residue Asp470 in TK_{gst} (Asp477 in TK_{yeast}, Asp469 in TK_{eco}) is located in the substrate channel of the enzyme and forms a hydrogen bond with the (2*R*)-hydroxy group of D-E4P.

Site-directed mutagenesis studies of TK_{gst} showed that for the Asp477Ala mutant the k_{cat}/K_M values for (2*R*)-hydroxylated aldehydes decreased by three orders of magnitude indicating that this residue is involved in differentiating the correct enantiomer configuration.^[10] Modification of Leu382 in TK_{gst} (Leu383 in TK_{yeast}, Leu382 in TK_{eco}) located opposite to Asp470 was pursued based on the expectation that a polar residue in this position might establish a new binding interaction to an inverse (2*S*) hydroxy group in the acceptor, cooperatively with Asp470 mutagenesis (Figure 2).

A double-site library was constructed by site-saturation mutagenesis (SSM) for a combined Asp470/Leu382 replacement using NNS codon degeneracy, and 3,572 clones were picked for analysis to secure a >95% statistical coverage.^[7] For library screening, we used a simple high-throughput assay developed recently based on direct monitoring of pH changes using phenol red as a pH indicator.^[9,11] For this assay, a triethanolamine buffer concentration as low as 2 mM gave the highest sensitivity results. In unbuffered solution the background absorbance level changes too readily upon very small experimental variations. The original assay^[9] had to be slightly adapted for specific screening conditions, to detect a rather low activity level in crude cell extracts, i.e., a 3-fold higher concentration of phenol red was used (6 μ L/well = 84 μ M final assay concentration). Absorbance variation at 560 nm was measured at initial time and after 2 h of reaction at room temperature.

The lysates obtained from each clone were first screened for activity with L-**1a** to yield 2% positive candidates (72 variants having at least 2-fold higher activity for L-**1a** as compared to wild-type enzyme). These 72 best hits were then rescreened for differentiation between L-**1a** and D-**1a**. Finally, four of the TK variants were selected for showing both an increased activity for L-**1a** and decreased activity for its D-enantiomer. These four His₆-tagged top variants were purified by Ni²⁺ chelating affinity column chromatography and characterized kinetically (Table 2). The thermostability of the TK_{gst} variants was confirmed by differential scanning fluorometry to be comparable to the wild-type TK_{gst} (data not shown).

Two of the candidates (**A** and **B**) were particularly interesting since they displayed a 3.5- to 5-fold increased activity relative to the wild-type TK_{gst}. According to their DNA sequences (Table 2) the improved variants include Leu382Asp and either Asp470Ser or Asp470Thr replacements.

While the single variant Asp470Thr has already been studied with TK_{eco} (Asp469Thr) to show higher activity towards non (α)-hydroxylated aldehydes,^[8b,c] Leu382 was never investigated previously to modify the TK substrate specificity. In order to understand the influence of these mutations on activity improve-

Table 2. Activity of the four best TK_{gst} mutants towards D- or L-**1a** and D- or L-**1b**.

TK _{gst}	Positions		Activity [U·mg ⁻¹] ^[a]			
	382	470	L- 1a	L- 1b	D- 1a	D- 1b
wt	Leu	Asp	0.10 ± 0.04	0.09 ± 0.03	3.3 ± 0.3	1.80 ± 0.03
A	Asp	Ser	0.51 ± 0.06	0.36 ± 0.02	0.60 ± 0.05	0.46 ± 0.05
B	Asp	Thr	0.46 ± 0.12	0.31 ± 0.02	0.53 ± 0.03	0.39 ± 0.01
C	Gly	Ser	0.25 ± 0.05	0.18 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.19 ± 0.03
D	Asn	Ser	0.22 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.31 ± 0.03	0.24 ± 0.02

^[a] The assay solution contained 20 mM acceptor, 4–90 µg TK, 2.4 mM ThDP, 9 mM MgCl₂, 84 µM of phenol red and 2 mM triethanolamine buffer (pH 7.15).

ment towards the L-enantiomer, a 3D structure model of the best variant TK_{gst} L382D/D470S (**A**) with L-**1a** as acceptor was constructed based on the X-ray crystal structure of TK_{ban}. According to the modeling results (Figure 2B), the Leu382Asp replacement creates a polar contact, which favors the binding of the (2*S*)-hydroxy group of L-**1a** while the Asp470Ser mutation may support the binding of the 3-hydroxy group of L-**1a** via a water molecule. Such an interaction could also explain the higher activity of the latter variant with L-**1a** as compared to L-**1b**.

The activities of all selected variants towards the D-enantiomers of both compounds were strongly reduced relative to wild-type TK_{gst}, confirming that Leu382 and Asp470 are indeed key residues for recognition of (2*R*)-hydroxylated aldehydes (Table 2). In the pursuit to switch the enantioselectivity of TK completely for unnatural reactivity with (2*S*)-hydroxylaldehydes, the most promiscuous TK_{gst} L382D/D470S (**A**) appears to be a promising candidate for the construction of next-generation libraries.

Finally we applied TK_{gst} L382D/D470S (**A**) as the best identified catalyst for the preparative synthesis of L-ribulose (**2a**) and its analogue 5-deoxy-L-ribulose (**2b**) from the corresponding substrates L-**1a** and L-**1b** with HPA as the donor. Reactions were performed at elevated temperature (50 °C) under the same conditions as above. With L-**1a** or L-**1b** as acceptors, complete conversion of HPA occurred in 7 and 17 h furnishing only **2a** and **2b** with 55% and 63% isolated yields, respectively. Notably, wild-type TK_{gst} led to these compounds in significantly lower yields (11%/33%) and required a longer reaction time (24 h), respectively. The optical rotation values and diastereoselectivity (*de* > 95%) of the isolated products **2a** and **2b** were comparable to those obtained with wild-type TK_{gst} showing that the stereoselectivity for the new stereocenter C-3 (*S*) created by TK reaction was not modified. Thus, TK_{gst} L382D/D470S catalyzes the formation of L-erythro ketoses (3*S*,4*S*) more efficiently than wild-type TK_{gst} and offers a novel and efficient strategy for the synthesis of the highly valuable compound L-ribulose, which otherwise is of limited availability and requires extensive purification efforts when

produced by enzymatic or chemical isomerization of L-arabinose.^[12,13]

This work highlights that wild-type TK_{gst} tolerates (2*S*)-hydroxylated aldehydes as acceptor substrate. This activity could be improved by combined SSM on two key positions Leu382 and Asp470. The best TK_{gst} mutant L382D/D470S leads up to 4- and 5-fold higher activities towards L-**1b** and L-**1a**, respectively. Suitability of this mutant for biocatalytic applications was demonstrated by the highly stereoselective synthesis of two valuable L-sugars **2a/2b** with good yields. This strategy can be extended for the preparation of other rare L-sugars,^[14] compounds that are of interest for a wide range of applications including the synthesis of L-nucleosides as chemotherapeutic drugs.^[12,15] The work reported herein will be an excellent starting point for next-generation libraries to further enhance the TK activity and selectivity towards (2*S*)-hydroxylated aldehydes.

Experimental Section

General procedure for preparative syntheses

ThDP (2.4 mM) and MgCl₂·6H₂O (9 mM) were dissolved in H₂O and the pH adjusted to 7.5 with 1M and then 0.1M NaOH. Wild-type TK_{gst} or L382D/D470S TK_{gst} (0.25 mg·mL⁻¹) was added and the mixture was stirred for 20 min at 50 °C. In another flask, Li-HPA (60 mM) and L-**1a** (50 mM) or L-**1b** (50 mM) were mixed in H₂O and the pH adjusted to 7.5 with 0.1M NaOH. After preincubation (20 min.) of enzyme and cofactors, Li-HPA and aldehyde mixture was added and the mixture was stirred at 50 °C. The pH was maintained at 7.5 by adding 0.1M HCl using a pH-stat (Radiometer Analytical). The reaction was monitored from aliquots by TLC and by measuring Li-HPA concentration in the presence of L-lactate dehydrogenase (10 U·mL⁻¹) and NADH (0.2 mg·mL⁻¹). The disappearance of NADH was followed by spectrophotometry at 340 nm and the difference between initial and final absorbances gave the Li-HPA concentration using the Beer–Lambert law [*ε* NADH(340) = 6220 M⁻¹·cm⁻¹].

(3*S*,4*S*)-1,3,4,5-Tetrahydroxypentan-2-one (L-ribulose) (2a): The reaction was performed using the general procedure with ThDP (22 mg, 48 µmol, 2.4 mM), MgCl₂·6H₂O

(36 mg, 180 μ mol, 9 mM), wild-type TK_{gst} or L382D/D470S TK_{gst} (1 mL, 5 mg of TK), Li-HPA (132 mg, 1.2 mmol, 60 mM) and L-**1a** (90 mg, 1 mmol, 50 mM) in a total volume of 20 mL. After 24 h for wild-type TK_{gst} or 7 h for TK_{gst} L382D/D470S, proteins were precipitated by adding three volumes of ethanol and the precipitate discarded after centrifugation. Silica gel was added to the supernatant, and the suspension was concentrated to dryness under vacuum. After flash silica chromatography using dichloromethane/methanol 9:1 (v/v) as eluent, L-ribulose **2a** was isolated as a yellow oil (yield: 16 mg, 11% for **2a** obtained with wild-type TK_{gst}) or (yield: 82 mg, 55% for **2a** obtained with TK_{gst} L382D/D470S). $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +16.4 (c 0.1, H₂O) for **2a** obtained with wild-type TK_{gst}. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +17.4 (c 0.1, H₂O) for **2a** obtained with TK_{gst} L382D/D470S, lit. $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$: +16.5 \pm 1.5 (c 0.1, H₂O).^[17] NMR data were identical to those previously described^[18] (**2a** from wild-type TK_{gst} or TK_{gst} L382D/D470S): ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) α -anomer/ β -anomer/keto isomer = 58/24/18; keto isomer: δ = 213.9 (C-2), 76.8 (C-3), 73.9 (C-4), 67.9 (C-1), 62.7 (C-5); α -anomer: δ = 103.9 (C-2), 72.9 (C-5), 71.9 (C-3), 71.6 (C-4), 64.2 (C-1); β -anomer: δ = 107.0 (C-2), 77.2 (C-3), 72.2 (C-5), 72.0 (C-4), 63.9 (C-1).

(3S,4S)-1,3,4-Trihydroxypentan-2-one (5-deoxy-L-ribulose) (2b): The reaction was performed using the general procedure with ThDP (11 mg, 24 μ mol, 2.4 mM) and MgCl₂·6H₂O (18 mg, 90 μ mol, 9 mM), wild-type TK_{gst} or L382D/D470S TK_{gst} (0.5 mL, 2.5 mg of TK), Li-HPA (66 mg, 0.6 mmol, 60 mM), L-**1b** (4.8 mL, 0.5 mmol, 50 mM) in a total volume of 10 mL. L-**1b** was synthesized chemically and was obtained in water solution.^[16] After 24 h for wild-type TK_{gst} or 17 h for TK_{gst} L382D/D470S, treatment and purification were performed as above. The 5-deoxy-L-ribulose **2b** was obtained as a yellow oil (yield: 22 mg, 33% for **2b** obtained with wild-type TK_{gst}) or (yield: 42 mg, 63% for **2b** obtained with TK_{gst} L382D/D470S). $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -26.5 (c 0.7, MeOH) for **2b** obtained with wild-type TK_{gst}. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -26.1 (c 0.7, MeOH) for **2b** obtained with TK_{gst} L382D/D470S. NMR spectra for **2b** obtained with either TK_{gst}: ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 1.19 (d, J = 6.4 Hz, 3H, 5-H), 3.95 (dq, 1H, 4-H), 4.07 (d, J = 5.1 Hz, 1H, 3-H), 4.43 (d, J = 19.4 Hz, 1H, 1_b-H), 4.54 (d, J = 19.4 Hz, 1H, 1_a-H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD): δ = 18.6 (C-5), 68.0 (C-1), 70.0 (C-4), 80.3 (C-3), 213.1 (C-2). HR-MS: m/z (**2b** obtained with wild-type TK_{gst}) = 157.0482, m/z (**2b** obtained with TK_{gst} L382D/D470S) = 157.0468, calculated for (M + Na)⁺: 157.0471.

Acknowledgements

The authors thank the French National Research Agency (grant ANR-13-IS07-0003-01 to LH) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant Fe244/10-1 to WDF) for financial support under the ThermoTK research program, as well as the PHC-DAAD Procope (No. 30731UC) and ESF project COST CM1303 for supporting the collaboration.

References

- [1] a) E. Racker, G. de La Haba, I. G. Leder, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 1010–1011; b) J. Bolte, C. Demuynck, H. Samaki, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5525–5528; c) C. Demuynck, J. Bolte, L. Hecquet, V. Dalmas, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5085–5088; d) Y. Kobori, D. C. Myles, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5899–5907; K. G. Morris, M. E. B. Smith, N. J. Turner, M. D. Lilly, R. K. Mitra, J. M. Woodley, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 2185–2188.
- [2] a) M. Sundström, Y. Lindqvist, G. Schneider, U. Hellman, H. Ronne, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24346–24352; b) U. Nilsson, L. Meshalkina, Y. Lindqvist, G. Schneider, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 1864–1869.
- [3] a) G. A. Sprenger, U. Schörken, G. Sprenger, H. Sahn, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 525–532; b) J. Littlechild, N. Turner, G. Hobbs, M. Lilly, A. Rawas, H. Watson, *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1995**, *51*, 1074–1076; c) G. R. Hobbs, R. K. Mitra, R. P. Chauhan, J. M. Woodley, M. D. Lilly, *J. Biotechnol.* **1996**, *45*, 173–179.
- [4] a) T. Ziegler, A. Straub, F. Effenberger, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 737–738; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 716–717; b) F. Effenberger, V. Null, T. Ziegler, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5157–5160; c) L. Hecquet, J. Bolte, C. Demuynck, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 8223–8232; d) F. T. Zimmermann, A. Schneider, U. Schörken, G. A. Sprenger, W. D. Fessner, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1643–1646; e) N. J. Turner, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 527–531; f) W.-D. Fessner, V. Helaine, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 574–586; g) F. Charmantray, V. Helaine, B. Légeret, L. Hecquet, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2009**, *57*, 6–9.
- [5] a) W.-D. Fessner, *New Biotechnology* **2015**, in press, DOI: 10.1016/j.nbt.2014.11.007; b) D. Tessaro, L. Pollegioni, L. Piubelli, P. D'Arrigo, S. Servi, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 1604–1608.
- [6] J. Abdoul Zabbar, I. Sorel, V. Hélaïne, F. Charmantray, T. Devamani, D. Yi, V. de Berardinis, D. Louis, P. Marlière, W.-D. Fessner, L. Hecquet, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 116–128.
- [7] D. Yi, T. Saravanan, T. Devamani, F. Charmantray, L. Hecquet, W.-D. Fessner, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 480–483.
- [8] a) M. E. B. Smith, E. G. Hibbert, A. B. Jones, P. A. Dalby, H. C. Hailes, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2631–2638; b) J. L. Galman, D. Steadmann, S. Bacon, P. Morris, M. E. B. Smith, J. Ward, P. A. Dalby, H. C. Hailes, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7608–7610; c) A. Cázares, J. L. Galman, L. G. Crago, M. E. Smith, J. Strafford, L. Ríos-Solís, G. J. Lye, P. A. Dalby, H. C. Hailes, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1301–1309.
- [9] D. Yi, T. Devamani, J. Abdoul-Zabbar, F. Charmantray, V. Helaine, L. Hecquet, W.-D. Fessner, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2290–2300.
- [10] U. Nilson, L. Hecquet, T. Gefflaut, C. Guerard, G. Schneider, *FEBS Lett.* **1998**, *424*, 49–52.
- [11] L. Hecquet, W.-D. Fessner, V. Hélaïne, F. Charmantray, in: *Cascade Biocatalysis: Integrating Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*, (Eds.: S. Riva, W.-D. Fessner), Wiley-VCH, Weinheim, **2014**, pp 315–338.

- [12] G. Meher, R. R. Krishnamurthy, *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 703–707.
- [13] Y.-W. Zhang, P. Prabhu, J.-K. Lee, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2010**, *33*, 741–748.
- [14] a) J. Badía, R. Gimenez, L. Baldomà, E. Barnes, W.-D. Fessner, J. Aguilar, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 5144–5150; b) W.-D. Fessner, J. Badía, O. Eyrisch, A. Schneider, G. Sinerius, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5231–5234; c) J. C. Sánchez, R. Gimenez, A. Schneider, W.-D. Fessner, L. Baldomà, J. Aguilar, J. Badía, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 29665–29669.
- [15] a) L. S. Jeong, R. F. Schinazi, J. W. Beach, H. O. Kim, S. Nampalli, K. Shanmuganathan, A. J. Alves, A. McMullan, C. K. Chu, R. Mathis, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 181–195; b) E. Sabini, S. Hazra, M. Konrad, S. K. Burley, A. Lavie, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 186–192; c) K. L. Grove, X. Guo, S.-H. Liu, Z. Gao, C. K. Chu, Y.-C. Cheng, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 3008–3011.
- [16] B. Zagalak, P. A. Frey, G. L. Karabatsos, R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 3028–3035.
- [17] P. A. Levene, R. S. Tipson, *J. Biol. Chem.* **1936**, *115*, 731–747.
- [18] T. Vuorinen, A. S. Serianni, *Carbohydr. Res.* **1991**, *209*, 13–31.



Cite this: DOI: 10.1039/c6gc02015a

One-pot, two-step cascade synthesis of naturally rare *L*-erythro (3*S*,4*S*) ketoses by coupling a thermostable transaminase and transketolase†

Marion Lorillière,^{a,b} Maxime De Sousa,^{a,b} Felipe Bruna,^{a,b} Egon Heuson,^{a,b} Thierry Gefflaut,^{a,b} Véronique de Berardinis,^{c,d,e} Thangavelu Saravanan,^f Dong Yi,^f Wolf-Dieter Fessner,^f Franck Charmantray^{*a,b} and Laurence Hecquet^{*a,b}

An efficient simultaneous cascade of two enzymatic steps catalyzed by a thermostable transaminase and transketolase was performed at elevated temperatures allowing the synthesis of naturally rare *L*-erythro (3*S*,4*S*) ketoses. *L*-ribulose, 5-deoxy-*L*-ribulose, *D*-tagatose and *L*-psicose, which are highly valuable chiral building blocks and display prominent biological properties, were obtained on a preparative scale with excellent stereoselectivities and good yields. A thermostable transketolase from *Geobacillus stearothermophilus* catalyzed at high temperatures the stereospecific synthesis of *L*-erythro (3*S*,4*S*)-configured ketoses from (2*S*)-hydroxylated aldehydes and β -hydroxyppyruvate in which the latter is generated in an unprecedented manner *in situ* from natural *L*-serine and pyruvate using a novel thermostable *L*- α -transaminase from the thermophilic bacterium *Thermosinus carboxydivorans*. Overall, this cascade synthesis prevents the thermal decomposition of the labile β -hydroxyppyruvate and offers an efficient and environmentally friendly procedure.

Received 22nd July 2016,
Accepted 7th September 2016

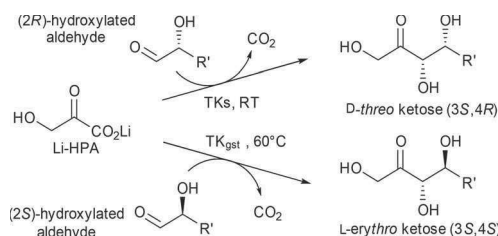
DOI: 10.1039/c6gc02015a

www.rsc.org/greenchem

Introduction

In polyol and carbohydrate chemistry, the inherent problems of regioselectivity, chemoselectivity and stereoselectivity are a challenge for traditional methods of organic synthesis requiring sophisticated protective group strategies. By contrast, the high chemo-, regio- and stereoselectivity of enzymes makes the use of protective groups unnecessary and enables reaction pathways with fewer steps under mild reaction conditions. To date, enzymes catalyzing the stereospecific C–C bond formation have found some useful applications in the synthesis of complex carbohydrates, sugar analogues and related biologically important natural compounds, and are widely used as pharmaceutical or nutraceutical products, food additives and cosmetics.^{1,2} The

enzyme transketolase (TK), a thiamine diphosphate (ThDP)-dependent enzyme, yields *D*-threo ketoses having a (3*S*,4*R*)-configuration by C–C bond formation.³ TK is highly specific for ketol donor substrates, stereospecific for forming the new asymmetric center in an (*S*) configuration and enantioselective towards 2-hydroxyaldehyde acceptor substrates with an (*R*) configuration. Interestingly, commercial lithium β -hydroxyppyruvate (Li-HPA) can be used as a donor substrate, making the ketol transfer irreversible owing to its decarboxylation catalyzed by TK.⁴ Hence, Li-HPA is extensively used in biocatalysis and makes TK an ideal tool for synthetic purposes.⁵ Mesophilic TK enzymes from yeast (TK_{sc}) and from *E. coli* (TK_{ec}) have been largely used for organic synthesis⁶ (Scheme 1). Moreover,



Scheme 1 Irreversible TK reaction with lithium β -hydroxyppyruvate (Li-HPA) and (2*R*) α -hydroxyaldehydes at room temperature (RT) using TK_{sc}, TK_{ec}, and TK_{gst}, or with (2*S*) α -hydroxyaldehydes at 60 °C using TK_{gst}.

^aClermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448F-63000 Clermont-Ferrand, France.

E-mail: laurence.hecquet@univ-bpclermont.fr

^bCNRS, UMR 6296, ICCF, F-63177 Aubière, France

^cCEA, DRF, IG, Genoscope, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry, France

^dCNRS-UMR8030 Génomique Métabolique, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry, France

^eUniversité Evry Val d'Essonne, Boulevard François Mitterrand, 91025 Evry, France

^fInstitut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt, Alarich-Weiss-Straße 4, 64287 Darmstadt, Germany

†Electronic supplementary information (ESI) available: Electrophoresis, the TA_{tea} gene sequence, kinetic parameters of TK_{gst} cofactors, cascade reaction monitoring, and products' NMR spectra. See DOI: 10.1039/c6gc02015a

efficient TK_{eco} variants have been obtained by active-site directed mutagenesis to improve TK properties towards hydroxylated and non-hydroxylated acceptors.⁷

Thermostable enzymes offer many advantages, such as improved solubility of organic substrates at elevated temperatures, increased tolerance toward unconventional media and greater resistance to protein destabilizing factors introduced by mutagenesis.⁸ Thermostable enzymes, which have been found mainly in thermophilic organisms, have led to a number of commercial applications.⁹ Advances in this area have been made possible by the availability of new genome sequences from thermophilic microbial sources, providing DNA from hardly cultivatable organisms.

We recently cloned and overexpressed the first thermostable TK (A0A019QGZ2) from the thermophilic bacterium *Geobacillus stearothermophilus* (TK_{gst}). TK_{gst} has an optimum temperature range of 60–70 °C and retained full activity for one week at 50 °C and for 3 days at 65 °C.¹⁰ At high temperatures, the stereospecificity of TK_{gst} proved identical to that of other TK sources, generating a (3*S*) configuration. TK_{gst}, like other TK sources, preferentially accepts (2*R*)-hydroxylated aldehydes with a short carbon chain. In addition to these properties, TK_{gst} offers new synthetic opportunities. Its robustness in ionic liquids, used as a co-solvent in aqueous solution, has been used to increase the conversion rate of *D*-ribose into *D*-altro-heptulose.¹¹ Remarkably, at high temperatures, TK_{gst} was also able to accept (2*S*)-hydroxylated aldehydes yielding (3*S*,4*S*) ketoses stereospecifically. None of the mesophilic TKs have been reported to catalyze the conversion of (2*S*)-configured hydroxyaldehydes (Scheme 1).¹² This side activity of TK_{gst} with *L*-glyceraldehyde was 32 times weaker at 25 °C than that obtained with *D*-glyceraldehyde for instance. To improve TK_{gst} properties, TK_{gst} variants were designed that displayed enhanced activities towards various aldehydes.^{12,13}

For synthetic purposes, the main problem of TK_{gst}-catalyzed reactions at high temperatures is the limited stability of the artificial donor substrate Li-HPA. Instead of the costly commercial material, this compound can also be synthesized by hydrolysis of bromopyruvic acid with lithium hydroxide. However, Li-HPA is recovered in moderate yield through a tedious purification step.¹⁴ Generation of HPA *in situ* for coupling to the TK-catalyzed reaction has already been described at room temperature,^{15,16} in particular with a microbial transaminase (TA) from natural and affordable *L*-serine in a sequential cascade.¹⁶ TAs are pyridoxal phosphate (PLP)-dependent enzymes which catalyze the reversible transfer of an α -amino group between a donor substrate and a carbonyl acceptor. The TA family is highly diverse, including many ubiquitous *L*- α -transaminases (*L*- α -TAs) that play a key role in most protei-nogenic *L*- α -amino acid metabolisms. The potential of TAs for chiral amines synthesis has been largely demonstrated, while more promiscuous enzymes are still in high demand.¹⁷

Here we report on the identification and characterization of a novel thermostable serine-glyoxylic acid *L*- α -TA (A1HUC4) from the thermophilic bacterium *Thermosinus carboxydvorans* DSM 14886 (TA_{tca}) and its use in an efficient two-step simul-

taneous cascade catalyzed by a TA_{tca}/TK_{gst} tandem at elevated temperatures for the preparation of highly valuable and naturally rare *L*-erythro (3*S*,4*S*)-ketoses. Such a configuration is currently inaccessible with mesophilic TKs and to our knowledge, no such thermostable *L*- α -TA has been used previously for the biocatalyzed synthesis of HPA at high temperatures and on a preparative scale. Within the TA_{tca}/TK_{gst} cascade, the overall equilibrium of the TA_{tca}-catalyzed reaction from *L*-serine and pyruvic acid is shifted towards HPA and *L*-alanine by coupling to the irreversible TK_{gst}-catalyzed reaction. The procedure was applied for the synthesis of *L*-erythro (3*S*,4*S*)-pentuloses, *L*-ribulose and its analogue 5-deoxy-*L*-ribulose. *L*-Ribulose is an important chiral lead molecule¹⁹ particularly used for the preparation of *L*-ribose, a high-value rare sugar needed for the synthesis of antiviral *L*-nucleosides.²⁰ We also prepared two *L*-erythro (3*S*,4*S*)-hexuloses such as *D*-tagatose, important for numerous applications in nutrition and pharmaceuticals²¹, and *L*-psicose, which is a chiral building block used for the synthesis of other rare *L*-sugars²² and recently reported as an antiviral compound.²³ The irreversible C–C bond formation catalyzed by TK and the stereoselectivity of this enzyme are the major advantages to improve the environmental impact allowing the total conversion of the donor and acceptor substrates and the formation of only one stereoisomer of each product. In comparison, other enzymatic methods can lead to incomplete conversion of the substrate other than the formation of additional stereoisomers of the product due to the reversibility of the synthetic reaction and/or the low stereoselectivity of enzymes, respectively. For example, the *L*-arabinose isomerase catalyzes reversible enzymatic isomerization of *L*-arabinose (or *D*-galactose) and does not favor the products *L*-ribulose (or *D*-tagatose),²⁴ ribitol was only partially dehydrogenated into *L*-ribulose by *Gluconobacter oxydans*,²⁵ and also the nonstereoselective aldolase-catalyzed addition to *L*-glyceraldehyde led to a mixture of *L*-psicose and *L*-sorbose.²⁶ Any undesired stereoisomer of the product as well as the remaining substrate, with properties similar to the product, must be removed by tedious purification steps including significant amounts of solvents or salts to obtain an optically pure final product.

Results and discussion

Lithium β -hydroxypruvate stability and kinetic parameters measured with TK_{gst}

The key donor substrate used for making the TK_{gst} reaction irreversible is Li-HPA.¹⁴ We first determined kinetic parameters relative to this donor and compared the values with those obtained with TK_{eco} and TK_{sce}, both commonly used in biocatalysis (Table 1). Li-HPA showed a better affinity for TK_{gst} than for the other TKs (7 and 13 times lower K_M and 2 to 68 times higher v_{max} compared to TK_{eco} and TK_{sce} respectively). Therefore, Li-HPA can be considered as a better substrate for TK_{gst} than for the other TK sources.

Li-HPA stability had been studied previously in water and buffered solutions and the results clearly showed increased

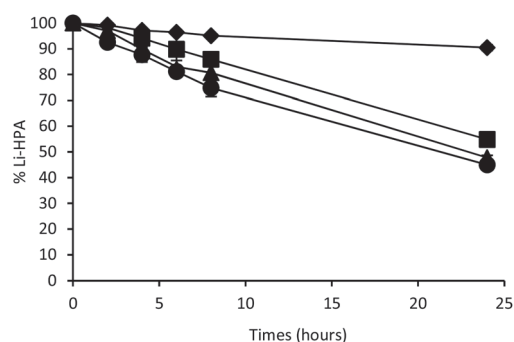
Table 1 Kinetic parameters relative to Li-HPA for different TK sources at 25 °C

TK	K_M , mM	v_{max} , U mg ⁻¹	v_{max}/K_M , U mg ⁻¹ mM
TK _{gst}	2.5 ± 0.2	135 ± 7	54 ± 7
TK _{eco}	18 (ref. 27)	60 (ref. 27)	3
TK _{see}	33 (ref. 28)	2 (ref. 28)	0.06

Reaction conditions: ThDP (2.4 mM), MgCl₂ (9 mM), glycolaldehyde (50 mM), Li-HPA (0.5–50 mM), TK (0.0125–0.25 U mL⁻¹), glycylglycine buffer (50 mM, pH 7.5). Li-HPA consumption was determined by spectrophotometry at 340 nm from aliquots added to an assay solution containing L-lactic dehydrogenase and NADH.

degradation at high temperatures and low decomposition in pure water.^{10,28} Other studies reported that basic conditions²⁹ enhanced HPA degradation while acidic conditions increased the HPA stability at high temperatures.¹⁴ Considering these data and the optimum pH of TK_{gst}, the Li-HPA stability was studied at different temperatures in water over 24 h and in the presence of both TK cofactors at pH 7. In this study, pH was continuously adjusted at 7 by pH-stat control (Fig. 1). We observed that high concentrations of TK cofactors previously used in biocatalysis (2.4 mM ThDP, 9 mM MgCl₂) promote Li-HPA degradation. For this reason, we decreased these concentrations to 0.1 mM ThDP and 1 mM MgCl₂ in accordance with TK_{gst} kinetics parameters (ESI[†]). After 24 h at 20 °C and 65 °C, 90% and 45% of initial Li-HPA were recovered, respectively, from the reaction mixture.

Even under such optimized conditions, Li-HPA decomposition over time remains problematic above 20 °C, particularly for biocatalytic applications of TK_{gst} with poor acceptor substrates that require extended reaction times. HPA degradation was observed irrespective of the counter-ion used (Li⁺, Na⁺ or K⁺). The analysis of the mixture by ¹H NMR after 24 h showed the formation of glycolic acid as a major product and traces of erythrulose. Glycolic acid has never been reported in the literature as an ultimate degradation product of Li-HPA. It may be formed by decarboxylation of HPA through oxidative C–C bond cleavage. In the literature, the formation of glycolaldehyde has been described together with the formation of

**Fig. 1** Li-HPA stability over time in H₂O at pH 7 (controlled by the pH stat) and at 25 °C (◆), 50 °C (■), 60 °C (▲) and 65 °C (●). Li-HPA (50 mM), ThDP (0.1 mM), MgCl₂ (1 mM).

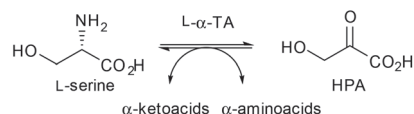
erythrulose resulting in chemical condensation of glycolaldehyde from the residual Li-HPA.^{14,30}

To prevent HPA decomposition, by-products formation at high temperatures and consequently to optimize the TK_{gst} reaction, we opted for *in situ* generation of HPA, which should be continuously consumed by TK_{gst}. For this purpose and also to develop an environmentally friendly HPA synthesis, we turned to an enzymatic transamination of L-serine.

Identification and characterization of a novel L-α-transaminase

Our goal was to produce *in situ* the α-ketoacid HPA from the naturally occurring α-amino acid L-serine at high temperatures, a procedure reported only at room temperature with microbial mesophilic L-α-TAs.¹⁶ To find such a potentially thermostable L-α-transaminase, we screened a 232 member library of α-TAs from Genoscope strain collection.¹⁸ This library containing putative D/L-α-TAs was previously screened using L- or D-cysteine sulfinic acid (CSA) as an irreversible amino donor and with various keto acids, including Li-HPA as acceptors.¹⁸ Among these enzymes, we selected 9 putative L-α-TAs showing the best activities with Li-HPA. These 9 enzymes were screened again using L-serine as the donor substrate and either one of three common α-keto acids as the acceptor substrate: glyoxylic, pyruvic and α-ketoglutaric acids (Scheme 2).

The assay was based on the selective detection of 2-hydroxy ketone by reaction with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-tetrazolium (WST-1) as a water-soluble tetrazolium salt. WST-1 was also used for the determination of the activity of enzymes³¹ including pyruvic acid decarboxylase, TK and TA. TA activity was measured following a discontinuous assay in which aliquots of TA-catalyzed reactions were regularly taken out and were assayed separately with WST-1 under basic conditions at 60 °C. The reaction generates a blue formazan color which was followed by measuring its absorbance at λ = 600 nm (ε = 42 000 M⁻¹ cm⁻¹).³² The results obtained with L-serine as the amino donor showed that 4 TAs displayed significant activities above 10 mU mg⁻¹ at 20 °C whatever the ketoacid assayed (Fig. 2). Among these 4 TAs, only one TA, annotated as serine-glyoxylic acid TA (ID Uniprot A1HUC4) from the thermophilic bacterium *Thermosinus carboxydivorans* DSM 14886 (TA_{tca}), showed an increased activity at 60 °C and remained active at this temperature for hours. The gene encoding for TA_{tca} (ESI[†]) was cloned into an expression vector with a His₆-tag at the N-terminus of the enzyme for purification purposes. Sequencing validation showed that the protein sequence of TA_{tca} is identical to A1HUC4 of *Thermosinus carboxydivorans* Nor1, which was used as a template for primer design.

**Scheme 2** L-α-Transaminase (L-α-TA) reaction with L-serine yielding hydroxyppyruvate (HPA).

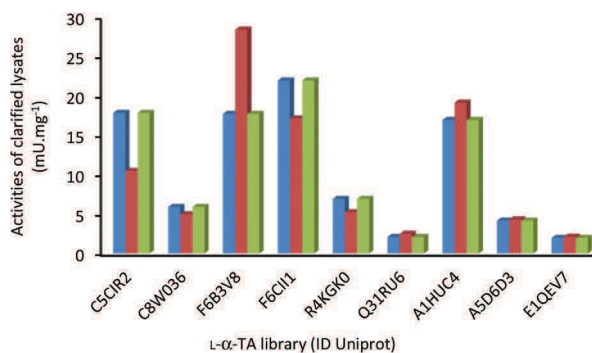


Fig. 2 L- α -TA specific activities in clarified lysates towards L-serine as the amino donor and α -ketoacid as the acceptor such as ■ pyruvic acid, ■ glyoxylic acid and ■ α -ketoglutaric acid. Reaction conditions: L-serine (5 mM), α -ketoacids (5 mM), clarified lysates (5 μ L), PLP (0.2 mM), HEPES buffer (100 mM), 20 $^{\circ}$ C, pH 7.5.

After expression in *Escherichia coli* strain BL21(DE3)pLysE, TA_{tca} was extracted by sonication. The expressed His₆-tagged protein was applied to a Ni²⁺ chelating affinity column for purification. By this procedure, 203 mg of purified TA_{tca} was obtained from the cells grown in 1 L of culture (Table 2).

Throughout this study, the TA_{tca} activity was measured with L-serine and α -ketoglutaric acid, the most frequently used ketoacid acceptor of α -TA. Purified TA_{tca} displays a specific activity of 3.5 U mg⁻¹ at 25 $^{\circ}$ C. TA_{tca} can be lyophilized or precipitated with ammonium sulfate and stored at 4 $^{\circ}$ C without loss of activity for several months. The influence of temperature on TA_{tca} activity was studied in the range between 20 and 80 $^{\circ}$ C after 40 minutes of incubation (Fig. 3). TA_{tca} showed an optimum temperature of 60 $^{\circ}$ C, giving an up to 5-fold improvement relative to the activity measured at 20 $^{\circ}$ C. The optimal activity of TA_{tca} was determined around pH 8.2–8.5 when assayed at 25 $^{\circ}$ C. TA_{tca} thermostability at 60 $^{\circ}$ C, corresponding to the optimum temperature of this enzyme, was studied by measuring the residual enzymatic activity over 10 days with L-serine and α -ketoglutaric acid. TA_{tca} maintained 100% of its activity for 4 days and 50% for 10 days. Other serine-pyruvic acid TAs from thermophilic bacteria recently reported in the literature were stable for only 10 minutes at 70 $^{\circ}$ C.³³

Kinetic parameters K_M and v_{max} of L-serine and pyruvic acid were determined at 25 $^{\circ}$ C and were calculated from the Hanes-Woolf plot according to the least-squares method as summarized in Table 3. Pyruvic acid was chosen as the acceptor substrate because we observed an inhibition of TA_{tca} when

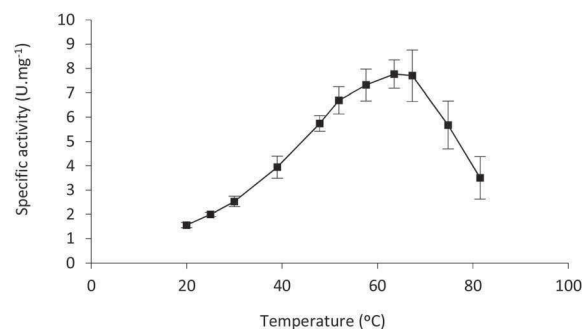


Fig. 3 Thermal activity profile of TA_{tca}. Activity was measured after 30 minutes in the presence of L-serine (100 mM), α -ketoglutaric acid (3 mM), PLP (0.2 mM), and HEPES (100 mM) at pH 7.5.

Table 3 Kinetic constants of TA_{tca}

Substrates	K_M app (mM)	v_{max} app, U mg ⁻¹	v_{max}/K_M , U mg ⁻¹ mM
Donor L-serine ^a	22.4 \pm 0.3	3.3 \pm 0.1	0.14 \pm 0.01
Acceptor pyruvic acid ^b	12.8 \pm 0.7	8.1 \pm 0.5	0.63

^a 50 mM of pyruvic acid and L-serine concentrations varying from 1 mM to 250 mM were used. ^b 250 mM of L-serine and pyruvic acid concentrations varying from 0.25 mM to 50 mM were used.

using glyoxylic acid and α -ketoglutaric acid above 5 mM and 3 mM, respectively. However, when using pyruvic acid, noticeable inhibition only occurred at concentrations higher than 50 mM. The results showed higher affinity towards the acceptor pyruvic acid when compared to the amino donor L-serine, as reported with other α -TAs used in biocatalysis.¹⁶

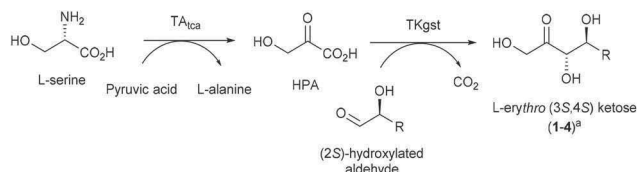
Preparative scale synthesis of L-erythro (3S,4S) ketoses

We have demonstrated before that TA_{tca} and TK_{gst} are thermostable enzymes exhibiting high efficiency at 60 $^{\circ}$ C. Moreover, we previously showed that at high temperatures, TK_{gst} catalyzed the synthesis of L-erythro (3S,4S) ketoses from (2S)-hydroxylated aldehydes and synthetic Li-HPA. We reported the synthesis of L-ribulose and 5-deoxy-L-ribulose from (2S)-glycer-aldehyde and (2S)-lactaldehyde that were not hitherto mentioned as possible substrates of mesophilic TKs.¹² The main problem of TK_{gst}-catalyzed reactions at high temperatures was the instability of Li-HPA. To prevent its decomposition, we investigated the coupling of TA_{tca} and TK_{gst} in a single reactor at 60 $^{\circ}$ C, for an integrated synthesis of different L-erythro

Table 2 Purification of TA_{tca} from recombinant *E. coli* cells

Purification step	Protein ^a , mg	Total activity ^b , U	Specific activity ^b , U mg ⁻¹	Yield, %	Purification XX-fold
Clarified lysate	572	929	1.1	—	—
Purified TA _{tca}	203	717	3.5	77.2	3.2

^a Crude extract obtained after sonication of *E. coli* cells overexpressing TA_{tca} harvested from 1 L of culture. ^b Activity measured in the presence of L-serine and α -ketoglutaric acid as donor and acceptor substrates, respectively, in HEPES buffer, at 25 $^{\circ}$ C. HPA released was measured spectrophotometrically at 600 nm via a discontinuous assay involving WST-1 (Experimental part).



Scheme 3 Enzymatic cascade synthesis of L-erythro (3S,4S) ketoses catalyzed by TA_{tca} and TK_{gst} at 60 °C. ^aR = -CH₂OH (L-ribulose 1); R = -CH₃ (5-deoxy-L-ribulose 2); R = -CHOH(R)-CH₂OH (D-tagatose 3); R = -CHOH(S)-CH₂OH (L-psicose 4).

(3S,4S) ketoses from appropriate (2S)-hydroxylated aldehydes, L-serine, and pyruvic acid (Scheme 3, Table 4).

Firstly, we compared the initial TK_{gst} velocities at 25 °C and 60 °C, using chemically synthesized Li-HPA as a donor toward several (2S)-hydroxylated aldehydes having 3 to 6 carbon chain length. These included L-glyceraldehyde and L-lactaldehyde (3 carbon atoms), D-threose and L-erythrose (4 carbon atoms), D-arabinose and D-xylose (5 carbon atoms) and D-mannose (6 carbon atoms) (Fig. 4). We note that TK_{gst} activities decreased with the carbon chain length as reported earlier for (2R)-hydroxylated aldehydes.³⁴ The best TK_{gst} activities were obtained with L-glyceraldehyde and L-lactaldehyde while D-threose and L-erythrose gave lower TK_{gst} activities. A temperature increase from 25 °C to 60 °C enhanced TK_{gst} activities 4.8-fold when using L-glyceraldehyde, 3.8-fold using L-lactaldehyde, and 5-fold with D-threose and L-erythrose (Fig. 4). No detectable activities were observed with D-arabinose, D-xylose, and D-mannose.

Then, we performed at 60 °C the one-pot, two-step simultaneous cascade synthesis catalyzed by TA_{tca} and TK_{gst} from L-serine and pyruvic acid as TA_{tca} substrates using the best four (2S)-hydroxylated aldehydes as TK_{gst} substrates, L-glyceraldehyde, L-lactaldehyde, D-threose and L-erythrose for the synthesis of the corresponding L-erythro (3S,4S) ketoses, L-ribulose 1, 5-deoxy-L-ribulose 2, D-tagatose 3 and L-psicose 4 (Scheme 3). To study the influence of different amounts of both enzymes and substrate concentrations, the reaction was monitored by *in situ* ¹H NMR, using 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteriopropionate (TSP-d₄) as an internal standard. It was hence possible to quantify the conversion rates of aldehydes and pyruvic acid along with the formation of ketose products. It should be noted that all the different substrates

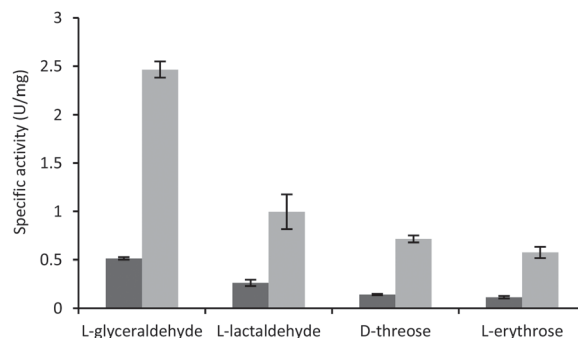


Fig. 4 Effect of temperature, 25 °C ■ and 60 °C ■, on TK_{gst} activity toward different (2S)-hydroxylated aldehydes. The activities were measured using aldehydes (100 mM), Li-HPA (50 mM), ThDP (0.1 mM), MgCl₂ (1 mM), triethanolamine buffer (2 mM), at pH 7.15.

assayed at 60 °C were found to be stable except pyruvic acid, which slowly decomposed with a half-life of 4 days. The best conversion rate of L-glyceraldehyde was achieved using 3 equivalents of L-serine in combination with 1 equivalent of pyruvic acid. The amounts of TA_{tca} and TK_{gst} were adjusted to prevent the accumulation of HPA that also decomposed gradually at 60 °C. Under these conditions, the time course of the reaction showed the total conversion of pyruvic acid and L-glyceraldehyde after 24 h along with the concomitant quantitative formation of the ketose product (ESI⁺). These conditions were also applied for the conversion of L-lactaldehyde and the conversion results were similar (ESI⁺). For product 2, being less hydrophilic than 1, 3 and 4, purification was facilitated hence this compound 2 was isolated with higher yield (98%) compared to the other products (51–56%) (Table 4). In the case of D-threose and L-erythrose for which TK_{gst} shows low activities (Fig. 4), 2 equivalents of pyruvic acid and a greater quantity of TK_{gst} (4.8 mg TA_{tca}/10 mg TK_{gst}) were used (Table 4). To avoid the inhibition of TA_{tca} by pyruvic acid above 50 mM, this compound was added in two portions, the second portion being introduced after 48 h (complete disappearance of the first portion). We observed the total conversion of D-threose and L-erythrose and simultaneously the quantitative formation of the ketose products 3 and 4, respectively (ESI⁺). Finally, L-ribulose 1, 5-deoxy-L-ribulose 2, D-tagatose 3 and L-psicose 4 were obtained with good to excellent isolated yields: 56%, 98%, 52% and 51%, respectively, after reasonable

Table 4 Reaction conditions and results of the one-pot simultaneous two-step cascade synthesis of L-erythro (3S,4S) ketoses 1–4

Aldehydes	Products	TA _{tca} /TK _{gst} (mg)	Conversion rate of aldehyde ^b (%)	Reaction time (h)	Isolated product yield ^a (%)	de (%)
L-glyceraldehyde CHO-CHOH(S)-CH ₂ OH	L-ribulose 1	4.8/6	100	24	56	>95
L-lactaldehyde CHO-CHOH(S)-CH ₃	5-deoxy-L-ribulose 2	4.8/6	100	24	98	>95
D-threose CHO-CHOH(S)-CHOH(R)-CH ₂ OH	D-tagatose 3	4.8/10	>95	72	52	>95
L-erythrose CHO-CHOH(S)-CHOH(S)-CH ₂ OH	L-psicose 4	4.8/10	>95	96	51	>95

^a Reactions conditions: L-serine (150 mM), aldehydes (50 mM), pyruvic acid (50 mM for L-glyceraldehyde and L-lactaldehyde and 100 mM for D-threose and L-erythrose conversion) were used. ^b Determined using quantitative ¹H NMR relative to 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteriopropionate (TSPd₄) as the internal standard.

reaction times of 24 to 96 h. It is noteworthy that the isolated yields of *L*-ribulose and 5-deoxy-*L*-ribulose obtained with this cascade process were 5 and 3 times higher (56% and 98%) than those obtained with synthetic Li-HPA (11% and 33%) as reported earlier.¹² The four *L*-erythro (3*S*,4*S*) ketoses were obtained in optically pure forms with high diastereoselectivity (d.e. >95%, by ¹³C NMR). Furthermore, the absolute configurations of **1–4** were confirmed by comparing the optical rotations with those reported in the literature. The characterization data confirmed that the four TK_{gst} catalyzed reactions led to a single ketose with the *L*-erythro (3*S*,4*S*) configuration which was consistent with the stereoselectivity observed in TK_{gst} reactions at high temperatures with other aldehyde acceptors.^{10,12,13}

Besides the interest in the products and the efficiency of the biocatalytic process, the environmental impact assessment must be compared with other synthetic strategies:

(i) The sub-products formed are natural *L*-serine and *L*-alanine, together with CO₂ which in solution forms bicarbonate ions. The removal of these sub-products did not require an additional purification step because they were easily separated from the desired major product by simple chromatography. *L*-Amino acids were recovered and could be recycled for other reactions. The biocatalytic one-pot, two-step cascade process avoids the commonly used chemical synthesis of Li-HPA from bromopyruvate,¹⁴ which generates toxic wastes (incomplete yield, hydrobromic acid and bromine fumes) and requires additional purification steps (washing, crystallization and filtration using salts and chemicals).

(ii) The amount of wastes generated by biocatalytic approaches must be considered to evaluate the environmental impact of a process. Some metrics, especially the *E* factor ($m_{\text{wastes}}/m_{\text{product}}$),^{46,47} allow a fast quantification of wastes for comparison with other processes despite some shortcomings⁴⁸ (*E* factor neither includes energy use or the nature of waste). A value of 0 is optimal with no generation of sub-products and 100% yield. For the synthesis of compounds **1**, **2**, **3** and **4** using the one-pot two-step sequence generating HPA *in situ*, the values of *E* factors are around 7, 4, 7.5 and 7.5 respectively (ESI†). In the case of products **1** and **2**, we have compared these *E* factor values with those obtained using the process we have recently published involving two individual steps, in which Li-HPA was firstly synthesized chemically from bromopyruvate and then used as the TK_{gst} donor substrate.¹² We obtained *E* factor values around 74 for **1** and 53.5 for **2** (ESI†), higher than those obtained using the cascade synthesis, essentially due to the low yields of both steps (50% yield for Li-HPA synthesis, 11% and 33% for **1** and **2** synthesis respectively). The major advantage of the cascade procedure is the total conversion of the TK_{gst} aldehyde acceptor allowed by the gradual use of HPA by TK_{gst} leading to higher yields (56% for **1** and 98% for **2**) as mentioned before and avoiding the decomposition of HPA occurring with the sequential process using chemically prepared Li-HPA. A comparison of these results with *E* factors for other biocatalytic or organocatalytic strategies is not easy. Particularly, when the final product is not fully purified or no

isolated yield is given, this makes the corresponding *E* factor undervalued. For example, the equilibrium constants for the reversible isomerization process to convert *D*-galactose into *D*-tagatose or *L*-arabinose into *L*-ribulose are not in favor of the products (90/10), so that the reaction mixture contained the remaining substrate but the final product was not purified.²⁴ An interesting aldolase-catalyzed process using an engineered *Corynebacterium glutamicum* strain²⁶ has been studied for the synthesis of *L*-psicose from *L*-glyceraldehyde and dihydroxyacetone phosphate (generated intracellularly *via* the glycolytic pathway) but the conversion rate was low, and the non-stereoselective process led mostly to the stereoisomeric product *L*-sorbose (60/40), which was not removed by purification. An aldol reaction catalyzed by (*S*)-proline has also been used for the synthesis of ketoses such as *L*-ribulose or 5-deoxy-*L*-ribulose from a synthetic dioxanone (adding its own *E* factor) in good yield but the major drawbacks were the use of the organic solvent DMF and the need for an additional deprotection step to obtain the final product in an unprotected form.⁴⁹

(iii) The procedures of enzyme purification should also be considered in environmental evaluations as mentioned in a recent review.⁴⁷ Generally, the purification of tagged enzymes is performed by affinity chromatography using significant amounts of salts, buffers and other chemicals. Thermostable enzymes from the thermophilic origin expressed in standard *E. coli* expression systems are gaining relevance because target enzymes are easily purified by a single heat treatment step that removes inactivated host proteins. We have already reported that this type of TK_{gst} purification yields an enzyme of the same purity as that obtained by affinity chromatography. This procedure can be applied for the purification of both thermostable TA_{tca} and TK_{gst} to improve the environmental impact of the process.

Conclusions

The synthesis of *L*-erythro (3*S*,4*S*) ketoses, such as *L*-ribulose, 5-deoxy-*L*-ribulose, *D*-tagatose and *L*-psicose, which are highly valuable compounds, was performed at 60 °C from the corresponding (2*S*)-hydroxylated aldehydes with excellent stereoselectivity and high yields using an efficient one-pot, two-step cascade sequence catalyzed by thermostable TA_{tca} and TK_{gst}. The *L*-erythro (3*S*,4*S*) configuration is otherwise inaccessible using mesophilic TKs, which exclusively lead to *D*-threo (3*S*,4*R*) configured ketoses from (2*R*)-hydroxylated aldehydes. The efficiency of this approach was based on a novel thermostable TA_{tca}, characterized in this study, allowing the *in situ* generation of HPA, the TK_{gst} donor substrate, at 60 °C from natural *L*-serine and pyruvate. Thereby, sensitive HPA is readily converted by TK_{gst}-catalysis, which avoids HPA accumulation and decomposition. This environmentally friendly procedure, never investigated at elevated temperatures, reveals an interesting alternative to the conventional chemical synthesis of HPA. TK_{gst} activities towards the (2*S*)- α -hydroxylated aldehydes, which are generally poor TK_{gst} substrates, were greatly

enhanced by performing the reactions at higher temperature, leading to excellent conversion rates within a reasonable time (24 h to 96 h). This straightforward approach could be applied with other types of aldehydes using wild-type TK_{gst} or variants. Furthermore, this novel TA_{tea} could be used in other cascade reactions involving thermostable HPA-dependent enzymes.

Experimental

General experimental

Thermosinus carboxydivorans DSM 14886 was purchased from DSMZ; *E. coli* BL21(DE3)pLysE strain was from Invitrogen. Reagents for molecular biology were obtained from Life Technologies. Oligonucleotides and reagents were purchased from Sigma-Aldrich. D-(+)-Mannose was provided by Fluka AG. D-Lyxose was obtained from DIFCO. Sodium chloride was procured by ROTH. The WST-1 blue dye was obtained from Interchim (Biotech Grade). L-Serine, α -ketoglutaric acid, pyruvic acid, imidazole, ammonium sulfate and potassium chloride were purchased from Alfa Aesar. Pyridoxal 5-phosphate monohydrate (PLP) was procured by Acros Organics. L-Glyceraldehyde was acquired from Molekula Society and was purified beforehand. Hydroxypyruvate was prepared as the lithium salt by the method of Dickens and Williamson.¹⁴ L-Lactaldehyde was synthesized chemically following the literature³⁶ from D-threonine in the presence of ninhydrin. The Bradford reagent was obtained from Bio-Rad. Ni-NTA resin was acquired from QIAGEN. The 96-well microplates were shaken and incubated in a Titramax 1000 incubator from Heidolph. Lyophilisation was carried out with a Triad LABCONCO dryer. UV-visible absorbances were measured using a SAFIRE II-Basic plate reader from TECAN and a Perkin Elmer Lambda 25 spectrophotometer enabling Peltier-effect temperature control. MARCHEREY-NAGEL GmbH & Co KG F254 silica gel TLC plates and MARCHEREY-NAGEL GmbH & Co KG 60/40–63 mesh silica gel for liquid flash chromatography were used. NMR spectra were recorded in D₂O and CD₃OD on a Bruker Avance 400 spectrometer. The optical rotation was determined with a polarimeter P-2000 JASCO PTC-262 at the given temperature and wavelength (Na-D-line: $D = 589$ nm) in a 10 cm long cell. $[\alpha]_D$ values are given in 10^{-1} deg cm² g⁻¹ (concentration given as g per 100 mL).

Thermosinus carboxydivorans transaminase preparation

L- α -Transaminase screening. An α -transaminase library, representative of the biodiversity of this family, has been previously constructed.¹⁸ 9 Putative L- α -TAs leading to the best activities with Li-HPA were selected for the screening. 5 μ L of each of 9 clarified lysates were transferred to individual wells in 96-well plates containing L-serine (5 mM), an α -keto acid (α -ketoglutaric acid: 5 mM; pyruvic acid: 5 mM; glyoxylic acid: 5 mM) and PLP (0.2 mM), in HEPES buffer (100 mM, pH 7.5). The total volume in each well was 200 μ L. The plates were then incubated at 25 °C for 2 hours. HPA formation in each reaction was determined against time using a discontinuous assay

involving a WST-1 blue dye, as described by Bommer and Ward.³² Aliquots of the medium (20 μ L) were added over time to 180 μ L of a solution containing NaOH (90 mM) and WST-1 (0.1 mg mL⁻¹) in a new 96-well microplate. The total volume in each well was 200 μ L. The plate was then incubated for 10 minutes at 60 °C and the absorbance increase of medium resulting from formazan formation was measured at 600 nm by using a plate reader.

Transaminase cloning and expression. The TA_{tea} gene was amplified by PCR from the genomic DNA of *Thermosinus carboxydivorans* DSM 14886 with PCR primers designed on the gene encoding for A1HUC4: TAtca-5PRIM-AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATTTACAAA-AACCGTATTTGA and TAtca-3PRIM-GTGTAAATGGATAGTGATCTTATCCCTCCATAAGTATTTCTTGC. A hexahistidine tag was introduced after the starting ATG (underlined in the sequence of TAtca-5PRIM) in the N-terminal part of the gene. Specific extensions are added to the primers for cloning into our plasmid pET22b(+) (Novagen) modified for ligation independent cloning.³⁷ *Escherichia coli* strain BL21(DE3)pLysE was used as the expression host. A 100 mL pre-culture was grown at 37 °C in LB medium with 100 μ g mL⁻¹ ampicillin overnight. 20 mL of the pre-culture was used to inoculate 1 liter of culture medium containing 100 μ g mL⁻¹ ampicillin. Isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) at 1 mM was introduced when the OD range was 0.7–0.8. The cells were then grown overnight at 30 °C and harvested (4.45 g L⁻¹ of biomass).

Transaminase purification. The harvested recombinant cells from 1 L culture were suspended in 31 mL of 50 mM phosphate buffer containing KCl (300 mM) and imidazole (10 mM) at pH 8.0. The cells were disrupted by sonication for 30 minute on ice and the insoluble pellet was discarded after centrifugation (4000 rpm, 30 min, 4 °C). The crude extract was mixed with 3.5 mL of PLP (10 mM) and applied to a Ni-NTA (QIAGEN) Ni²⁺ chelating affinity column equilibrated with the phosphate buffer mentioned above. After washing the column with the same buffer, the His6-tagged TA_{tea} was finally eluted with 50 mM phosphate buffer containing 300 mM KCl and 250 mM imidazole (pH 8.0). The protein concentration of each fraction was determined by the method of Bradford and bovine serum albumin (BSA) was used as the standard. The fractions containing proteins were collected, mixed with 300 μ L of PLP (10 mM) and dialyzed against ammonium sulfate solution (3 M, pH 8). After purification from 1 L culture, 203 mg of total proteins was obtained with a total TA_{tea} activity of 717 U, corresponding to a specific activity of 3.5 U mg⁻¹, at 25 °C. Precipitated proteins were stored in ammonium sulfate solution (3 M, pH 8) at 4 °C.

Transaminase activity. One unit of TA_{tea} activity is defined as the amount of TA that catalyzes the formation of 1 μ mol of HPA per minute at 25 °C in HEPES buffer (100 mM, pH 7.5). TA_{tea} enzymatic assay was performed in the presence of L-serine and α -keto glutaric acid leading to HPA and L-glutamic acid. 30 μ L of the diluted sample of purified TA_{tea} (10 μ g mL⁻¹, 2.3 μ g per well) were transferred to individual wells in a 96-well plate containing L-serine (250 mM), α -ketoglutaric acid

(3 mM) and PLP (0.2 mM) in HEPES buffer (100 mM, pH 7.5). The total volume in each well was 200 μ L. Then, the plate was incubated at 25 $^{\circ}$ C for 20 minutes. The formation of HPA was quantified at different time intervals by using the sequential assay described above (Experimental part: L- α -transaminase library screening). All measurements were performed in triplicate.

Transaminase optimum temperature and pH

Transaminase optimum temperature. The optimum temperature of TA_{tca} was examined in the range of 20 to 80 $^{\circ}$ C in HEPES buffer (100 mM, pH 7.5) with L-serine and α -ketoglutaric acid as substrates. The temperature of the mixture was controlled by using a Peltier effect controller. Enzyme solutions (10 μ g mL⁻¹) were first incubated for 30 minutes at various temperatures with 3 mM α -ketoglutaric acid and 0.2 mM PLP. When the desired temperature was reached, L-serine (100 mM) was added to initiate the reaction. The residual activities were measured at different time intervals by using the sequential assay described above (Experimental part: L- α -transaminase library screening). All measurements were performed in triplicate.

Transaminase optimum pH. The effect of pH on TA_{tca} was determined by measuring TA_{tca} in the range of 5 to 9.2 with L-serine and α -ketoglutaric acid in different buffers: sodium citrate buffer (pH 5–6.5), sodium phosphate (pH 6.3–7.6), Tris-HCl buffer (pH 7–8.5) and sodium borate buffer (pH 7.8–9.2) at 100 mM final concentration. Enzyme solutions (10 μ g mL⁻¹) were incubated at different pH values for 20 minutes at 25 $^{\circ}$ C in the presence of α -ketoglutaric acid (3 mM) and PLP (0.2 mM). Then, L-serine (100 mM) was added to initiate the reaction. The activities were measured at different times by using the sequential assay described above (Experimental part: L- α -transaminase library screening). All measurements were performed in triplicate.

Transaminase thermostability

The thermostability of TA_{tca} was studied at 60 $^{\circ}$ C with L-serine (170 mM) and α -ketoglutaric acid (3 mM). Enzyme solutions (10 μ g mL⁻¹) were incubated with PLP (0.2 mM) at 60 $^{\circ}$ C up to 10 days in HEPES buffer (100 mM, pH 7.5). The residual activities were measured at different time intervals by using the sequential assay described above (Experimental part: L- α -transaminase library screening). All measurements were performed in triplicate.

Transaminase kinetic parameters

Apparent kinetic parameters were determined for L-serine and pyruvic acid using the sequential assay described above (Experimental part: L- α -transaminase library screening), at 25 $^{\circ}$ C. Apparent kinetic parameters of pyruvic acid were obtained by the measurement of the initial velocities of TA_{tca} by varying the pyruvic acid concentration from 0.25 to 50 mM while fixing the L-serine concentration at 250 mM. Apparent kinetic parameters of L-serine were obtained by the measurement of the initial velocities of TA_{tca} by varying the L-serine

concentration from 1 to 250 mM while fixing the pyruvic acid concentration to 50 mM. Hanes–Woolf plots were used to determine apparent kinetic parameter values. All measurements were performed in triplicate.

Geobacillus stearothermophilus transketolase preparation

Transketolase expression.¹⁰ Expression was carried out in *E. coli* BL21 (DE3) Gold strain. This strain was first transformed by electroporation with pGEN717 for the expression of TK_{gst} and plated on LB medium with kanamycin (30 μ g mL⁻¹). The *E. coli* BL21 (DE3) strain was then transformed by electroporation with pGEN768 for the expression of the TK_{gst} from the synthetic *tk* gene. A 100 mL pre-culture was grown at 37 $^{\circ}$ C in LB medium with 30 μ g mL⁻¹ kanamycin overnight. 20 mL of the pre-culture was used to inoculate 1 liter of culture medium containing 30 μ g mL⁻¹ kanamycin. Isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) at 1 mM was introduced when the OD range was 0.7–0.8. The cells were then grown overnight at 30 $^{\circ}$ C and harvested (3.73 g L⁻¹ of biomass).

Transketolase purification.¹⁰ Harvested recombinant cells from 1 L culture were suspended in 26 mL of 50 mM phosphate buffer containing 300 mM NaCl (pH 8.0). The cells were disrupted by sonication for 30 min on ice and the insoluble pellet was discarded after centrifugation (4000 rpm, 30 min, 4 $^{\circ}$ C). The crude extract was applied to a Ni-NTA (QIAGEN) Ni²⁺ chelating affinity column equilibrated with the phosphate buffer mentioned above. After washing the column with the same buffer, the His6-tagged TK_{gst} was finally eluted with 50 mM phosphate buffer containing 300 mM NaCl and 500 mM imidazole (pH 8.0). The protein concentration of each fraction was determined by the Bradford method and bovine serum albumin (BSA) was used as the standard. The fractions containing proteins were collected and dialyzed against triethanolamine buffer (2 mM, pH 7.5) and then against water (pH 7.5) through dialysis tubing. After purification from 1 L culture, 160 mg of total proteins was obtained with a total TK_{gst} activity of 324 U, corresponding to a specific activity of 2 U mg⁻¹, at 25 $^{\circ}$ C. Proteins in water solution at pH 7.5 were then lyophilized and stored at 4 $^{\circ}$ C.

Transketolase activity. One unit of TK_{gst} activity is defined as the amount of TK that catalyzes the formation of 1 μ mol of ketose product per minute at 25 $^{\circ}$ C in glycyglycine buffer (100 mM, pH 7.5). TK_{gst} enzymatic assay was performed in the presence of L-erythrulose and D-ribose-5-phosphate (D-R5P) leading to D-sedoheptulose-7-phosphate (D-S7P) and glycolaldehyde (GA).³⁵ The GA formed is reduced by yeast alcohol dehydrogenase (ADH) to ethylene glycol in the presence of nicotinic adenine dinucleotide, reduced form (NADH). L-Erythrulose (100 mM), D-R5P (9.1 mM), ThDP (0.1 mM), MgCl₂ (0.5 mM), NADH (0.2 mg mL⁻¹), 5 μ L of ADH (25 U mL⁻¹) and the TK_{gst} suspension (10 μ L) were added to disposable plastic cuvettes and completed to 1 mL with glycyglycine buffer (100 mM, pH 7.5). The disappearance of NADH was followed by spectrophotometry at 340 nm (value $\epsilon_{\text{NADH } 340 \text{ nm}} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Transketolase acceptor substrate specificity

The assay reaction was carried out in the presence of phenol red as the pH indicator³⁴ in 1 mL disposable plastic cuvettes. The reaction mixture containing TK_{gst} (200–450 μg mL⁻¹), acceptor substrates: L-glyceraldehyde, L-lactaldehyde, D-threose, or L-erythrose (100 mM), ThDP (0.1 mM), MgCl₂ (1 mM), phenol red (84 μM) in triethanolamine buffer (2 mM, pH 7.15) was first incubated at 25 °C and 60 °C for 20 minutes. Then, Li-HPA was added at 50 mM final concentration to initiate the reaction and the absorbance increase was measured at 560 nm for 30 minutes. Absorbance was recorded and converted into concentration HCO₃⁻ according to the calibration curve for the activity calculation.¹² All measurements were performed in triplicate.

Transketolase kinetic parameters towards lithium β-hydroxypyruvate

Kinetic parameters relative to Li-HPA were determined by discontinuous titration of Li-HPA against time, at 25 °C. Glycolaldehyde was used as the acceptor substrate. The solution contained ThDP (2.4 mM), MgCl₂ (9 mM), glycolaldehyde (50 mM) and Li-HPA (0.5–25 mM) in glycylglycine buffer (100 mM, pH 7.5). TK_{gst} (0.0125–0.25 U mL⁻¹, 0.37–37 μg) was added to initiate the reaction. Li-HPA consumption was determined against time from the aliquots of the mixture as described below (Experimental part: determination of the lithium β-hydroxypyruvate concentration). Different slopes of Li-HPA consumption were obtained according to the Li-HPA concentration tested. v_{\max} and K_M values were determined using Hanes–Woolf plots.

Determination of lithium β-hydroxypyruvate concentration

The Li-HPA concentration was determined by an enzymatic assay using L-lactic dehydrogenase. The sample of diluted Li-HPA was introduced in a cuvette containing 20 μL of NADH (0.2 mg mL⁻¹), 20 μL of L-lactic dehydrogenase (4 U mL⁻¹) in triethanolamine buffer (100 mM, pH 7.5). The disappearance of NADH was followed by spectrophotometry at 340 nm and the difference between the initial absorbance and final absorbance gave the Li-HPA concentration using the Beer–Lambert law (value $\epsilon_{\text{NADH } 340 \text{ nm}} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Preparative scale enzymatic cascade synthesis

General procedure. ThDP (0.1 mM), MgCl₂·6H₂O (1 mM), PLP (0.2 mM) and pyruvic acid (50 mM) were dissolved in H₂O and the pH was adjusted to 7 with 0.1 M NaOH. To this stirred solution were added TK_{gst} (6 mg in the case of L-glyceraldehyde and L-lactaldehyde; 10 mg in the case of D-threose and L-erythrose) and TA_{tca} (4.8 mg) and the mixture was stirred for 20 min at 60 °C. In another flask, (2S) α-hydroxylated aldehydes (50 mM) and L-serine (150 mM) were mixed and the pH was adjusted to 7 with 0.1 M NaOH. After preincubation of enzymes, cofactors and pyruvic acid, L-serine and (2S) α-hydroxylated aldehydes were added and the mixture was stirred at 60 °C. The final volume was 20 mL. The pH was

maintained at 7 by adding 0.1 M HCl using a pH stat (Radiometer Analytical). The reaction was monitored by measuring pyruvic acid and (2S) α-hydroxylated aldehydes consumption by *in situ* ¹H NMR. In the case of D-threose and L-erythrose, the complete disappearance of pyruvic acid was observed after 48 h and a second portion of pyruvic acid (50 mM) was added. After total conversion of pyruvic acid and (2S)-α-hydroxylated aldehydes (24–96 hours), silica was added to the reaction mixture and the suspension was concentrated to dryness under reduced pressure before dry loading onto a flash silica column. After silica gel chromatography using CH₂Cl₂/CH₃OH (v/v 90:10) (for L-ribulose and 5-deoxy-L-ribulose) and ethyl acetate/CH₃OH (v/v 100:0–90:10) as eluents (for D-tagatose and L-psicose), L-ribulose, 5-deoxy-L-ribulose, D-tagatose and L-psicose were isolated.

***In situ* ¹H NMR measurements.** The progress of preparative scale enzymatic synthesis was monitored by using quantitative *in situ* ¹H NMR relative to 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuterio-propionate (TSP-d₄) as an internal standard. Aliquots of medium (450 μL) were removed over time and mixed with 50 μL of TSP-d₄ (50 mM in D₂O).

(3S,4S)-1,3,4,5-Tetrahydroxypentan-2-one (L-ribulose) 1. 1 was isolated as yellow oil; yield: 84 mg, 56%. *R*_f 0.43 (DCM/CH₃OH, 8:2). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +15.8$ (c 0.1, H₂O) lit. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +16.5 \pm 1.5$ (c 0.1 H₂O).³⁸ NMR data were identical to those previously described:³⁹ (ratio: α-anomer/β-anomer/keto isomer = 63/23/14); lit. ratio: α-anomer/β-anomer/keto isomer = 58/24/18.³⁹ ¹³C NMR (101 MHz, D₂O): δ = (keto isomer) 213.9 (C-2), 76.8 (C-3), 74.0 (C-4), 67.9 (C-1), 62.7 (C-5); δ = (α-anomer) 104.0 (C-2), 72.9 (C-5), 71.9 (C-3), 64.2 (C-4), 71.6 (C-1); δ = (β-anomer) 107.1 (C-2), 77.2 (C-3), 72.2 (C-5), 72.0 (C-4), 63.9 (C-1). *m/z* HRMS found [M + Cl]⁻ 185.0212, C₅H₁₀O₅Cl requires 185.0217.

(3S,4S)-1,3,4-Trihydroxypentan-2-one (5-deoxy-L-ribulose) 2. 2 was isolated as yellow oil; yield: 131 mg, 98%. *R*_f 0.27 (DCM/CH₃OH, 9:1). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -25.6$ (c 0.25, CH₃OH) lit. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -26.5$ (c 0.7, CH₃OH).¹² NMR data were identical to those previously described:¹² ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 1.19 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, H₅); 3.92–3.99 (m, 1H, H₃); 4.08 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H₄); 4.44 (d, *J* = 19.4 Hz, 1H, H_{1b}); 4.55 (d, *J* = 19.4 Hz, 1H, H_{1a}). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ = 18.6 (C-5), 68.0 (C-1), 70.0 (C-4), 80.3 (C-3), 213.1 (C-2). *m/z* HRMS found [M + HCOO]⁻ 179.0553, C₈H₁₁O₄ requires 179.0556.

(3S,4S,5R)-1,3,4,5,6-Pentahydroxyhexan-2-one (D-tagatose) 3. 3 was isolated as a white powder; yield: 93 mg, 52%. *R*_f 0.31 (DCM/CH₃OH, 8:2). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -2.9$ (c 2, H₂O) lit. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2.5$.⁴⁰ NMR data were identical to those previously described:⁴¹ (ratio: α-D-tagato-2.6-pyranose/β-D-tagato-2.6-pyranose/α-D-tagato-2.5-furanose/β-D-tagato-2.6-furanose: 72/22/2/4.; lit. ratio: α-D-tagato-2.6-pyranose/β-D-tagato-2.6-pyranose/α-D-tagato-2.5-furanose/β-D-tagato-2.6-furanose: 79/14/2/5⁴²); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ = (α-D-tagato-2.6-pyranose): 99.0 (C-2), 71.8 (C-4), 70.6 (C-3), 67.2 (C-5), 64.7 (C-1), 63.1 (C-6); δ = (β-D-tagato-2.6-pyranose): 99.1 (C-2), 70.6 (C-4), 70.1 (C-5), 64.5 (C-3), 64.3 (C-1); 60.9 (C-6); δ = (α-D-tagato-2.5-furanose): 105.8 (C-2), 80.0 (C-5), 77.5 (C-3), 71.9 (C 4), 63.2 (C-1), 62.6 (C-6); δ =

(β -D-tagato-2.6-furanose): 103.4 (C-2), 80.9 (C-5), 71.8 (C-4), 71.5 (C-3), 63.4 (C-1), 61.8 (C-6). m/z HRMS found $[M + Cl]^-$ 215.0319, $C_6H_{12}O_6Cl$ requires 215.0322.

(3S,4S,5S)-1,3,4,5,6-Pentahydroxyhexan-2-one (α -psicose) 4. 4 was isolated as a white powder; yield: 92 mg, 51%. Rf 0.31 (DCM/CH₃OH, 8 : 2). $[\alpha]_D^{20} = -2.3$ (c 0,1 H₂O) lit. $[\alpha]_D^{20} = -2.4$.⁴³ Data for D-psicose: + 3.02 (c = 1.16 in H₂O),⁴⁴ +3.1 (c = 1.62 in H₂O).⁴⁵ NMR data were identical to those previously described for the D enantiomer:^{41,44} (ratio: α -D-psico-2.6-pyranose/ β -D-psico-2.6 pyranose/ α -D-psico-2.5-furanose/ β -D-psico-2.6-furanose:25/24/37/13; lit. ratio: α -D-psico-2.6-pyranose/ β -D-psico-2.6 pyranose/ α -D-psico-2.5-furanose/ β -D-psico-2.6-furanose: 22/24/39/15⁴²): ¹H NMR (400 MHz, D₂O) ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ = 3.43 (d, J = 11.7 Hz), 3.87–3.51 (m), 4.11–3.91 (m), 4.09 (s), 4.33 (dd, J = 7.6, 4.7 Hz). ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ = (α -D-psico-2.6-pyranose) 98.6 (C-2), 72.6 (C-4), 66.8 (C-5), 66.4 (C-3), 64.0 (C-1), 58.9 (C-6); δ = (β -D-psico-2.6-pyranose) 99.3 (C-2), 71.12 (C-3), 69.9 (C-5), 66.0 (C-4), 65.1 (C-6), 64.9 (C-1); δ = (α -D-psico-2.5-furanose) 104.2 (C-2), 83.6 (C-5), 71.2 (C-4), 71.2 (C-3), 64.2 (C-1), 62.2 (C-6); δ = (β -D-psico-2.6-furanose) 106.5 (C-2), 83.6 (C-5), 75.5 (C-3), 71.9 (C-4), 63.7 (C-6), 63.3 (C-1). m/z HRMS found $[M + Cl]^-$ 215.0318, $C_6H_{12}O_6Cl$ requires 215.0322.

Acknowledgements

The authors thank the French National Research Agency (grant ANR-13-IS07-0003-01 to LH and ANR-12-CDII-0010-03 NANOCAUSYS to LH) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant Fe244/10-1 to WDF) as well as the PHC-DAAD Procope (No. 30731UC) and ESF project COST CM1303 for supporting the collaboration. The authors thank Martine Sancelme (engineer at Institute of Chemistry of Clermont-Ferrand, France) for the culture of micro-organisms expressing the enzymes and Agnès Rambourdin (technician at Institute of Chemistry of Clermont-Ferrand, France) for the chemical synthesis of Li-HPA.

References

- S. M. Dean, W. A. Greenberg and C.-H. Wong, *Adv. Synth. Catal.*, 2007, **349**, 1308–1320; A. K. Samland and G. A. Sprenger, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, **71**, 253–264.
- M. Pohl, B. Lingen and M. Müller, *Chem. – Eur. J.*, 2002, **8**, 5289–5295; G. A. Sprenger and M. Pohl, *J. Mol. Catal. B: Enz.*, 1999, **6**, 145–159.
- W. D. Fessner and V. Hélaïne, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001, **12**, 574586.
- E. Racker, G. de la Haba and I. G. Leder, *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, **75**, 1010–1011; J. Bolte, C. Demuynck and H. Samaki, *Tetrahedron Lett.*, 1987, **28**, 5525–5528; C. Demuynck, J. Bolte, L. Hecquet and V. Dalmas, *Tetrahedron Lett.*, 1991, **32**, 5085–5088; Y. Kobori, D. C. Myles and G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 5899–5907.
- T. Ziegler, A. Straub and F. Effenberger, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1988, **27**, 716–717; L. Hecquet, J. Bolte and C. Demuynck, *Tetrahedron*, 1996, **52**, 8223–8232; F. T. Zimmermann, A. Schneider, U. Schorken, G. A. Sprenger and W. D. Fessner, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1999, **10**, 1643–1646; N. J. Turner, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000, **11**, 527–531; W.-D. Fessner and V. Hélaïne, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001, **12**, 574–586; F. Charmantray, V. Hélaïne, B. Légeret and L. Hecquet, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2009, **57**, 6–9.
- M. Sundström, Y. Lindqvist, G. Schneider, U. Hellman and H. Ronne, *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 24346–24352; U. Nilsson, L. Meshalkina, Y. Lindqvist and G. Schneider, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 1864–1869; J. Littlechild, N. Turner, G. Hobbs, M. Lilly, A. Rawas and H. Watson, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 1995, **51**, 1074–1076.
- M. E. B. Smith, E. G. Hibbert, A. B. Jones, P. A. Dalby and H. C. Hailes, *Adv. Synth. Catal.*, 2008, **350**, 2631–2638; J. L. Galman, D. Steadmann, S. Bacon, P. Morris, M. E. B. Smith, J. Ward, P. A. Dalby and H. C. Hailes, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 7608–7610; A. Cázares, J. L. Galman, L. G. Crago, M. E. Smith, J. Strafford, L. Ríos-Solís, G. J. Lye, P. A. Dalby and H. C. Hailes, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 1301–1130; A. Ranoux, S. K. Karmee, J. Jin, A. Bhaduri, A. Caiazzo, I. W. Arends and U. Hanefeld, *ChemBioChem*, 2012, **13**, 1921–1931; F. Subrizi, M. Cárdenas-Fernández, G. J. Lye, J. M. Ward, P. A. Dalby, T. D. Sheppard and H. C. Hailes, *Green Chem.*, 2016, **18**, 3158–3165.
- V. Mozhaev, *Trends Biotechnol.*, 1993, **11**, 88–95; M. Krahe, G. Antranikian and H. Markel, *FEMS Microbiol. Rev.*, 1996, **18**, 271–285; S. Kumar and R. Nussinov, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001, **58**, 1216–1233; J. Littlechild, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2015, **3**, 161.
- D. C. Demirjian, F. Morís-Varas and C. S. Cassidy, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2001, **2**, 144–151.
- J. Abdoul Zabar, I. Sorel, V. Hélaïne, F. Charmantray, T. Devamani, D. Yi, V. de Berardinis, D. Louis, P. Marlière, W.-D. Fessner and L. Hecquet, *Adv. Synth. Catal.*, 2013, **355**, 116–128.
- G. Ali, T. Moreau, C. Forano, C. Mousty, V. Prevot, F. Charmantray and L. Hecquet, *ChemCatChem*, 2015, **7**, 3163–3170.
- J. Abdoul Zabar, M. Lorillière, D. Yi, S. Thangavelu, T. Devamani, L. Nauton, F. Charmantray, V. Hélaïne, W.-D. Fessner and L. Hecquet, *Adv. Synth. Catal.*, 2015, **357**, 1715–1720.
- T. Saravanan, T. Devamani, F. Charmantray, L. Hecquet and W.-D. Fessner, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 480–483.
- F. Dickens and D. H. Williamson, *Biochem. J.*, 1958, **68**, 74–81.
- L. Hecquet, J. Bolte and C. Demuynck, *Tetrahedron*, 1996, **52**, 8223–8232; C. Demuynck, J. Bolte, L. Hecquet and H. Samaki, *Carbohydr. Res.*, 1990, **206**, 79–85; S. Lee, A. Kirschning, M. Muller, C. Way and H. G. Floss, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 1999, **6**, 369–377.

- 16 M. F. Villegas-Torres, R. Julio Martinez-Torres, A. Cázares-Körner, H. Hailes, F. Baganz and J. Ward, *Enzyme Microb. Technol.*, 2015, **81**, 23–30.
- 17 M. Höhne and U. T. Bornscheuer, Application of transaminases in organic synthesis, in *Enzymes in Organic Synthesis*, ed. O. May, H. Gröger and W. Drauz, Wiley-VCH, Weinheim, 2012, pp. 779–820; J. Ward and R. Wohlgemuth, *Curr. Org. Chem.*, 2010, **14**, 1914–1927; T. Scheidt, H. Land, M. Anderson, P. Berglund, Y. Chen, D. Yi and W.-D. Fessner, *Adv. Synth. Catal.*, 2015, **357**, 1721–1731.
- 18 E. Heuson, J.-L. Petit, A. Debard, A. Job, F. Charmantray, V. de Berardinis and T. Gefflaut, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, **100**, 397–408.
- 19 A. Kylmä, T. Granström and M. Leisola, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, **63**, 584–591; K. Vanhessche, E. Van der Eyckenand and M. Vandewalle, *Tetrahedron Lett.*, 1990, **31**, 2337–2340.
- 20 G. Gumina, G. Y. Song and C. K. Chu, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001, **202**, 9–15.
- 21 D.-K. Oh, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, **76**, 1–8.
- 22 Y. Terami, K. Uechi, S. Nomura, N. Okamoto, K. Morimoto and G. Takata, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 2015, **79**, 1725–1729; D. Rao, P. Gullapalli, A. Yoshihara, S. F. Jenkinson, K. Morimoto, G. Takata, K. Akimitsu, S. Tajima, G. W. Fleet and K. Izumori, *J. Biosci. Bioeng.*, 2008, **106**, 473–480.
- 23 S. Muniruzzaman, M. McIntosh, A. Hossain, K. Izumori and P. S. Bhattacharjee, *J. Pharmacol. Sci.*, 2016, **131**, 126–130.
- 24 K. Morimoto, Y. Terami, Y. I. Maeda, A. Yoshihara, G. Takata and K. Izumori, *J. Biosci. Bioeng.*, 2013, **115**, 377–381; M. Helanto, K. Kiviharju, M. Leisola and A. Nyssölä, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, **73**, 7083–7091; Y.-W. Zhang Zhang, P. Prabhu and J. K. Lee, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2010, **33**, 741–748; P. Kim, S.-H. Yoon, H.-J. Roh and J.-H. Choi, *Biotechnol. Prog.*, 2001, **17**, 208–210; H.-J. Kim, S.-A. Ryu, P. Kim and D.-K. Oh, *Biotechnol. Prog.*, 2003, **19**, 400–404.
- 25 C. De Muynck, C. Pereira, W. Soetaert and E. I. Vandamme, *J. Biotechnol.*, 2006, **125**, 408–415.
- 26 J. Yang, J. Li, Y. Men, Y. Zhu, Y. Zhang, Y. Sun and Y. May, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015, **81**, 4284–4294.
- 27 G. A. Sprenger, U. Schorken, G. Sprenger and H. Sahm, *Eur. J. Biochem.*, 1995, **230**, 525–532.
- 28 Y. Kobori, D. C. Myles and G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 5899–5907.
- 29 R. K. Mitra, J. M. Woodley and M. D. Lilly, *Enzyme Microb. Technol.*, 1998, **22**, 64–70.
- 30 I. A. Sevostyanova, O. N. Solovjeva and G. A. Kochetov, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, **313**, 771–774.
- 31 M. Breuer, M. Pohl, B. Hauer and B. Lingen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **374**, 1069–1073; M. E. B. Smith, U. Kaulmann, J. M. Ward and H. C. Hailes, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 7062–7065; T. Sehl, R. C. Simon, H. C. Hailes, J. M. Ward, U. Schell and M. Pohl, *J. Biotechnol.*, 2012, **159**, 188–194.
- 32 M. Bommer and J. M. Ward, *Anal. Biochem.*, 2016, **15**, 493–498.
- 33 C. Sayer, M. Bommer, M. Isupov, J. Ward and J. Littlechild, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2012, **68**, 763–772.
- 34 D. Yi, T. Devamani, J. Abdoul-Zabar, F. Charmantray, V. Helaine, L. Hecquet and W.-D. Fessner, *ChemBioChem*, 2012, **13**, 2290–2300.
- 35 L. Hecquet, J. Bolte and C. Demuynck, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 1993, **12**, 2174–2176.
- 36 B. Zagalak, P. A. Frey, G. L. Karabatsos and R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.*, 1966, **13**, 3028–3035.
- 37 C. Aslanidis and P. J. de Jong, *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**, 6069–6074.
- 38 P. A. Levene and R. S. Tipson, *J. Biol. Chem.*, 1936, **3**, 731–747.
- 39 T. Vuorinen and A. S. Serianni, *Carbohydr. Res.*, 1991, **209**, 13–31.
- 40 K. Yoshihara, Y. Shinohara, T. Hirotsu and K. Izumori, *J. Biosci. Bioeng.*, 2006, **101**, 219–222.
- 41 J.-P. Sauvage, S. Chapelle and J.-F. Verchère, *Carbohydr. Res.*, 1992, **237**, 23–32.
- 42 S. Köpper and S. Freimund, *Helv. Chim. Acta*, 2003, **86**, 827–843.
- 43 K. Takeshita, T. Shimonishi and K. Izumori, *J. Biosci. Bioeng.*, 1996, **81**, 212–215.
- 44 D. Enders and C. Grondal, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **8**, 1210–1212.
- 45 M. Steiger and T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 1936, **19**, 184–189.
- 46 R. A. Sheldon, *Chem. Commun.*, 2008, 3352–3365.
- 47 Y. Ni, D. Holtmann and F. Hollmann, *ChemCatChem*, 2014, **6**, 930–943.
- 48 M. Ribeiro and A. Machado, *Green Chem. Lett. Rev.*, 2013, **6**, 1–18; F. G. Calvo-Flores, *ChemSusChem*, 2009, **2**, 905–919.
- 49 C. Grondal and D. Enders, *Tetrahedron*, 2006, **62**, 329–337.



Cite this: DOI: 10.1039/c6gc02017h

Engineering a thermostable transketolase for arylated substrates†‡

 Thangavelu Saravanan,^a Marie-Luise Reif,^a Dong Yi,^a Marion Lorillière,^{b,c}
 Franck Charmantray,^{b,c} Laurence Hecquet^{b,c} and Wolf-Dieter Fessner^{*a}

Aromatic components are difficult substrates for enzymes catalyzing stereoselective carbonylation reactions. We have engineered transketolase from *Geobacillus stearothermophilus* by directed evolution to utilize arylalkanal and benzaldehyde as the electrophilic substrate in highly stereoselective C–C bond forming conversions. Enzyme variants were discovered with rate accelerations up to 28-fold that convert 2-phenylethanal, 3-phenylpropanal, phenyloxyethanal, benzyloxyethanal, and (*N*-Cbz)-3-aminopropanal with formation of the corresponding aryl-substituted 1,3-dihydroxyketones in good yields (60–72%) and virtually complete (*3S*)-stereoselectivity (>99% ee). Novel double-site variants were also found for the conversion of benzaldehyde.

Received 22nd July 2016,
Accepted 3rd October 2016

DOI: 10.1039/c6gc02017h

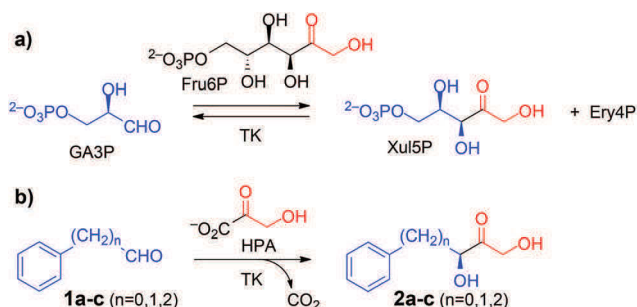
www.rsc.org/greenchem

Introduction

Non-covalent interactions involving aromatic rings such as π - π stacking, O–H/ π , and cation- π interactions are key stabilizing elements in both chemical and biological recognition. Because of their hydrophobic nature and low chemical reactivity, aromatic ring systems are of paramount importance as constituents of synthetic building blocks for rational drug design and lead optimization in medicinal chemistry.¹ Sustainability issues are progressively fostering the use of biocatalysis as a green, eco-friendly technology with significant potential for the chemical and pharmaceutical industries due to the advantages of their mild reaction conditions and intrinsically high chemo- and stereoselectivities.² Enzyme-catalysed asymmetric carbonylation is an emerging tool, yet aromatic components are of limited general utility for synthetic applications, because such compounds not only have low solubility in aqueous media but also low reactivity as electrophiles for aldolases.^{3,4} Aryl-substituted chiral building blocks are more suitable as substrates for thiamine diphosphate (ThDP) dependent enzymes,⁵ exemplified in the technical synthesis of (*R*)-phenylacetylcarbinol [(*R*)-PAC] as precursor to ephedrine and other

alkaloids catalysed by pyruvate decarboxylase and related biocatalysts.⁶

Transketolase (TK, EC 2.2.1.1), a key enzyme in metabolic regulation that serves to connect the pentose phosphate pathway to glycolysis, also is a member of the ThDP dependent enzymes toolbox.^{3,7} *In vivo*, it performs the interconversion of various phosphorylated sugars by catalyzing a reversible transfer of a two-carbon ketol fragment from a ketose phosphate to an aldose phosphate (Scheme 1a). To render synthetic reactions irreversible *in vitro*, hydroxypyruvate (HPA) is used to generate the ketol nucleophile with release of CO₂.⁸ Carbonylation is both stereospecific, in that the new asymmetric centre formed has the (*S*) configuration, and stereoselective, in that the enzyme shows a strong kinetic preference for α -hydroxyaldehydes having a (*2R*)-configuration. This makes TK a potent biocatalyst for the asymmetric synthesis of chiral ketotriol products that have the final *D-threo* or (*3S,4R*) configuration. TK shows high specificity towards its nucleophi-



Scheme 1 (a) Natural versus (b) desired catalytic reactions of transketolase.

^aInstitut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt, Alarich-Weiss-Str. 4, 64287 Darmstadt, Germany. E-mail: fessner@tu-darmstadt.de

^bClermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

^cCNRS, UMR 6296, ICCF, 63177 Aubière, France

†Dedicated to Romas Kazlauskas on the occasion of his 60th birthday.

‡Electronic supplementary information (ESI) available: Enzyme kinetic and stereoselectivity data, HPLC profiles, copies of original NMR spectra and NMR shift experiments. See DOI: 10.1039/c6gc02017h



lic ketol substrates but is more tolerant towards structural modification in the electrophilic aldehyde substrate.^{3,9,10} However, specific activity towards aliphatic aldehydes lacking a 2-hydroxylation is about 40-fold lower than for the corresponding hydroxylated derivatives.¹¹ Also, the wild-type TK from *E. coli* has been reported not to convert benzaldehyde (**1a**) and the related heteroaromatic 2-furaldehyde and 2-thiophene carboxaldehyde,^{12,13} and to accept only a few arylated aldehydes such as phenylethanal (**1b**) with very low productivity.^{12,14}

Recently, we have identified the TK from *Geobacillus stearothermophilus* (TK_{gst}) as a novel thermostable enzyme with high potential for practical applications and future biocatalyst development.¹⁵ TK_{gst} offers a temperature optimum around 65 °C, remains active for three days at 65 °C, shows improved tolerance against deactivation by aldehyde electrophiles and has a high tolerance towards non-conventional media such as organic solvents and ionic liquids.¹⁶ Also, thermostability of the TK_{gst} scaffold has been demonstrated to correlate well with mutational robustness.^{17,18} TK_{gst} has high protein sequence and structural similarity to TKs from *E. coli* (TK_{eco}), *S. cerevisiae* and *B. anthracis*, for which protein crystal structures have been determined with bound substrates for a detailed mechanistic understanding.¹⁹ Our previous structure-guided work to broaden the substrate scope of TK_{gst} towards selected classes of non-natural substrates was targeted at two opposing residues Leu382 and Asp470 in the active-site that are responsible for substrate binding of the electrophilic reaction partner and for controlling the enantioselective binding of 2-hydroxyaldehydes by specific hydrogen bonding to the OH group (Fig. 1). Indeed, protein libraries L382X/D470X generated by site-specific saturation mutagenesis (SSM) furnished novel catalysts with significantly improved activity for the conversion of generic aliphatic substrates such as propanal,¹⁷ or with relaxed enantiomer selectivity for the conversion of non-natural (2*S*)-configured hydroxyaldehydes including L-lactaldehyde and L-glyceraldehyde.¹⁸ However, no aryl-substi-

tuted aldehydes (Scheme 1b) have been tested yet as potential substrates for TK_{gst}.

Similarly, protein engineering of TK_{eco} has been successfully used to improve its activity by single-point saturation mutagenesis towards aliphatic aldehydes, with both enhanced and reversed stereospecificity,^{5f,20} and also improved activity towards aldose substrates was found by rational mutagenesis.²¹ Variants of TK_{eco} evolved on propanal were found to show nascent activity on aromatic aldehydes¹² that later could be improved by rational engineering of protein and substrate to increase polar contacts, e.g. by using formylbenzoic acids that profit from better solubility and extra binding interaction between their carboxylic acid group and the phosphate-binding residues in the TK active-site.²²

Still, a breakthrough is required for the conversion of generic aryl-containing compounds as TK substrates to broaden the scope of this enzyme class for novel applications within *in vitro* metabolic cascades along the general concept of *Systems Biocatalysis*.²³ Here we report on our approach toward novel TK_{gst} variants that show rate accelerations up to 28-fold for the conversion of various non-functionalized phenylalkanal of the generic structure Ph(CH₂)_nCHO (**1a-c**, *n* = 0–2), as well as of structurally related arylated substrates, that allow the synthesis of the corresponding 1,3-dihydroxyketones in good yields (50–73%) and virtually complete (3*S*)-stereoselectivity (>99% ee).

Results and discussion

Library selection and pH shift screening for improved activity with 3-phenylpropanal

Arene-containing substrates in terms of their reactivity and structure are far distinct from the natural sugar phosphates used *in vivo*. Thus, TK_{gst} variants able to accept phenylalkanal as substrates require more hydrophobic contribution to substrate binding and a sterically relaxed environment for an accommodation of the arene moiety. All TK enzymes have a highly conserved active-site environment to form a channel for entrance of the natural substrates (phosphorylated sugars) to the catalytic site at the ThDP cofactor, where residues that bind the acceptor substrate (an aldose phosphate such as D-erythrose 4-phosphate; Fig. 1) orient its electrophilic carbonyl group towards a nucleophilic attack. These residues are putative candidates to alter the TK substrate specificity. The original L382X/D470X library was constructed to allow for a cooperative adaptation of the TK_{gst} active site towards various modifications in the electrophilic substrate, such as stereochemical inversion,¹⁸ as well as lower oxygenation state, increasing steric bulk, and improved hydrophobic contact zone.¹⁷ In particular, this library has proven useful for the successful identification of variants that are highly active and highly stereoselective for the conversion of generic alkanal,¹⁷ and therefore it seemed to be appropriate also for binding of aryl-containing substrate analogues. Depending on the specific Ph(CH₂)_nCHO constitution the aryl unit might be expected to

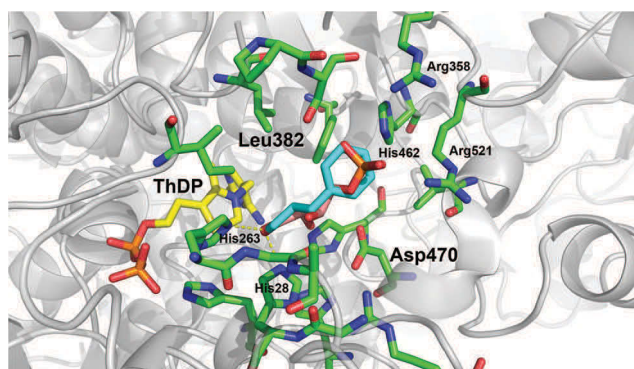


Fig. 1 Illustration of the potential binding orientation for arylated aldehydes by superimposing **1c** in minimum conformation (cyan) with the experimental binding mode of erythrose 4-phosphate (salmon) in the active site of the yeast TK (PDB entry 1NGS).²⁵ Residue numbering is for TK_{gst}.¹⁵ Graphic was produced with PyMOL.²⁶



occupy a variable position in the substrate-binding channel from close to the reaction centre (for **1a**, $n = 0$) up to close to the active site entrance (for **1c**, $n = 2$). In the former case, the L382X/D470X library was expected to furnish suitable residue combinations that could accommodate even a bulky phenyl moiety, while for the latter case those residues forming the phosphate-binding site might reasonably be assumed to offer sufficient flexibility to also adapt a phenyl structure having a diameter similar to that of a phosphate ester moiety (Fig. 1) although its polarity is quite different.

Out of the many assay methods for measuring TK activity,²⁴ our recently developed colorimetric pH based assay method was chosen for library screening because of its simplicity, speed, universality, sensitivity, and low cost.¹¹ The TK catalysed condensation of HPA and an aldehyde consumes one proton per cycle owing to the release of carbon dioxide, which in low-buffer medium causes a pH shift to alkaline and results in a colour change in the presence of phenol red as a pH indicator. This assay principle is independent of the structure of an electrophilic substrate and can be applied in microtiter plate format for the rapid substrate screening of TK as well as for a reliable determination of its kinetic constants.¹¹

Among the phenylalkanal series we selected 3-phenylpropanal (**1c**) as the most representative substrate for a primary screening, because 2-phenylethanal (**1b**) tends to form an enol tautomer in aqueous solution that reduces the available aldehyde concentration, and benzaldehyde (**1a**) suffers from lower reactivity as an electrophile owing to resonance stabilization. The assay conditions had to be optimized, however, for this specific substrate class because of their low solubility in the reaction buffer, even in the presence of 20% DMSO added as a co-solvent. Addition of 20% DMSO did not alter the activity of TK_{gst} and also did not impact the assay fidelity. A homogenous assay solution could only be achieved at 10 mM substrate concentration, whereas at 25 mM incipient cloudiness of the solution precluded an accurate colorimetric measurement (Fig. 2). However, using substrate concentrations as low as 10 mM might be beneficial by enforcing more selective screening conditions that should favour enzyme variants having an improved substrate affinity.

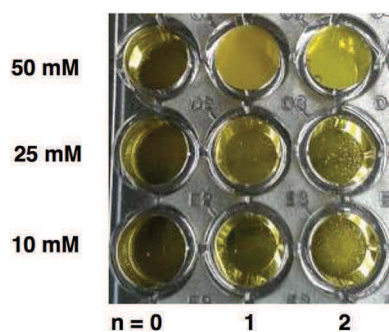


Fig. 2 Solubility limits of phenylalkanal substrates $\text{Ph}(\text{CH}_2)_n\text{CHO}$ (**1a–c**) for assay development using buffer with 20% DMSO added as co-solvent.

As a short-cut we chose to screen the positive sub-set that was obtained by previous screening of the entire L382X/D470X library for activity with aliphatic aldehydes such as propanal.¹⁷ The focus on this set of 198 clones confirmed as active hits with simple aliphatic substrates seemed plausible for the following reasons: firstly because of the structural similarity of the propanal moiety that offered high likelihood for activity also with the corresponding aryl-substituted substrate, secondly because inactive or incorrectly folded variants were already excluded from the library, and thirdly because sequences for this hit collection had already been determined, which offered the most economical interpretation for any new hits to be identified from a recurrent screening campaign.

Screening the active variant collection with the adapted high-throughput pH-assay method indeed yielded mostly active catalysts from which a set of 15 best hits was selected for further study that surpassed a threshold of more than 8-fold activity when compared to wild-type TK_{gst}. Identified hits were confirmed by re-screening, then the protein variants were expressed and purified for individual kinetic characterization (Fig. 3, Table S1; see ESI[†]).

Interestingly, while 9 hits (60%) out of this set of 15 best catalysts for 3-phenylpropanal (**1c**) were also found among the best variants previously identified to be active with propanal and other aliphatic substrates,¹⁷ the best hits overall for **1c** were identified as new candidates that were found to be less active with propanal. In particular, the best hit discovered for conversion of **1c** was the variant L382 M/D470L, which has an activity of 28-fold over wild-type TK_{gst} but had shown only 3-fold higher activity when screened with propanal.¹⁷ This improved activity could be due to increased hydrophobic binding affinity of the arylated aldehyde **1c** in the active site.

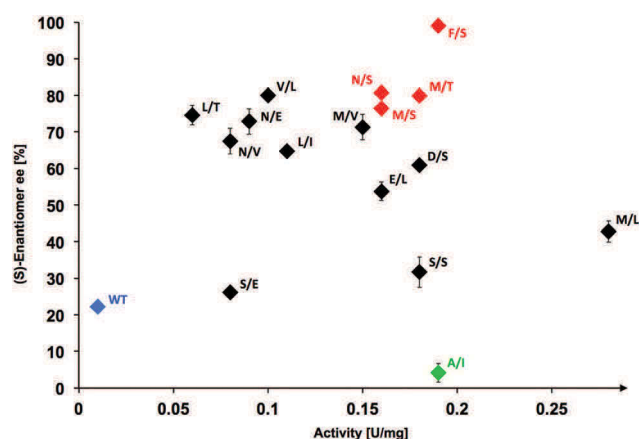


Fig. 3 Property spread for TK_{gst} variants identified from L382X/D470X library that were identified for >8-fold higher activity with 3-phenylpropanal (**1c**) than wild-type enzyme (blue). Variants showing highest effectivity (red) and lowest stereoselectivity (green) are highlighted in color. Variants are labeled with one-letter code for clarity. Assay solution (200 μL) contained TK_{gst} variant (25 μg), Li-HPA (50 mM), **1c** (10 mM), ThDP (2.4 mM), MgCl_2 (9 mM), phenol red (0.028 mM), DMSO (20% v/v) and triethanolamine buffer (2 mM, pH 7.5). The ee of product **2c** was determined by chiral HPLC analysis.



Determination of stereoselectivity for active TK_{gst} variants

The stereoselectivity of the active variants in the carbonylation step with 3-phenylpropanal (**1c**) was determined by chiral HPLC analysis of the products formed upon analytical-scale synthesis reactions performed at room temperature. Wild-type TK_{gst} produced the carbonylation product **2c** rather sluggishly with only low 22% ee, which was rather unexpected in view of the much higher 79% ee observed for addition to propanal.¹⁷ The most active variant L382 M/D470L showed only 43% ee in the carbonylation step, which seems to indicate that the mutation probably improves the general binding affinity without significantly improving the carbonyl orientation. The majority of the top active variants (10/15 = 67%) catalysed the addition with 54–81% ee.

Replacement of Asp470 by non-polar residues mostly led to catalysts that convert **1c** with low selectivity, while small polar residues (Ser, Thr) seem to be a better compromise to support both good rate and selectivity; *e.g.*, the single variant D470T showed 75% ee for **1c**. The least selective catalyst proved to be the L382A/D470I variant, which gave almost racemic product (4% ee). The most selective variant L382F/D470S showed a perfect product ee of >99% at a very high 19-fold rate acceleration. With propanal, the latter variant had been determined previously to show only 5-fold rate increase and 94% ee.¹⁷ It is interesting to note that the unique L382F mutation apparently is critical for an optimally controlled orientation of the aldehyde carbonyl group in the carbonylation transition state to induce maximum stereoselectivity, because we previously observed a similar preference for the L382F mutation when investigating the selectivity with aliphatic aldehyde substrates.¹⁷

Analysis of substrate scope

In a subsequent stage, the most effective variants verified from the screening with **1c**, *i.e.* L382F/D470S, L382N/D470S, L382 M/D470S and L382 M/D470T as judged by rate and stereoselectivity, were also tested for their activity profile with structurally related substrates (Fig. 4, Table S2; see ESI[†]). Wild-type TK_{gst} and the most active variant L382 M/D470L were included for comparison. Substrate modifications considered in this study were the lower homologue 2-phenylethanal (**1b**) and a few heteroatom containing substrate analogues such as phenyloxyethanal (equivalent in size to **1c**), benzyloxyethanal as well as (*N*-Cbz)-3-aminopropanal that were included to represent compounds of varying polarity and molecular dimensions. Substrate **1b** showed a rate profile very similar to that for **1c**, and the other aldehydes were also accepted by the variants tested with improved rate (up to 19-fold activity relative to wild-type). Interestingly, reactions of both the aryl ether components showed almost identical activity when compared to each other with all of the catalysts considered, but reactions were consistently somewhat less accelerated than those of pure arylkanals, despite the fact that the oxygenated compounds should profit from a higher electrophilic reactivity. Possibly, the oxygen atom is experiencing electrostatic repulsive inter-

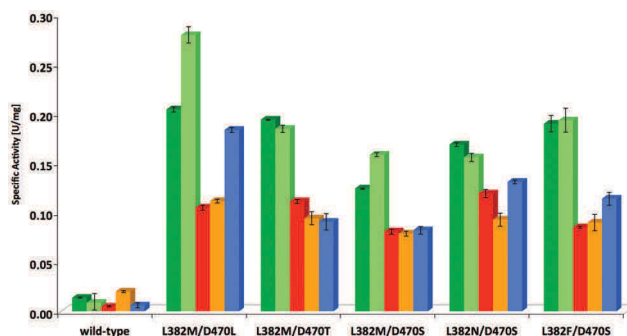
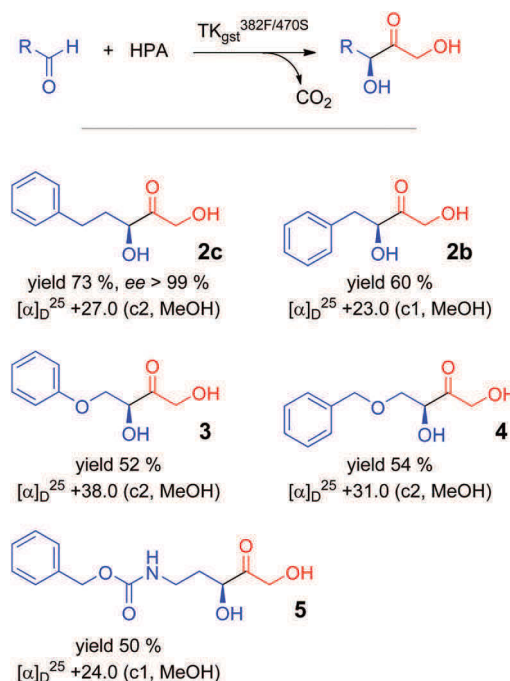


Fig. 4 Substrate scope of new TK_{gst} variants for aryl-containing aldehydes. Substrates: ■ 2-phenylethanal, ■ 3-phenylpropanal, ■ phenoxyethanal, ■ benzyloxyethanal, ■ (*N*-Cbz)-3-aminopropanal. The assay solution (200 μL) contained TK_{gst} variant (25 μg), Li-HPA (50 mM), aldehyde (10 mM), ThDP (2.4 mM), MgCl₂ (9.4 mM), phenol red (0.028 mM), DMSO (20% v/v) and triethanolamine buffer (2 mM, pH 7.5).

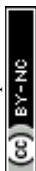


Scheme 2 Synthetic reactions performed with variant TK_{gst} L382F/D470S.

actions not found for the aliphatic chains, or the extent of hydrate formation.

Preparative-scale experiments using best TK_{gst} variant

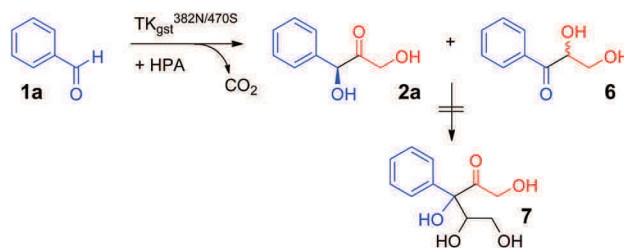
Preparative carbonylation was carried out with all the tested aldehyde substrates and HPA as the nucleophile using the most effective (active and selective) variant L382F/D470S (Scheme 2). Reactions were conducted at 50 °C to profit from high overall reaction rates and the improved solubility of the arylated aldehyde substrates. The corresponding products were isolated with moderate to good yields (50–73%) and spectroscopically characterized to confirm their constitution. The



stereoselectivity was analysed by chiral HPLC, which gave high resolution for the racemic product from 3-phenylpropanal obtained by a chemical synthesis method²⁷ and showed an excellent enantiomeric purity (>99% ee) for the enzymatically produced material **2c**. In correlation with results obtained for the structurally related propanal adduct, it is assumed that the ketodiols must have the (3*S*) configuration. An earlier literature report had shown that the TK_{eco} variant D469T also converts 2-phenylethanal into the corresponding (3*S*)-ketodiols with 96% ee.¹² Despite extensive experimental variation, the other products could not be directly resolved with available chiral HPLC columns, and derivatization (*e.g.*, mono- or dibenzoylation)¹² led to significant levels of racemized products.¹⁷ However, we found that the isolated AB signal of the C1 protons, which is a characteristic of all the products, differentially shifts in the presence of Pirkle's alcohol, and thus allows for a sensitive determination of the enantiomeric purity. This method correlates well with the HPLC determination for **2c** and confirmed the optical purity (>98% ee) of the products **2b**, **3**, **4** and **5**, as was to be expected from the close structural relationship across the substrate series (Table S3; see ESI[†]).

Identification of improved TK_{gst} variants for benzaldehyde

Benzaldehyde (**1a**) is an attractive substrate for the synthesis of chiral building blocks but suffers from rather low electrophilicity relative to aliphatic aldehydes, and consequent lower reactivity in enzymatic carbonylation reactions due to its resonance stabilization. On the other hand, aqueous solubility of **1a** is significantly higher than for the phenylalkanal studied (Fig. 2). Similar to TKs from other organisms,¹² wild-type TK_{gst} showed very little activity against **1a** (Fig. 5), which clearly is of kinetic origin upon coupling to the practically irreversible decarboxylation of HPA. When the most stereoselective variant L382F/D470S showed only little improved reactivity with **1a** (<10-fold enhancement), the entire original hit library for propanal was screened again with **1a** in an attempt to find active clones that are better suited to adapt the increased bulkiness of this specific substrate type. The screening identified four



Scheme 3 Conversion of benzaldehyde performed with variant TK_{gst} L382N/D470S.

unique TK variants L382E/D470T, L382N/D470T, L382N/D470S and L382D/D470S (Fig. 5).

Apparently, an exchange of the native negatively charged Asp470 with a polar but uncharged Ser or Thr residue seems to improve the productive binding of **1a** for the carbonylation step. Our recent studies also revealed Ser or Thr replacements for Asp470 to be instrumental for activity and stereoselectivity of TK_{gst} with non-hydroxylated substrates,¹⁷ as well as with unnaturally (2*S*)-configured hydroxyaldehydes.¹⁸ Similar observations were previously also reported for analogous variants of TK_{eco} created at its corresponding Asp469 site, among which the D469T variant turned out to show low activity towards unsubstituted **1a** and related hetero-analogous compounds that was not observed with the wild-type.¹² Thus, it seems clear that at least one hydrogen bond donating residue at position 470 (in TK_{gst}) is critical to maintain sufficiently high activity with substrates that do not carry any, or at least no (2*R*)-hydroxylation. In order to evaluate this hypothesis, we further compared the activity of the single-point variant TK_{gst} D470T, which confirmed its activity with benzaldehyde, albeit at a rather low level like for the TK_{eco} homologue (Fig. 5). On the other hand, this result also revealed that much of the higher rate acceleration by more than one order of magnitude observed for the double-site hits is caused by the accompanying replacement of the second residue, which hints to a strong cooperative effect. §

Quite to our surprise, all hits for **1a** include an exchange of the hydrophobic Leu382 by a polar or even anionic residue, which by its location should be positioned in direct contact with the large hydrophobic aromatic ring system. Although O–H/π bonding in a suitable substrate orientation may be involved, as well as new hydrogen bonding contacts to neighbouring residues, a more detailed interpretation is currently difficult in the absence of an experimental structure or reliable computational model for these mutants.

Stereoselectivity determination for the reaction with **1a** (Scheme 3) was investigated using the variant L382N/D470S, which displayed the highest overall rates. An accurate ee ana-

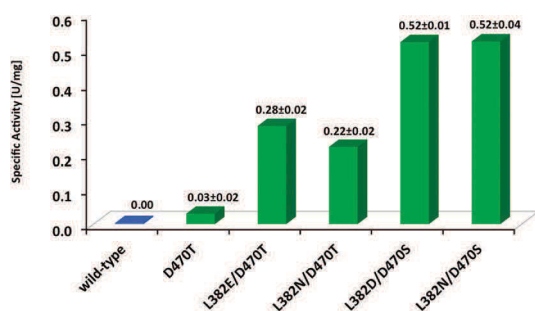
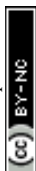


Fig. 5 TK_{gst} variants identified for improved activity against benzaldehyde (**1a**), in comparison to wild-type as a negative control and the TK_{gst} D470T variant (matching the published TK_{eco} D469T mutation) as a positive control. The assay solution (200 μL) contained TK_{gst} variant (20 μg), Li-HPA (50 mM), **1a** (10 mM), ThDP (2.4 mM), MgCl₂ (9.4 mM), phenol red (0.028 mM), DMSO (20% v/v) and triethanolamine buffer (2 mM, pH 7.5).

§ Notably, the specific activity of *ca.* 0.5 U mg⁻¹ our best TK variants identified for benzaldehyde conversion compares quite favourably with the activity of 2.5 U mg⁻¹ of the so far best variant of the pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* that recently had been engineered for optimized carbonylation activity with benzaldehyde for (*R*)-PAC synthesis.^{6d}



lysis²⁸ proved difficult, though, because of the instability of the chiral centre in **2a** under the slightly basic reaction conditions (pH 7.5) due to C–H acidity of the ketone and the benzylic activation. The tendency for *in situ* racemization *via* enolate formation may also be inferred from a facile carbonyl rearrangement to the resonance-stabilized benzylic position, which gave rise to the formation of the corresponding *rac*-dihydroxypropiophenone **6** upon extended reaction times, as has been noted elsewhere.¹² However, no side products from consecutive double carbonylation events (*i.e.*, **7**) were observed as had been reported for TK_{eco} catalysts (Scheme 3).¹²

Conclusions

In this study, we have identified various double-site variants of the TK_{gst} with significant improvement of activity and stereoselectivity towards arylated aldehydes (**1a–c**), which expand the toolbox for asymmetric carbonylation towards an important class of new products.¶ It is appropriate to note that the reactions presented above lead to novel chiral products that hitherto were inaccessible by biocatalytic carbonylation activity. So far, these structures cannot be produced by using other ThDP-dependent enzymes and, because of their unique acyloin nature of the ketodiol moiety, they are no substrates for aldolases either.^{3,4,9}

Our study confirms that the stable TK_{gst} is an excellent catalytic scaffold for challenging reaction conditions such as the presence of organic co-solvents at elevated temperatures needed to support the conversion of non-physiological substrates having low aqueous solubility. The intrinsic stereoselectivity of TK_{gst} and its engineered variants render them valuable candidates for elaborate synthetic processes that can be operated efficiently under mild conditions with low environmental footprint.

Experimental

Materials and methods

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. Li-HPA,³⁰ 2-benzyloxyethanal,³¹ 2-phenoxyethanal and (*N*-Cbz)-3-amino-propanal³² were synthesized according to literature procedures. NMR spectra were recorded on Bruker AR-300 and DRX-500 spectrometers. IR spectra were recorded on a FT-IR spectrometer Paragon 1000. Column chromatography was performed on Merck 60 silica gel (0.063–0.200 mesh; Millipore); analytical thin layer chromatography was performed on Merck silica gel plates 60 GF254 with anisaldehyde stain for detection. Reaction pH for preparative synthesis was maintained using a Schott TitroLine alpha TL autotitrator. Chiral HPLC analysis was performed on a Shimadzu 20A system using a

Daicel Chiralpak IB column (4 × 250 mm) and *n*-hexane with 10% isopropanol was used as a mobile phase at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ with UV detection at 215 nm. Optical rotation was measured using a Perkin Elmer Model 141 polarimeter. Kinetic measurements were carried out on a SpectraMax 190 microplate reader at 560 nm.

Library screening

Transketolase library. For the construction of the TK_{gst} Leu382X/Asp470X double-site mutagenesis libraries, the QuikChange kit from Agilent (USA) was used. The complete protocol for the library creation was already described.¹⁷

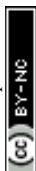
Preparation of cell-free lysate. 2 µL of each clone from the subset library (198 clones; active hits from propanal screening) was transferred to individual wells in 96-well plates containing 150 µL per well LB growth media comprised with 50 µg mL⁻¹ kanamycin. BL21(DE3) host cells were used as a control. The plates were sealed with plastic lids to avoid evaporation, and then incubated (Heidolph Titramax 1000 microplate incubator) at 37 °C, 900 rpm overnight. After that, 20 µL was transferred from each well to 96-deepwell plates containing 400 µL per well of LB-kanamycin (50 µg mL⁻¹) growth medium with 0.1 mM IPTG. The plates were covered with sealing foil, then incubated at 30 °C, 1200 rpm overnight. Cells were harvested by centrifugation at 4000g for 30 min. The culture medium was removed and the cell pellets stored at –80 °C. The cell pellets were suspended in 150 µL re-suspension buffer (1/10 BugBuster solution (Novagen, Germany)), 0.5 mg mL⁻¹ lysozyme (Roth, Germany) and 4 U mL⁻¹ Benzonase endonuclease (Novagen, Germany) and incubated in a shaker for 1 hour at room temperature. Then, the cell lysate was centrifuged at 4000g for 30 min.

Mutant screening method. A 40 µL aliquot of the supernatant, containing *ca.* 40 µg of TK protein, was transferred to a new 96-well plate. Substrate solution [140 µL; containing 9 mM MgCl₂, 2.4 mM ThDP, 0.028 mM phenol red, 10 mM 3-phenylpropanal (20% DMSO), 2 mM TEA at pH 7.5] was added to each well. The reaction was initiated by the addition of 50 mM HPA as the lithium salt (Li-HPA). The OD increase was read by plate-reader at 560 nm. Positive colonies with greater than 8-fold activity from all plates were picked into a new plate for a second round of screening.

Expression and purification of positive mutants

Each clone was raised in 2 L auto-induction medium (without preculture)³³ with addition of a few drops anti-foam suspension. After 20 h incubation at 200 rpm and 37 °C, the culture was harvested at 4000 rpm for 30 minutes. The collected cells were re-suspended in 100 mL of 20 mM phosphate buffer (pH 7.4), and the suspension was frozen at –20 °C. After thawing, lysozyme (1 mg mL⁻¹) and DNase I (1 µL mL⁻¹ from stock of 1 mg mL⁻¹ in 50% glycerol (w/v); 20 mM Tris HCl, pH 7.5; 1 mM MgCl₂) were added and the mixture stirred for 1 h at 37 °C. After addition of 100 mL 0.5 M NaCl, 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) the suspension was centrifuged at 12 000g for 30 min. The supernatant was removed and 30 mM

¶ Interestingly, all hits active with **1a** (except for the L382F/D470S variant) were also found to be active with (*E*)-cinnamaldehyde,²⁹ as could be gathered by TLC monitoring of small analytical-scale experiments.



imidazole (5 M stock solution) was added. The Ni-NTA column (GE FastFlow resin with gravity flow) was equilibrated with 0.5 M NaCl, 20 mM phosphate buffer pH 7.4. Then the supernatant was applied and the column washed with 10 column volumes of buffer with 30 mM imidazole to remove unbound and unspecifically bound proteins. Protein was eluted with 10 column volumes of 0.5 M NaCl, 20 mM phosphate buffer containing 50 mM EDTA. The buffer in the eluted protein solution was exchanged by ultra-filtration against 2 mM TEA buffer (pH 7.0) and this solution was lyophilized. The purity of these samples was analyzed by SDS-PAGE and their protein concentration was measured by the Bradford method.

General procedure for preparative scale biocatalytic synthesis

ThDP (28 mg, 2.4 mM) and MgCl₂·6H₂O (48 mg, 9.4 mM) were dissolved in H₂O (25 mL, total volume) and the pH adjusted to 7.5 using 0.1 M NaOH. To this, the lyophilized TK_{gst} (L382F/D470S or L382N/D470S) enzyme (12 mg) was added and the mixture stirred for 30 min. After 30 min Li-HPA (152 mg, 50 mM) and 3-phenylpropanal (50 mM) with 5% DMSO as co-solvent were added and then stirring continued at 50 °C. The pH was automatically maintained throughout at 7.5 by addition of 0.1 M HCl using a pH stat. Reactions were monitored by TLC, and after 12 h the reaction mixture was concentrated under vacuum. The crude material was dry loaded on a silica column and purified using cyclohexane–ethyl acetate (1 : 1) as eluent.

(R)-1,3-Dihydroxy-1-phenylpropan-2-one (2a).¹² Yield 103 mg (50%); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.41–7.32 (m, 5H), 5.24 (s, 1H), 4.34 (d, *J* = 19.4, 1H), 4.23 (d, *J* = 19.4 Hz, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 209.1, 137.5, 129.4, 129.3, 127.1, 77.9, 65.3.

(S)-1,3-Dihydroxy-4-phenylbutan-2-one (2b).¹² Yield 135 mg (60%); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.34–7.31 (m, 2H), 7.29–7.26 (m, 1H), 7.22–7.19 (m, 2H), 4.50–4.46 (m, 1H), 4.41 (d, *J* = 19.5, 1H), 4.31 (d, *J* = 19.5 Hz, 1H), 3.12 (dd, *J* = 14 Hz & 4.5 Hz, 1H), 2.88 (dd, *J* = 14 Hz & 8 Hz, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 211.4, 135.8, 129.5, 129.0, 127.4, 76.1, 66.4, 40.6.

(S)-1,3-Dihydroxy-5-phenylpentan-2-one (2c). Yield 177 mg (73%); [α]_D²⁵ = +27.0 (*c* 2, CH₃OH); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.27–7.33 (m, 3H), 7.18–7.24 (m, 2H), 4.44 (d, *J* = 19.5, 1H), 4.35 (d, *J* = 19.5, 1H), 4.26 (dd, *J* = 8.7 & 3.9 Hz, 1H), 2.78 (t, *J* = 7.8, 2H), 2.03–2.14 (m, 1H), 1.82–1.95 (m, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 211.8, 140.7, 128.7, 128.6, 126.4, 74.3, 65.6, 35.8, 31.1; EI-MS: *m/z* = 217.08357, calcd for C₁₁H₁₄O₃[M + Na], 217.08352; HPLC: racemic product gave retention times of 29.9 (3*S*) and 32.4 (3*R*) at 1 mL min⁻¹ flow rate with *n*-hexane and iso-propanol (95 : 05). The enzymatic product was obtained with ee >99% (3*S* isomer).

(S)-1,3-Dihydroxy-4-phenoxybutan-2-one (3). Yield 127 mg (52%); [α]_D²⁵ = +38.0 (*c* 2, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.31–7.28 (m, 2H), 7.02–6.99 (m, 1H), 6.91–6.88 (m, 2H), 4.67–4.52 (m, 3H), 4.28 (dd, *J* = 10 Hz & 4.5 Hz, 1H), 4.22 (dd, *J* = 10 Hz & 4.5 Hz, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 210.0, 157.9, 129.8, 122.1, 114.8, 74.4, 69.0, 66.9; ν_{max}(neat)/cm⁻¹

3441, 2925, 1730, 1242, 1081; ESI-MS: *m/z* calcd for C₁₁H₁₄O₃[M + Na] 219.06, found 219.07.

(S)-4-(Benzyloxy)-1,3-dihydroxybutan-2-one (4). Yield 142 mg (54%); [α]_D²⁵ = +31.0 (*c* 2, CH₃OH); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.38–7.27 (m, 5H), 4.59–4.49 (m, 3H), 4.45–4.37 (m, 2H), 3.77 (dd, *J* = 10 Hz & 4.5 Hz, 1H), 3.69 (dd, *J* = 10 Hz & 4.5 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 210.8, 137.1, 128.7, 128.3, 128.0, 75.0, 73.9, 70.9, 66.8; ν_{max}(neat)/cm⁻¹ 3446, 2926, 1717, 1098; ESI-MS: *m/z* calcd for C₁₁H₁₄O₃[M + Na] 233.08, found 233.09.

(S)-(N-Cbz)-5-amino-1,3-dihydropentan-2-one (5). Yield 158 mg (50%); [α]_D²⁵ = +24.0 (*c* 2, CH₃OH); a complex NMR spectrum was recorded that showed two cyclic diastereomeric hemi-aminal compounds and their conformational equilibrium: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.36–7.28 (m), 5.25 (t, *J* = 4.5 Hz) 5.13–5.05 (m), 4.49 (dd, *J* = 19.5 Hz & 9.5 Hz), 4.27 (dd, *J* = 9.5 Hz & 3.5 Hz), 4.18 (t, *J* = 4.5 Hz) 4.12–4.02 (m, 1H), 3.81–3.71 (m), 3.64–3.59 (m), 2.32–2.10 (m), 2.01–1.67 (m); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 212.6, 156.2, 136.3, 136.0, 128.7, 128.6, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 88.0, 77.4, 73.1, 72.8, 67.6, 67.3, 66.8, 66.0, 64.4, 43.3, 40.2, 37.0, 36.1, 34.1, 29.3, 24.2; ν_{max}(neat)/cm⁻¹ 3440, 2927, 2361, 1717, 1695, 1264, 1047; ESI-MS: *m/z* calcd for C₁₁H₁₄O₃[M + Na] 290.10, found 290.10.

Acknowledgements

This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant Fe244/9-1 to W. D. F.) and the Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-09-BLAN-0424-CSD3 to L. H.) within the framework of Programme Blanc International, as well as by ESF project COST CM1303 *Systems Biocatalysis*.

Notes and references

- (a) E. A. Meyer, R. K. Castellano and F. Diederich, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, **42**, 1210–1250; (b) E. Persch, O. Dumele and F. Diederich, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**, 3290–3327.
- U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore and K. Robins, *Nature*, 2012, **485**, 185–194.
- W.-D. Fessner, in *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, ed. V. Gotor, I. Alfonso and E. Garcia-Urdiales, Wiley-VCH, Weinheim, 2008, pp. 275–318.
- (a) W.-D. Fessner and C. Walter, *Top. Curr. Chem.*, 1996, **184**, 97–194; (b) M. Brovotto, D. Gamenara, P. Saenz Mendez and G. A. Seoane, *Chem. Rev.*, 2011, **111**, 4346–4403.
- (a) A. J. Humphrey, N. J. Turner, R. McCague and S. J. C. Taylor, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1995, 2475–2476; (b) E. Gonzalez-Garcia, V. Helaine, G. Klein, M. Schuermann, G. A. Sprenger, W.-D. Fessner and J.-L. Reymond, *Chem. – Eur. J.*, 2003, **9**, 893–899;



- (c) P. Hoyos, J.-V. Sinisterra, F. Molinari, A. R. Alcantara and P. Dominguez de Maria, *Acc. Chem. Res.*, 2009, **43**, 288–299;
- (d) M. Mueller, D. Gocke and M. Pohl, *FEBS J.*, 2009, **276**, 2894–2904; (e) M. Mueller, G. A. Sprenger and M. Pohl, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2013, **17**, 261–270; (f) H. C. Hailes, D. Rother, M. Mueller, R. Westphal, J. M. Ward, J. Pleiss, C. Vogel and M. Pohl, *FEBS J.*, 2013, **280**, 6374–6394.
- 6 (a) V. B. Shukla and P. R. Kulkarni, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, **16**, 499–506; (b) B. Rosche, M. Breuer, B. Hauer and P. L. Rogers, *J. Biotechnol.*, 2005, **115**, 91–99; (c) V. Sandford, M. Breuer, B. Hauer, P. Rogers and B. Rosche, *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, **91**, 190–198; (d) D. Meyer, L. Walter, G. Kolter, M. Pohl, M. Muller and K. Tittmann, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 3609–3616; (e) T. Sehl, H. C. Hailes, J. M. Ward, R. Wardenga, E. V. Lieres, H. Offermann, R. Westphal, M. Pohl and D. Rother, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 6772–6775.
- 7 (a) G. Schenk, R. G. Duggleby and P. F. Nixon, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1998, **30**, 1297–1318; (b) R. A. W. Frank, F. J. Leeper and B. F. Luisi, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2007, **64**, 892–905; (c) S. J. Costelloe, J. M. Ward and P. A. Dalby, *J. Mol. Evol.*, 2008, **66**, 36–49; (d) M. Widmann, R. Radloff and J. Pleiss, *BMC Biochem.*, 2010, **11**, 9.
- 8 P. Srere, J. R. Cooper, M. Tabachnik and E. Racker, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, **74**, 295–305.
- 9 W.-D. Fessner and V. Helaine, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001, **12**, 574–586.
- 10 (a) Y. Kobori, D. C. Myles and G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 5899–5907; (b) N. J. Turner, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000, **11**, 527–531; (c) R. Wohlgenuth, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2009, **61**, 23–29.
- 11 D. Yi, T. Devamani, J. Abdoul-Zabar, F. Charmantray, V. Helaine, L. Hecquet and W.-D. Fessner, *ChemBioChem*, 2012, **13**, 2290–2300.
- 12 J. L. Galman, D. Steadman, S. Bacon, P. Morris, M. E. B. Smith, J. M. Ward, P. A. Dalby and H. C. Hailes, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 7608–7610.
- 13 G. R. Hobbs, M. D. Lilly, N. J. Turner, J. M. Ward, A. J. Willets and J. M. Woodley, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1993, 165–166.
- 14 K. G. Morris, M. E. B. Smith, N. J. Turner, M. D. Lilly, R. K. Mitra and J. M. Woodley, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1996, **7**, 2185–2188.
- 15 J. Abdoul-Zabar, I. Sorel, V. Helaine, F. Charmantray, T. Devamani, D. Yi, V. de Berardinis, D. Louis, P. Marliere, W.-D. Fessner and L. Hecquet, *Adv. Synth. Catal.*, 2013, **355**, 116–128.
- 16 G. Ali, T. Moreau, C. Forano, C. Mousty, V. Prevot, F. Charmantray and L. Hecquet, *ChemCatChem*, 2015, **7**, 3163–3170.
- 17 D. Yi, T. Saravanan, T. Devamani, F. Charmantray, L. Hecquet and W.-D. Fessner, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 480–483.
- 18 J. Abdoul Zabar, M. Lorilliere, D. Yi, S. Thangavelu, T. Devamani, L. Nauton, F. Charmantray, V. Helaine, W.-D. Fessner and L. Hecquet, *Adv. Synth. Catal.*, 2015, **357**, 1715–1720.
- 19 (a) Y. Lindqvist, G. Schneider, U. Ermler and M. Sundström, *EMBO J.*, 1992, **11**, 2373–2379; (b) M. Nikkola, Y. Lindqvist and G. Schneider, *J. Mol. Biol.*, 1994, **238**, 387–404; (c) G. Schneider and Y. Lindqvist, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1385**, 387–398; (d) P. Asztalos, C. Parthier, R. Golbik, M. Kleinschmidt, G. Huebner, M. S. Weiss, R. Friedemann, G. Wille and K. Tittmann, *Biochemistry*, 2007, **46**, 12037–12052; (e) N. Maltseva, Y. Kim, K. Kwon, A. Joachimiak and W. F. Anderson, *RCSB protein data bank*, 2010, entry 3M49; (f) P. Neumann and K. Tittmann, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2014, **29**, 122–133; (g) L. Nauton, V. Helaine, V. They and L. Hecquet, *Biochemistry*, 2016, **55**, 2144–2152.
- 20 (a) E. G. Hibbert, T. Senussi, M. E. B. Smith, S. J. Costelloe, J. M. Ward, H. C. Hailes and P. A. Dalby, *J. Biotechnol.*, 2008, **134**, 240–245; (b) M. E. B. Smith, E. G. Hibbert, A. B. Jones, P. A. Dalby and H. C. Hailes, *Adv. Synth. Catal.*, 2008, **350**, 2631–2638; (c) A. Cazares, J. L. Galman, L. G. Crago, M. E. B. Smith, J. Strafford, L. Rios-Solis, G. J. Lye, P. A. Dalby and H. C. Hailes, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 1301–1309.
- 21 (a) A. Ranoux, S. K. Karmee, J. Jin, A. Caiazzo, I. W. C. E. Arends and U. Hanefeld, *ChemBioChem*, 2012, **13**, 1921–1931; (b) F. Subrizi, M. Cardenas-Fernandez, G. J. Lye, J. M. Ward, P. A. Dalby, T. D. Sheppard and H. C. Hailes, *Green Chem.*, 2016, **18**, 3158–3165.
- 22 (a) P. Payongsri, D. Steadman, J. Strafford, A. MacMurray, H. C. Hailes and P. A. Dalby, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 9021–9029; (b) P. Payongsri, D. Steadman, H. C. Hailes and P. A. Dalby, *Enzyme Microb. Technol.*, 2015, **71**, 45–52.
- 23 (a) W.-D. Fessner, *New Biotechnol.*, 2015, **32**, 658–664; (b) W.-D. Fessner and C. Walter, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1992, **31**, 614–616.
- 24 (a) G. Simon, T. Eljezi, B. Legeret, F. Charmantray, J. Castillo, C. Guerard-Helaine, M. Lemaire, M. Bouzon-Bloch, P. Marliere, V. Helaine and L. Hecquet, *ChemCatChem*, 2013, **5**, 784–795; (b) L. Hecquet, W.-D. Fessner, V. Helaine and F. Charmantray, in *Cascade Biocatalysis*, ed. S. Riva and W.-D. Fessner, Wiley-VCH, Weinheim, 2014, pp. 315–337.
- 25 U. Nilsson, L. Meshalkina, Y. Lindqvist and G. Schneider, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 1864–1869.
- 26 W. L. DeLano, *The PyMOL Molecular Graphics System, v1.3*, Schrödinger LLC, 2002, <http://www.pymol.org>.
- 27 (a) M. E. B. Smith, K. Smithies, T. Senussi, P. A. Dalby and H. C. Hailes, *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, 1121–1123; (b) K. Rohr and R. Mahrwald, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 1878–1880.
- 28 J. L. Galman and H. C. Hailes, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2009, **20**, 1828–1831.
- 29 A. Cosp, C. Dresen, M. Pohl, L. Walter, C. Roehr and M. Mueller, *Adv. Synth. Catal.*, 2008, **350**, 759–771.
- 30 (a) F. Dickens and D. H. Williamson, *Biochem. J.*, 1958, **68**, 74–81; (b) A. W. Holldorf, in *Methods of Enzymatic Analysis*, (3rd ed.), ed. H. U. Bergmeyer, VCH Weinheim, 1984, vol VI, pp. 578–582.



- 31 R. K. Haynes, W. W.-L. Lam, L.-L. Yeung, I. D. Williams, A. C. Ridley, S. M. Starling, S. C. Vonwiller, T. W. Hambley and P. Lelandais, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 4552–4553.
- 32 L. Espelt, T. Parella, J. Bujons, C. Solans, J. Joglar, A. Delgado and P. Clapes, *Chem. – Eur. J.*, 2003, **9**, 4887–4899.
- 33 F. W. Studier, *Protein Expression Purif.*, 2005, **41**, 207–234.



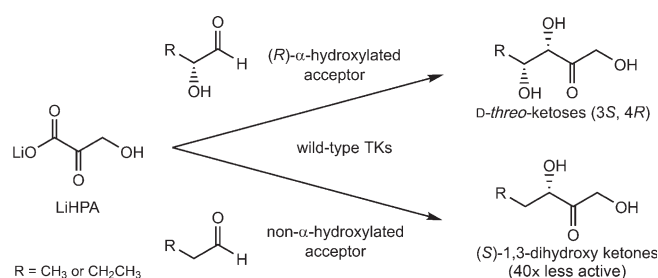
Second-Generation Engineering of a Thermostable Transketolase (TK_{Gst}) for Aliphatic Aldehyde Acceptors with Either Improved or Reversed Stereoselectivity

Chaoqiang Zhou,^[a] Thangavelu Saravanan,^[b] Marion Lorillière,^[c] Dongzhi Wei,^[a] Franck Charmantray,^[c] Laurence Hecquet,^[c] Wolf-Dieter Fessner,^[b] and Dong Yi*^[a]

The transketolase from *Geobacillus stearothermophilus* (TK_{Gst}) is a thermostable enzyme with notable high activity and stability at elevated temperatures, but it accepts non- α -hydroxylated aldehydes only with low efficiency. Here we report a protein engineering study of TK_{Gst} based on double-site saturation mutagenesis either at Leu191 or at Phe435 in combination with Asp470; these are the residues responsible for substrate binding in the active site. Screening of the mutagenesis libraries resulted in several positive variants with activity towards propanal up to 7.4 times higher than that of the wild type. Variants F435L/D470E and L191V/D470I exhibited improved (73% *ee*, 3*S*) and inverted (74% *ee*, 3*R*) stereoselectivity, respectively, for propanal. L191V, L382F/E, F435L, and D470/D470I were concluded to be positive mutations at Leu191, Leu382, Phe435, and Asp470 both for activity and for stereoselectivity improvement. These results should benefit further engineering of TK_{Gst} for various applications in asymmetric carbonylation.

A transketolase (EC 2.2.1.1, TK) is a thiamine-diphosphate (ThDP)-dependent enzyme that catalyzes the transfer of a two-carbon hydroxyacetyl unit from a ketose phosphate to an aldose phosphate with reversible C–C bond cleavage and formation.^[1] In addition to phosphorylated substrates, TK also has a wide acceptor tolerance for non-phosphorylated aldose sugars.^[2] Moreover, the use of hydroxypyruvate (HPA) as donor results in the formation of carbon dioxide concomitantly with the two-carbon unit transfer, thus making the reaction irreversible.^[3] Therefore, TKs have become potent biocatalysts for the asymmetric synthesis of chiral ketose-type products,^[4] with the

newly formed asymmetric carbon atoms having the 3*S* configuration (Scheme 1).



Scheme 1. TK-catalyzed reactions with lithium hydroxypyruvate (LiHPA) and generic aldehydes.

We recently cloned a previously unidentified thermostable TK that shows notable high activity and stability at elevated temperatures from the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* (TK_{Gst}).^[5] High thermostability is a significant and useful feature for an enzyme, with the potential to expand its potential for preparative applications and future biocatalyst development.^[6] The ability to perform processes at elevated temperatures could offer opportunities to broaden the scope of synthetic applications based on biocatalysis by a thermostable TK, firstly due to improved solubility of hydrophobic aldehyde acceptors at higher temperatures, and secondly due to increased activity of the enzyme, especially towards unconventional substrates.^[7] However, like TKs from other sources, TK_{Gst} has strict enantiomer selectivity for α -substituted aldehyde acceptors, with a 2*R*-hydroxylated aldehyde being required for high activity, leading to the synthesis of D-threo-ketoses (3*S*,4*R*). However, we showed that at high temperature TK_{Gst} activity towards 2*S*-hydroxylated aldehydes is greatly enhanced, thus allowing the synthesis of the corresponding L-erythro-ketoses (3*S*,4*S*).^[8] A comprehensive comparative analysis of the substrate tolerance of TK_{Gst} showed that non- α -hydroxylated aldehydes are accepted by wild-type TK_{Gst} with activity 40 times lower than that towards the corresponding α -hydroxylated derivatives (Scheme 1).^[5] The removal of the α -hydroxy group reduces the number of possible hydrogen-bonding contacts between TK and acceptor substrate and might also affect the catalytic efficiency and the stereoselectivity of TK_{Gst}.^[5,9] Thus, a structural adjustment based on mutagenesis of the residues in the active site that make contact with the substrate might help to improve the binding and activation of non- α -hydroxylated sub-

[a] C. Zhou, Prof. D. Wei, Dr. D. Yi
State Key Laboratory of Bioreactor Engineering
East China University of Science and Technology
Meilong Road 130, 200237 Shanghai (P.R. China)
E-mail: charlesdyi@yahoo.com

[b] Dr. T. Saravanan, Prof. W.-D. Fessner
Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität
Darmstadt
Alarich-Weiss-Strasse 4, 64287 Darmstadt (Germany)

[c] M. Lorillière, Dr. F. Charmantray, Prof. L. Hecquet
Université Blaise Pascal ou Université Clermont Auvergne
Institut de Chimie de Clermont-Ferrand
B. P. 10448, 63000 Clermont-Ferrand (France)
and
CNRS, UMR 6296, ICCF
63177 Aubière (France)

Supporting information and the ORCID identification numbers for the authors of this article can be found under <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201600609>.

strates. Here we report on combined saturation mutagenesis of TK_{Gst} at the positions Leu191, Phe435, and Asp470, as well as on its influence on the activity and stereoselectivity of TK_{Gst} towards aliphatic aldehyde acceptors.

In order to identify the key amino acid residues that bind to the substrates, we simulated the structure of TK_{Gst} by using the web-tool SWISS-Model^[10] and the crystal structures of TKs from *Bacillus anthracis* (PDB ID: 3M49) and *Saccharomyces cerevisiae* (PDB ID: 1NGS)^[11] as templates, because of their high protein sequence similarity to TK_{Gst} (Figure 1). In the substrate tunnel

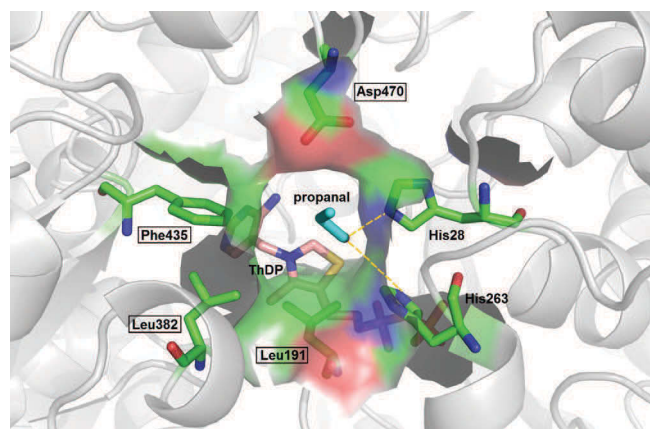


Figure 1. Model of the acceptor binding based on structure simulation of TK_{Gst} with use of the X-ray crystal structure of TK from *B. anthracis* (PDB ID: 3M49) as template. The simulated structure was aligned to the X-ray crystal structure of yeast TK (PDB ID: 1NGS)^[11] to obtain the conformation of ThDP and E4P in the pocket. The structure of propanal was aligned to E4P to obtain its conformation. Graphic created with PyMOL software.

of the active pocket, a hydrogen bond forms between Asp470 and the α -hydroxy group of D-erythrose-4-phosphate (E4P), which is a natural substrate of TKs. At the position opposite Asp470, Leu382 provides a hydrophobic contribution to substrate binding. Therefore, in our previous study, these two key residues were chosen as the preferred mutagenesis positions for the creation of a double-site saturation mutagenesis library, out of which the top variant—L382F/D470—has specific activity towards propanal 11 times higher than that of the wild type, yielding the 3S product with high *ee* (> 95%).^[9] However, all of the positive variants from this library were found to maintain the stereopreference for the 3S configuration, except for the variant L382I/D470L, which showed inversed stereoselectivity but only with a very low *ee* (9.4%).^[9] None of the positive variants can be used for the synthesis of 3R-configured products.

Aside from Leu382 and Asp470, we also found that Leu191 and Phe435 form a nonpolar pocket jointly with Leu382. Leu191, Leu382, Phe435, and Asp470 are arranged almost in a plane in space surrounding the C2 atom of an acceptor. Therefore, a rational combination of residues at these four positions might either endow TK_{Gst} with improved affinity or invert its stereoselectivity towards aliphatic aldehyde acceptors. Thus, we chose Leu191 and Phe435 as new positions for further mutagenesis. Because Asp470 is the key residue that

binds to the α -hydroxy group of a substrate, a mutation at this position will greatly affect the substrate specificity of TK_{Gst}. Therefore, we constructed two combined site-specific saturation mutagenesis (SSM) libraries for L191/D470 and F435/D470 replacement with a CAST-like strategy using NNK codon degeneracy; each requires at least 3066 clones for screening to achieve a statistical 95% coverage.^[12] Finally, 3456 colonies (2 × 36; 96-well plates) were in each case picked for these two double-site libraries, named L191/D470 and F435/D470.

For the screening of the mutagenesis libraries we used a previously described colorimetric pH-based high-throughput assay method^[13] based on the decarboxylation of lithium hydroxypyruvate (LiHPA) upon acyl transfer to an aldehyde acceptor. The continued release of carbon dioxide during the reaction increases the pH of the reaction mixture, which can be measured photometrically by the color change of the pH indicator phenol red at low buffer concentration. This pH-based assay method is independent of acceptor structure and broadly applicable. It allows rapid, sensitive, and reliable screening of variants obtained through directed evolution. By using this method, the top 21 and 22 positive clones towards propanal were identified in the L191/D470 and F435/D470 libraries, respectively, and the corresponding mutations were determined by plasmid sequencing. These top variants with propanal were finally collected for one-step heat-shock purification and independent activity identification.^[5,9] A high-throughput fluorimetry determination^[14] showed that the *T_m* values of all positive variants were between 77 and 79 °C, comparable with that of wild-type TK_{Gst} (77 °C, Table S1 in the Supporting Information). These results illustrate that mutagenesis at Leu191, Phe435, and Asp470 does not apparently affect the correct folding and high thermostability of TK_{Gst}.

The activity determination for all 43 variants from both libraries are summarized schematically in Figure 2, and values are listed in Table S1. Eight positive variants from the L191/D470 library have activity more than three times higher than that of the wild type. The top variant—L191I/D470L—has an activity improvement of roughly 7.4-fold. It is notable that all eight of these variants contain a Leu or an Ile mutation at the 470 position. This activity increase after a hydrophobic exchange of the D470 residue is similar to those seen in the L382/D470 library, out of which the top variant was the single-point variant L382I/D470L. Correspondingly, similar variation at position 191 with Ile, Leu, and Val produced the top four variants. Hydrophobic replacement at both the 191 and 470 positions could probably increase the affinity towards the alkyl moiety of the propanal substrate and thus greatly improve the activity towards aliphatic aldehyde acceptors.

Mutation at the 435 position was found to result in a rather limited activity improvement. Only three variants showed activity more than three times higher than that of the wild type, out of which the top variant—F435L/D470E—showed a roughly 4.9-fold activity improvement. Most positive variants contain nonpolar or uncharged polar residues at the 435 position, such as Leu, Ala, Val, Ile, Phe, Met, and Thr. The corresponding mutation at the 470 site resulted in larger variety of hits, including acidic, basic, polar, and nonpolar residues, such as Glu, Asp,

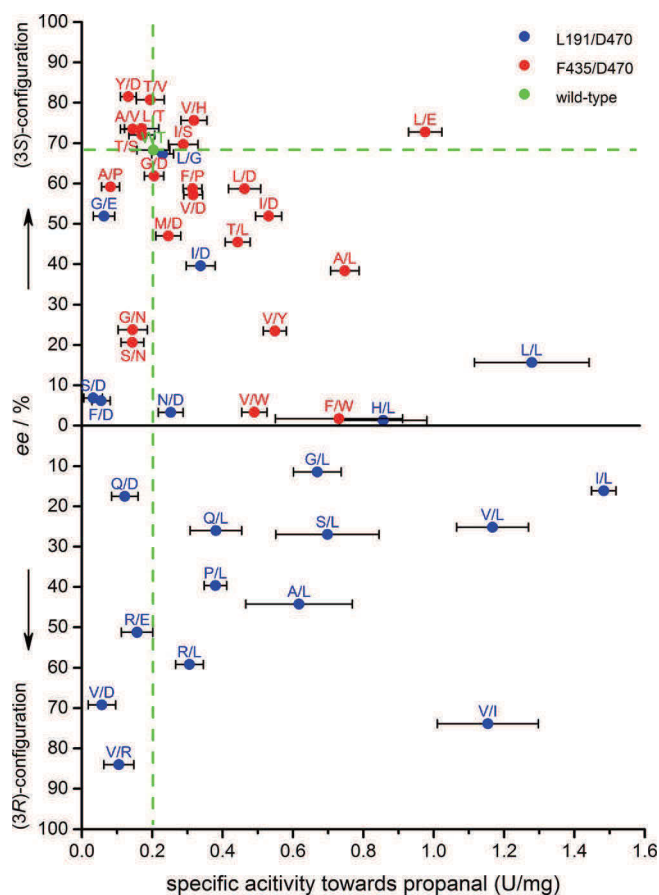


Figure 2. Property spread for TK_{Gst} variants from L191/D470 (blue) and F435/D470 (red) double-site saturation mutagenesis that were identified for activity with propanal. Wild-type TK_{Gst} is marked in green. Variants are labeled with one-letter codes for clarity. Reaction samples for the specific activity measurement contained phenol red (0.028 mM), ThDP (2.4 mM), MgCl_2 (9 mM), propanal (200 mM), LiHPA (50 mM), and TK variant samples (16 μg) in 200 μL of triethylamine (TEA) buffer (2 mM, pH 7.5). The reaction mixture for stereoselectivity determination contained ThDP (2.4 mM), MgCl_2 (9 mM), LiHPA (50 mM), propanal (50 mM), and TK enzyme (60 μg) in TEA buffer (50 mM, pH 7.5). The *ee* values of the products were determined by chiral GC after derivatization with acetic anhydride in pyridine as catalyst and solvent.

Trp, Tyr, Pro, His, Ser, and Leu. However, all of the residue combinations at the 435/470 positions followed the same trend of including at least one nonpolar amino acid.

To evaluate the effect of an extended carbon chain in an aliphatic aldehyde acceptor on the activity of positive variants, we measured their activity towards the C_4 aldehyde butanal, against glycolaldehyde as a reference substrate, because this is one of the best known acceptor substrates for wild-type TK_{Gst} (Table S1). Most variants presented an activity increase towards butanal proportionally with propanal (Figure S1), thus indicating that structurally similar aldehydes are likely processed by the TK variants through similar substrate binding interactions. A single-site mutation at the 435 position to Ile produced the best variant, with a 7.3-fold activity improvement towards butanal relative to the wild type. Meanwhile, whereas most variants showed low activity towards glycolaldehyde, probably because of the loss of hydrogen bonding to its α -hydroxy

group, several candidates that retain the wild-type Asp at the 470 position even showed improved activity towards glycolaldehyde (Table S1): up to 2.7-fold, for example, for the variant L191I/D470.

The stereoselectivity of all 43 top TK_{Gst} variants in the carbonylation step was determined with LiHPA as the donor and propanal as the acceptor in multi-deep-well format.^[9] The *ee* values of the product were determined by chiral GC after derivatization with acetic anhydride in pyridine as catalyst and solvent.^[9,15] Although peracetylation has been shown to cause some racemization owing to the basicity of pyridine,^[9] the method is still rapid and convenient for stereoselectivity screening. All of the *ee* values are listed in Table S1 and summarized schematically in Figure 2. These results clearly show that mutation at the Leu191 position strongly affects—and is even able to reverse—the stereoselectivity of TK_{Gst} . Approximately 62% of the positive variants from the L191/D470 library yielded products with the unnatural 3*R* configuration. Remarkably, three variants with a Val residue at the 191 position (L191V/D470R, L191V/D470I, and L191V/D470) exhibited the highest 3*R* stereoselectivity.

The top variant—L191V/D470R—formed a product with 84% *ee* (3*R*), although its activity towards propanal was less satisfactory. However, L191V/D470I showed both high activity and 3*R* stereoselectivity (5.8-fold activity improvement, 74% *ee*). In our previous study, we had identified a similar single-site D470I variant within the L382/D470 library showing a 16-fold activity improvement and 74% *ee* for 3*S* stereoselectivity.^[9] It is quite surprising that an additional conservative mutation at Leu191 to Val, a similar nonpolar residue, could completely reverse the stereoselectivity. It may be speculated that the shorter side chain of Val in relation to that of Leu might offer more space in the substrate tunnel and that this might cause some reorientation of the aliphatic chain of the substrate and in turn change the orientation of the aldehyde carbonyl group to position it for an attack of the nucleophile from the opposite face. In terms of the evolution results for TKs from other sources, only the H26Y and D469Y variants of TK from *Escherichia coli* (TK_{Eco}) have previously been reported to exhibit an inverted 3*R* stereoselectivity towards propanal, with 88 and 53% *ee*, respectively.^[15] However, a fourfold activity increase, as well as the level of enantioselectivity, claimed for the H26Y variant over the wild-type enzyme could not be reproduced.^[13]

In the F435/D470 library, all of the positive variants showed a conserved 3*S* stereoselectivity similar to that of the wild type. Variation at position 470 with Thr, Ser, Pro, Asn, Val, Glu, His, and Asp resulted in high *ee* values for the products. All of these residues except His were also found at the 470 position among the positive variants with strict 3*S* stereoselectivity from the L382/D470 library with a Phe or Glu at the 382 position, which indicates that mutations at Asp470 to Thr, Ser, Pro, Asn, Val, Glu, and Asp contribute to enhancing 3*S* stereoselectivity. The corresponding positive mutations at the 435 position were hydrophobic or uncharged polar residues, such as Ala, Leu, Val, Ile, Tyr, and Thr. No basic or acidic residues were observed at this position. Unfortunately, most of the top variants with improved 3*S* stereoselectivity have unexpectedly

low affinity towards propanal. Only the variant F435L/D470E (73% *ee*) showed a large activity improvement (4.9-fold). In this variant, three Leu residues might jointly form a nonpolar tunnel to hold the aliphatic portion tightly. In addition, the polar interaction of the residue at position 470 might limit the attack at the carbonyl group preferentially to only one face, thus resulting in improved stereoselectivity. To confirm product identity and enantiomeric purity from analytical experiments, we also synthesized (3*S*)- and (3*R*)-1,3-dihydroxypentan-2-one on a preparative scale with the aid of the variants F435L/D470E [52% yield, 73% *ee* (3*S*)] and L191V/D470I [58% yield, 74% *ee* (3*R*)], respectively.

Taken together, we have collected extensive screening results for three double-site saturation libraries to study the influence of residues at positions 191, 382, 435, and 470 of TK_{Gst} (L382/D470 in our previous study,^[9] L191/D470 and F435/D470 in this study) on substrate binding and their effect on the overall stereoselectivity in the stereogenetic event. These three libraries were designed to encompass each of the large hydrophobic residues at positions Leu191, Leu382, and Phe435 in combination with full saturation at the polar ionic position Asp470, which is known specifically to discriminate hydroxy-aldehyde configurations. The screening results allow drawing of conclusions for the subtle interactions among these three double-site combinations, which are graphically summarized as sets of residues producing similar consequences in Figure 3. Mutations giving rise to high activity (more than threefold improvement) or high stereoselectivity (> 60% *ee*) are clustered as separate sets. Their intersection sets identify those residues that were found to improve both activity and stereoselectivity. This graphic representation clearly presents the potential replacements at positions 191, 382, 435, and 470 and their synergistic effects on the activity and stereoselectivity of TK_{Gst} towards propanal (or related higher aliphatic aldehydes). All of these residues, especially those in the intersection sets, should represent excellent starting points for next-generation mutagenesis efforts directed towards improved catalysts for the conversion of non-hydroxylated acceptors. Meanwhile, these residues are also candidate sets for building “smart” triple- and even quadruple-site mutagenesis libraries for positions

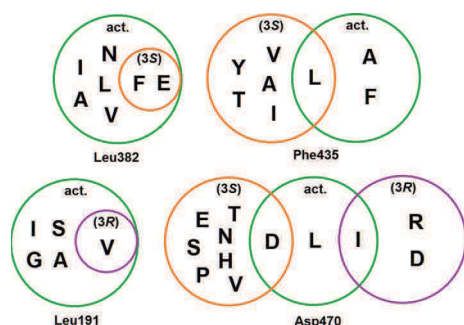


Figure 3. Graphical summary of positive effects observed for replacements at positions 191, 382, 435 and 470 of TK_{Gst} for conversion of propanal. Residues producing high activity (more than threefold improvement) are included in green cycle sets (act. = activity). Residues producing 3*S* or 3*R* stereoselectivity (each more than 60% *ee*) are included in separated cycle sets in orange and violet, respectively.

191, 382, 435, and 470 that should require a low screening effort.

In summary, in this study we have created new TK_{Gst} variants with significantly improved activity and stereoselectivity—and even with reversed stereoselectivity—for non-hydroxylated acceptor substrates. In combination with the screening results of our previous study, positive mutations at positions 191, 382, 435, and 470 are summarized in the form of a set graphic. In principle, new TK_{Gst} variants with both excellent stereoselectivity and greatly improved activity towards non-hydroxylated acceptor substrates might be achieved by further application of mutagenesis with residues in the intersection sets (Figure 3) as starting points. These results should greatly improve our understanding of the interactions between the residues at these four positions relative to the C2 binding of substrates and thus aid further studies on the engineering of thermostable TK_{Gst} to produce optimal biocatalysts for various applications in asymmetric carbonylation.

Experimental Section

For experimental details, see the Supporting Information.

Acknowledgements

This work was funded by the National Natural Science Foundation of China (Grant no. 21406069 to D.Y.), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant Fe244/9-1 to W.D.F.), and the Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-09-BLAN-0424-CSD3 and ANR-13-IS07-0003-01 to L.H.) within the framework of Programme Blanc International, as well as by ESF project COST CM1303 Systems Biocatalysis.

Keywords: biocatalysis • carbonylation • directed evolution • protein engineering • transketolases

- [1] G. Schenk, R. G. Duggleby, P. F. Nixon, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1998**, *30*, 1297–1318.
- [2] a) Y. Kobori, D. C. Myles, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5899–5907; b) G. R. Hobbs, M. D. Lilly, N. J. Turner, J. M. Ward, A. J. Willets, J. M. Woodley, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 165–166; c) A. J. Humphrey, N. J. Turner, R. McCague, S. J. C. Taylor, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 2475–2476; d) L. Hecquet, C. Demuyneck, G. Schneider, J. Bolte, *J. Mol. Catal. B* **2001**, *11*, 771–776; e) E. González-García, V. Helaine, G. Klein, M. Schuermann, G. A. Sprenger, W.-D. Fessner, J. L. Reymond, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 893–899.
- [3] G. De La Haba, I. G. Leder, E. Racker, *J. Biol. Chem.* **1955**, *214*, 409–426.
- [4] a) U. Schörken, G. A. Sprenger, *Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1998**, *1385*, 229–243; b) G. A. Sprenger, M. Pohl, *J. Mol. Catal. B* **1999**, *6*, 145–159; c) N. J. Turner, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 527–531; d) W.-D. Fessner, V. Helaine, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 574–586; e) R. Wohlgemuth, *J. Mol. Catal. B* **2009**, *61*, 23–29; f) P. Hoyos, J. V. Sinisterra, F. Molinari, A. R. Alcántara, P. D. De Maria, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 288–299; g) M. Brovetto, D. Gamena, P. S. Méndez, G. A. Seoane, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4346–4403.
- [5] J. Abdoul-Zabar, I. Sorel, V. Hélaine, F. Charmantray, T. Devamani, D. Yi, V. de Berardinis, D. Louis, P. Marlière, W.-D. Fessner, L. Hecquet, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 116–128.
- [6] M. E. Bruins, A. E. Janssen, R. M. Boom, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2001**, *90*, 155–186.

- [7] a) G. Ali, T. Moreau, C. Forano, C. Mousty, V. Prevot, F. Charmantray, L. Hecquet, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 3084–3088; b) T. Saravanan, M.-L. Reif, D. Yi, M. Lorilliere, F. Charmantray, L. Hecquet, W.-D. Fessner, *Green Chem.* **2017**, *19*, 481–489.
- [8] a) J. A. Zabar, M. Lorillière, D. Yi, T. Saravanan, T. Devamani, L. Nauton, F. Charmantray, V. Hélaine, W.-D. Fessner, L. Hecquet, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1715–1720; b) M. Lorilliere, M. De Sousa, F. Bruna, E. Heuson, T. Gefflaut, V. de Berardinis, T. Saravanan, D. Yi, W.-D. Fessner, F. Charmantray, L. Hecquet, *Green Chem.* **2017**, *19*, 425–435.
- [9] D. Yi, T. Saravanan, T. Devamani, F. Charmantray, L. Hecquet, W.-D. Fessner, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 480–483.
- [10] M. Biasini, S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. G. Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli, T. Schwede, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, W252–W258.
- [11] U. Nilsson, L. Meshalkina, Y. Lindqvist, G. Schneider, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 1864–1869.
- [12] M. T. Reetz, M. Bocola, J. D. Carballeira, D. Zha, A. Vogel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4192–4196; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4264–4268.
- [13] D. Yi, T. Devamani, J. Abdoul-Zabar, F. Charmantray, V. Hélaine, L. Hecquet, W.-D. Fessner, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2290–2300.
- [14] a) U. B. Ericsson, B. M. Hallberg, G. T. DeTitta, N. Dekker, P. Nordlund, *Anal. Biochem.* **2006**, *357*, 289–298; b) F. H. Niesen, H. Berglund, M. Vedadi, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2212–2221.
- [15] M. E. B. Smith, E. G. Hibbert, A. B. Jones, P. A. Dalby, H. C. Hailes, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2631–2638.

Manuscript received: November 11, 2016

Accepted Article published: December 22, 2016

Final Article published: January 27, 2017

Protein Engineering

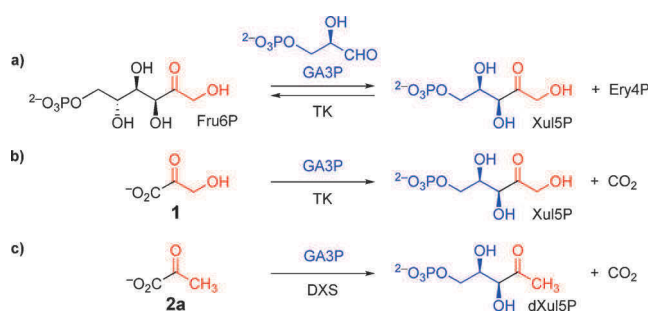
International Edition: DOI: 10.1002/anie.201701169
German Edition: DOI: 10.1002/ange.201701169

Donor Promiscuity of a Thermostable Transketolase by Directed Evolution: Efficient Complementation of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Synthase Activity

Thangavelu Saravanan, Sebastian Junker, Michael Kickstein, Sascha Hein, Marie-Kristin Link, Jan Ranglack, Samantha Witt, Marion Lorillière, Laurence Hecquet, and Wolf-Dieter Fessner*

Abstract: Enzymes catalyzing asymmetric carbonylation reactions typically show very high substrate specificity for their nucleophilic donor substrate components. Structure-guided engineering of the thermostable transketolase from *Geobacillus stearothermophilus* by directed in vitro evolution yielded new enzyme variants that are able to utilize pyruvate and higher aliphatic homologues as nucleophilic components for acyl transfer instead of the natural polyhydroxylated ketose phosphates or hydroxypyruvate. The single mutant H102T proved the best hit toward 3-methyl-2-oxobutyrate as donor, while the double variant H102L/H474S showed highest catalytic efficiency toward pyruvate as donor. The latter variant was able to complement the auxotrophic deficiency of *Escherichia coli* cells arising from a deletion of the *dxs* gene, which encodes for activity of the first committed step into the terpenoid biosynthesis, offering the chance to employ a growth selection test for further enzyme optimization.

Transketolase (TK, EC 2.2.1.1.) is a thiamine diphosphate (ThDP) dependent enzyme that catalyzes in vivo a reversible transfer of a C2 ketol fragment from a phosphorylated ketose to a phosphorylated aldose (Scheme 1).^[1] While wild-type TK accepts a large variety of hydroxyaldehydes as the electrophilic acceptor substrates with strict (2*R*)-specificity,^[2] we recently engineered variants of the TK from *Geobacillus stearothermophilus* (TK_{gst}) that can also efficiently convert (2*S*)-configured hydroxyaldehydes.^[3] In another directed evolution study we succeeded in the discovery of TK_{gst} variants that efficiently convert arylated aldehydes^[4] and non-hydroxylated aliphatic aldehydes with high stereocontrol for either native or reversed configuration.^[5] Similar studies were also reported for the TK from *E. coli*.^[6] On the other hand, TK shows very limited substrate tolerance toward the nucleophilic donor components. Although previous studies showed that substrate phosphorylation is not essential for



Scheme 1. Comparison of carbonylation reactions catalyzed by TK and DXS. a) Native equilibration of sugar phosphates by TK in vivo; b) directed carbonylation of TK by using hydroxypyruvate (**1**) in vitro; c) native carbonylation by DXS in vivo.

catalytic activity, apart from its natural (phosphorylated) ketose donors TK accepts only hydroxypyruvate (**1**). This non-natural substrate is particularly attractive for synthetic applications of TK because decarboxylation renders conversions essentially irreversible.^[7]

With regard to a broader application scope of TK catalysis, particularly in the development of novel in vitro reaction cascades along the strategic concept of *Systems Biocatalysis*,^[8] other 2-oxoacids such as pyruvate (**2a**) and higher homologues would be interesting alternative acyl donor substrates that would open up an access to a range of novel product types. Unfortunately, several authors have reported that TK itself is unable to react with **2a**,^[9] in line with the notion that enzymes catalyzing C–C bond formations are generally notorious for having a strict specificity for their nucleophilic substrate.^[10]

However, among the superfamily of ThDP-dependent enzymes^[11] some enzymes can utilize **2a** as their natural donor substrate for decarboxylative carbonylation. This includes the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS, EC 2.2.1.7), which specifically catalyzes the transfer of the acetyl group from **2a** to glyceraldehyde-3-phosphate to yield 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate as the first committed step into the non-mevalonate pathway of terpenoid biosynthesis (Scheme 1).^[12] Herein we report on structure-guided mutational studies to create variants of TK_{gst} that are able to use **2a** and related 2-oxoacids as donor substrates for a corresponding, highly stereoselective asymmetric C–C bond formation.

In the absence of an experimental 3D protein structure for TK_{gst} its substrate-binding pocket was modeled^[5] based on the close sequence homology with the TK from *Bacillus anthracis*

[*] Dr. T. Saravanan, S. Junker, M. Kickstein, S. Hein, M.-K. Link, J. Ranglack, S. Witt, Prof. Dr. W.-D. Fessner
Institut für Organische Chemie und Biochemie
Technische Universität Darmstadt
Alarich-Weiss-Strasse 4, 64287 Darmstadt (Germany)
E-mail: fessner@tu-darmstadt.de

M. Lorillière, Prof. Dr. L. Hecquet
Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont
Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF)
F-63000 Clermont-Ferrand (France)

Supporting information for this article can be found under:
<http://dx.doi.org/10.1002/anie.201701169>.

(74% identity), for which the X-ray crystal structure of the holoenzyme has recently been solved.^[13] In addition, both X-ray protein structures of TK and DXS from *E. coli* are available,^[14] as well as a snapshot of TK with covalent cofactor-bound substrate Fru6P.^[15] Based on the well-known similarity among the ThDP-dependent enzyme family and the highly conserved sequence motif for the cofactor-binding site,^[11] a structure alignment of the two *E. coli* enzymes (Figure 1) confirmed their highly similar active-site construction. The substrate-ligated TK structure indicates that physical contacts of the crucial CH₂OH moiety of the ketol donor exist to Gly116 (hydrogen bond to carbonyl), His68 (hydrophobic contact), His102 and His474 (hydrogen bonds to ring N). However, a major difference is that the His102 residue in TK is changed to phenylalanine in DXS, which plausibly will better accommodate the pyruvate methyl group instead by improving hydrophobic contacts.

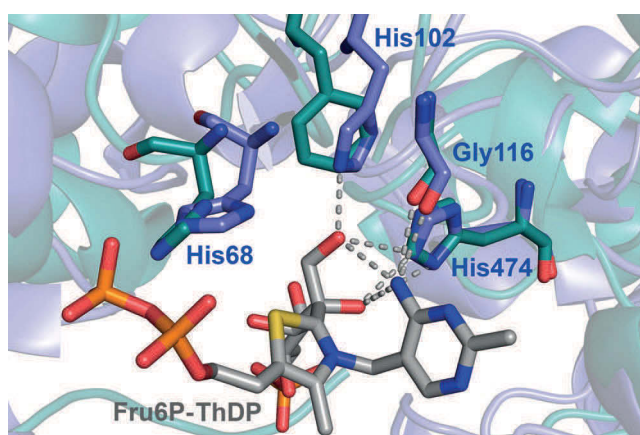


Figure 1. Comparison of the donor binding environments of TK and DXS from *E. coli* by superposition of their active sites based on the X-ray crystal structures (blue = TK, PDB entry 2R8P; green = DXS, PDB entry 2O1S). Graphic was created with PyMOL.^[16]

A multiple sequence alignment (MSA) performed for both TK and DXS from a diverse set of organisms confirms their highly conserved active-site organization. Particularly, there is a high sequence homology for the active site residues of TK and DXS enzymes that are directly involved in the donor substrate binding (Figure 2), except that the TK H102 residue is consistently replaced by Phe or Tyr in DXS enzymes.

To test for background activity, standard wild type enzymes from TK_{gst} and the TK from *E. coli* and yeast (TK_{eco} and TK_{sce}, respectively) were assayed for conversion of

	64	72	98	106	112	120	470	478
TK _{gst}	LSAGHGSML		KTPGHPEYG		EATTGPLGQ		DGPTHPIPIE	
TK _{eco}	LSNGHGSML		KTPGHPEVG		ETTTGPLGQ		DGPTHQPVE	
TK _{sce}	LSNGHAVAL		RTPGHPEFE		EVTTGPLGQ		DGPTHQPIE	
DXS _{gst}	WDVGHQAYV		GLSGFPKRS		VNETGHSST		DGETHQGVF	
DXS _{eco}	WDVGHQAYP		GLHPFPWRG		VLSVGHSSST		DGQTHQGF	

Figure 2. Partial alignment of selected TK and DXS protein sequences. Numbering follows the sequence of TK_{gst}. Residues highlighted in color correspond to those in contact to the ThDP-bound nucleophile (see Figure 1). *Saccharomyces cerevisiae* does not have a gene coding for DXS.

2a in the presence of glycolaldehyde (**3**) as the best-known acceptor substrate using a recently developed pH-sensitive colorimetric assay.^[17] The assay principle is based on the increase of the reaction pH as a result of substrate decarboxylation, which is measured by using a pH indicator. Very low residual activity was observed with all the three wild type TK (Table 1; Supporting Information, Table S4) against a control

Table 1: Kinetic properties of selected TK variants toward pyruvate (**2a**).^[a]

Variants	K_M [mM]	k_{cat} [$\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$]	k_{cat}/K_M [$\times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$]
wt-TK _{gst}	40.2 ± 3.5	39 ± 1	1 ± 0.3
TK _{gst} (H102F)	35.1 ± 5.3	53 ± 3	2 ± 0.5
TK _{gst} (H102L)	29.1 ± 1.6	183 ± 3	6 ± 2.0
TK _{gst} (H474S)	30.0 ± 2.9	101 ± 3	3 ± 1.1
TK _{gst} (H474N)	13.4 ± 2.5	85 ± 4	6 ± 1.5
TK _{gst} (H102L/H474S)	16.6 ± 0.7	170 ± 2	10 ± 2.6
TK _{gst} (H102L/H474N)	6.1 ± 2.1	50 ± 3	8 ± 1.5
DXS _{eco}	3.3 ± 1.1	497 ± 23	150 ± 21.3

[a] Kinetic constants were determined by varying the concentration of substrate **2a** (0–200 mM). The assay solution contained 0.03–0.04 mg purified enzyme, 2.4 mM ThDP, 9 mM MgCl₂, 10 mM glycolaldehyde (**3**) and 0.028 mM of phenol red in 200 μ L of triethanolamine buffer (2 mM, pH 7.5).

without acceptor. However, the assay is unable to distinguish between plain decarboxylation of **2a** versus true transketolase activity (decarboxylation followed by acyl transfer to acceptor). Therefore, a preparative scale synthesis was attempted with wild type TK_{gst} at 50 °C to check for the carboligation step, from which the product L-1-deoxyerythrose (**4a**) could indeed be isolated in 9% yield, thereby proving the pH assay results.

Protein engineering to improve the TK activity with **2a** was performed on the thermostable TK_{gst}, which shows mutational robustness.^[3,5] First, the rational Phe replacement for His102 was constructed to create a DXS-like situation in the TK_{gst} active site. Notably, the designed H102F variant showed only little improvement in its activity with **2a** as donor (Table 1). Similar low activity with **2a** had earlier been detected with the corresponding H103F variant of TK_{sce}.^[18]

Thus, we opted for a semi-rational engineering approach focusing on all residues that are in direct contact to the CH₂OH moiety of **1** (His68, His102, Gly116, His474) with screening for improved reaction rates with **2a**. Iterative saturation mutagenesis (ISM)^[19] was chosen to mutate each of the residues individually. This directed evolution approach is a compromise that keeps library sizes small but still allows sampling for cooperative binding effects. His68 and Gly116 were included for reason of comprehensiveness although His68 is involved in cofactor binding, and upon replacement of Gly116 side-chain orientation would be opposite to the substrate. Libraries were screened with **2a** (50 mM) using the pH-dependent assay. Indeed, libraries G116X and H68X did not deliver any positive hits. However, both H102X and H474X libraries yielded 25% of significantly improved variants. The four best unique protein variants from these two single libraries were purified by NTA affinity chromatography for kinetic characterization. All four variants

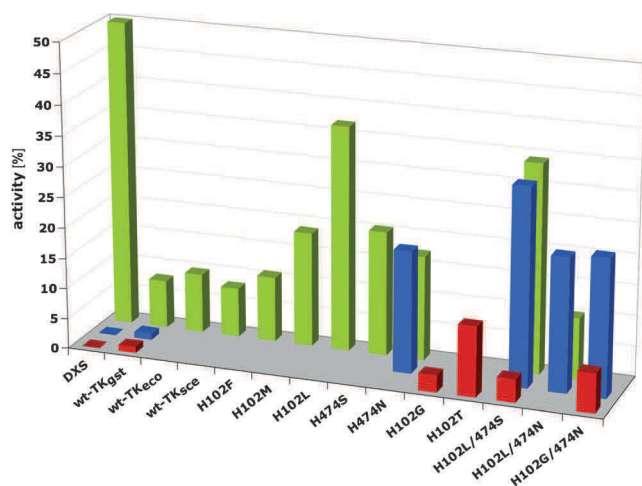


Figure 3. Activity of TK_{gst} variants (k_{cat}) against non-natural nucleophile substrates relative to native DXS_{eco} (set as 100% for reference): ■ pyruvate (**2a**), ■ 2-oxobutanoate (**2b**), ■ 3-methyl-2-oxobutanoate (**2c**).

showed a higher activity than the H102F variant, which corresponds to the DXS situation (Table 1, Figure 3).

The best variants H102L and H474N showed practically identical catalytic efficiency but differed significantly in their K_M values. The variant H102L was found to be the most active, showing a k_{cat} of about one third of native DXS_{eco} under saturating conditions, while the variant H474N showed the best substrate affinity with a K_M value about four-fold compared to that of DXS_{eco}.

In a subsequent round, the positive hits were used as templates to generate four secondary saturation libraries (H102L/H474X, H102M/H474X, H474N/H102X and H474S/H102X). Screening furnished eight positive hits, from which sequencing identified H102L/H474N and H102L/H474S as unique (Table 1; Supporting Information, Table S4). Probably, more stringent assay conditions (< 50 mM of **2a**) might have been more efficient to identify variants with improved substrate affinity. The double variant H102L/H474N showed the best K_M value for **2a** of all variants, approaching the affinity of the native DXS_{eco} (Table 1, Figure 3). The variant H102L/H474S displayed a ten times higher catalytic efficiency than wild type TK_{gst} and five-fold better than the H102F variant. Interestingly, all of these engineered TK variants retained high stability against thermal unfolding ($T_m = 75.3$ – 78.5 °C; Supporting Information, Table S2) and were still able to convert **1** at various degree (Supporting Information, Table S3).

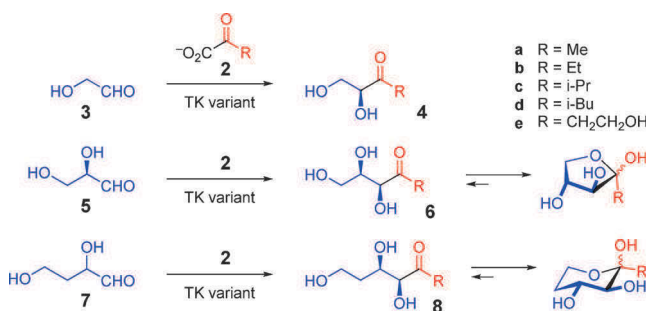
In an effort to study the donor substrate scope of the variants all single- and double-site libraries were screened toward activity with the sterically more demanding branched-chain oxoacids 3-methyl-2-oxobutanoate (**2c**) and 4-methyl-2-oxopentanoate (**2d**). Interestingly, in screenings with **2c** (10 mM) two single variants (H102G and H102T) and two double variants (H102L/H474S and H102G/H474N) were found to be active, while no positive hits revealed activity toward the more bulky higher homologous **2d**. After purification, kinetic data for these variants were determined (Figure 3; Supporting Information, Table S6). Clearly, variant

H102T showed the highest rates and efficiency. Finally, top candidates identified from both previous screenings were also kinetically analyzed against 2-oxobutanoate (**2b**) and 4-hydroxy-2-oxobutanoate (**2e**)^[20] (each at 10 mM) as donor substrates of intermediate size (Figure 3; Supporting Information, Table S5). The best candidate (highest k_{cat}) found with **2b** was the double variant H102L/H474S that showed a catalytic rate very similar to that with **2a** while profiting from significantly enhanced substrate affinity. Notably, the polar substrate analogue **2e** was not accepted.

Apparently, an exchange of the two histidine residues by smaller side chains is required to make room for the larger nucleophilic substrates (**2b**, **2c**). In position His474 it seems to be essential that a hydrogen bond donating capacity to the ketol carbonyl moiety is preserved, which is attained by replacements for serine or asparagine that both are also of similar, slightly reduced size. A replacement of His102 by a non-polar leucine residue not only will better accommodate the extra space requirements but also improve the binding of a hydrophobic alkyl chain of the substrate in the otherwise highly polar active site of TK as reflected in the reduced K_M values. Curiously enough, His474 stabilizing the acyl oxygen by hydrogen bonding is invariant among all species except for mammalian TKs where it is replaced by glutamine.^[21]

Although the overall catalytic efficiency of the variants (k_{cat}/K_M) with substrates **2a** and **2c** are relatively low in comparison to that of the native DXS_{eco} enzyme (with **2a**), with **2b** some variants interestingly reach up to 28–39% of its catalytic efficiency, probably reflecting a compromise of good steric fit and positive hydrophobic interactions.

Preparative-scale synthesis with non-natural nucleophiles was performed at 50 °C to profit from the higher activity of the TK_{gst} variants at elevated temperatures (Scheme 2, Table 2). In a combinatorial manner, nucleophiles **2a–2c** were reacted with **3**, D-glyceraldehyde (**5**) and *rac*-2,4-



Scheme 2. Preparative syntheses catalyzed by best identified TK_{gst} variants for the conversion of oxoacids **2a–c** using aldehydes **3**, **5** and **7**.

dihydroxybutanal (**7**) as electrophiles, respectively, using the appropriate best TK_{gst} variants (H102L/474S for **2a/2b** and H102T for **2c**). The corresponding products **4a–4c**, **6a–6c** and **8a–8c** were obtained in good overall yields, somewhat lower only for the sterically more bulky series **c**. Reactions proceeded with high enantio- and diastereoselectivity for the natural configuration, as determined by $[\alpha]_D$ comparison, chiral-phase GC and NMR analysis.

Table 2: Synthetic reactions performed with non-natural nucleophiles using best TK_{gst} variants.^[a]

Aldehyde	Oxo-acid	TK _{gst} variant	Product	Configuration	ee/de [%]	Yield [%]
3	2a	H102L/H474S	4a	(S) ^[b]	> 95	88
3	2b	H102L/H474S	4b	(S)	— ^[c]	72
3	2c	H102T	4c	(S)	> 99	69
5	2a	H102L/H474S	6a	(2R,3S)	> 97 ^[d]	72
5	2b	H102L/H474S	6b	(2R,3S)	> 97 ^[d]	60
5	2c	H102T	6c	(2R,3S)	> 97 ^[d]	52
7 ^[e]	2a	H102L/H474S	8a	(3R,4S)	> 97 ^[d]	62
7 ^[e]	2b	H102L/H474S	8b	(3R,4S)	> 97 ^[d]	60
7 ^[e]	2c	H102T	8c	(3R,4S)	> 97 ^[d]	48 ^[f]

[a] Reaction solution contained 12 mg purified enzyme (0.5 mol% relative to oxoacid), 2.4 mM ThDP, 9.4 mM MgCl₂, 50 mM aldehyde (**3** or **5**) and 50 mM oxoacid in 25 mL H₂O (adjusted to pH 7.5 by pH stat using 0.1 N HCl; 50 °C, 12 h).

[b] Configuration by comparison of [α]_D to authentic material. [c] Enantiomers could not be resolved by GC/HPLC. [d] de, determined by NMR analysis. [e] 100 mM *rac*-7. [f] Separation from starting material difficult.

Complete kinetic resolution of *rac*-7 yielded the pure (2*R*)-derived products, analogous to the wild-type ability,^[22] as evident by ¹H NMR analysis using the deoxy methylene group as stereochemical reporter group in the cyclic isomers of **8a–c**.^[17,23] Identification of stereoisomers was facilitated via direct correlation with products obtainable by catalysis from fructose-6-phosphate aldolase (FSA), which gives products **4a,b** (from methanal),^[24] **6a,b** (from **3**),^[25,26] and **8a,b** (from 3-hydroxypropanal) with identical constitution and stereoconfiguration.^[23,25] Thus, TK and FSA offer a directly complementary approach for the series **a** and **b**, while products **4c**, **6c** and **8c** are uniquely available only by TK catalysis because FSA is unable to convert nucleophiles carrying a branching point directly next to the carbonyl group.^[23] DXS_{eco}, which is highly specific for its native substrate (Figure 3), has been shown to catalyze the synthesis of **4a** and **6a** only.^[27] Another advantage of TK catalysis is that syntheses are driven by substrate decarboxylation, while the success of FSA synthesis depends on the magnitude of the aldol equilibrium constants.

To verify the functionality of wild-type TK_{gst} and its evolved variants for activity against **2a** in vivo, a complementation test was performed using the engineered auxotrophic *E. coli* strain EcAB4-2 (*dxs*:CAT),^[28] in which the *dxs* gene had been disrupted by insertion of a selection marker. Because *E. coli* cells depend on the *dxs* gene for terpenoids synthesis,^[12] its disruption leads to an auxotrophic strain that will only be able to grow if suitable metabolites can be taken up from the medium, or if the strain is complemented by a plasmid based gene replacement. This strain requires either supplementation by mevalonic acid (MVA) from the medium for growth or complementation by a non-chromosomal *dxs*-type gene to support the reaction depicted in Scheme 1c. For that purpose, strain EcAB4-2 was transformed with plasmids carrying the mutant gene for TK_{gst} (H102L/H474S), the wild-type TK_{gst}, the *dxs* gene for expression of native DXS_{eco}

(positive control), or the empty vector (negative control). As shown in Figure 4, in the absence of MVA the transformants of strain EcAB4-2 were unable to grow when carrying only the empty vector, but grew successfully when complemented by the native *dxs* gene or the mutant gene for TK_{gst} with very similar growth rates. Surprisingly, even the wild-type gene for TK_{gst} could sustain growth, albeit at a significantly retarded rate. Presumably, the latter observation must be explained by the fact that larger concentrations of the inefficient TK_{gst} enzyme, which become available by efficient intracellular overexpression from a multi-copy vector, can also compensate for the loss of the *dxs* gene.

In this study the semi-rational evolution of the thermostable TK_{gst} led to the discovery of several new variants that are able to convert pyruvate (**2a**) as a non-natural nucleophilic substrate to imitate the native reaction catalyzed by DXS. Notably, the mutagenesis strategy revealed several protein variations that were far superior over the rationally designed H102F variant, which mimics the native DXS sequence. Even sterically more demanding

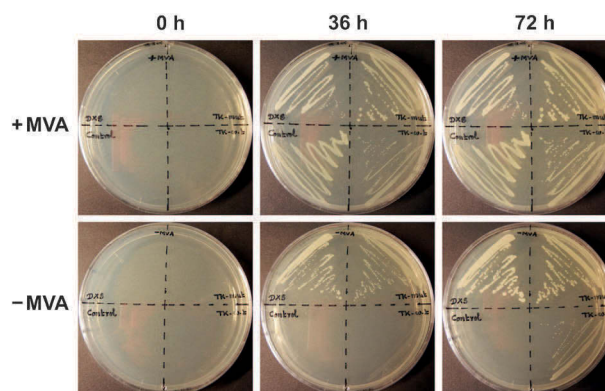


Figure 4. Complementation study of *E. coli* *dxs* auxotrophic strain by plasmid based genes coding for DXS_{eco} (positive control), TK_{gst} (H102S/H474L) and wild-type TK_{gst} against empty vector as negative control (from top left quadrant in clockwise order, respectively). Recombinant *E. coli* strains were plated on LB medium containing as selection markers 100 μg mL⁻¹ ampicillin, 17 μg mL⁻¹ chloramphenicol, 25 μg mL⁻¹ kanamycin, and 0.5 mM IPTG. The medium was supplemented with *rac*-MVA (1 mM) as indicated. Plates were incubated at 37 °C for the times indicated.

oxoacids 2-oxobutanoate (**2b**) and branched-chain 3-methyl-2-oxobutanoate (**2c**) could be converted with good rates, and products were obtained with high enantioselectivity and diastereoselectivity that match the ability of the wild-type TK_{gst} with hydroxypyruvate (**1**). While TK reactions with substrates **2a** and **2b** offer a synthetic access complementary to using FSA, TK products derived from **2c** are unique because branching is inaccessible via FSA catalysis. We are confident that the promiscuity of TK for nucleophilic substrates could be further expanded by suitable mutagenesis to address novel product structures that are valuable as chiral building blocks.

The ability of TK_{gst} mutants to complement the *dxs*⁻ phenotype was proven by transformation of the auxotrophic *E. coli* strain EcAB4-2. We note that this observation offers an opportunity for further evolution of optimized DXS-like activity for TK_{gst} variants by random mutagenesis followed by growth selection under suitable limiting conditions.

Acknowledgements

This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant Fe244/9-1 to W.D.F.) and the Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-09-BLAN-0424-CSD3 to L.H.) within the framework of Programme Blanc International, as well as by ESF project COST CM1303 Systems Biocatalysis. We gratefully acknowledge Profs M. Rodríguez-Concepción and A. Boronat, Barcelona, for generously providing us with the *dxs* deficient strain EcAB4-2 and Dr. A. Magnusson for measuring the *T_m* data.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: acylolins · asymmetric synthesis · biocatalysis · carbonylation · protein engineering

How to cite: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 5358–5362
Angew. Chem. **2017**, *129*, 5442–5447

- [1] G. Schenk, R. G. Duggleby, P. F. Nixon, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1998**, *30*, 1297–1318.
- [2] a) Y. Kobori, D. C. Myles, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5899–5907; b) N. J. Turner, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 527–531; c) W.-D. Fessner, V. Helaine, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 574–586; d) R. Wohlgemuth, *J. Mol. Catal. B* **2009**, *61*, 23–29.
- [3] J. Abdoul Zabar, M. Lorilliere, D. Yi, T. Saravanan, T. Devamani, L. Nauton, F. Charmantray, V. Helaine, W.-D. Fessner, L. Hecquet, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1715–1720.
- [4] T. Saravanan, D. Yi, M. Lorilliere, F. Charmantray, L. Hecquet, W.-D. Fessner, *Green Chem.* **2017**, *19*, 481–489.
- [5] a) D. Yi, T. Saravanan, T. Devamani, F. Charmantray, L. Hecquet, W.-D. Fessner, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 480–483; b) C. Zhou, T. Saravanan, M. Lorilliere, D. Wei, F. Charmantray, L. Hecquet, W.-D. Fessner, D. Yi, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 455–459.
- [6] a) A. Cázares, J. L. Galman, L. G. Crago, M. E. B. Smith, J. Strafford, L. Rios-Solis, G. J. Lye, P. A. Dalby, H. C. Hailes, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1301–1309; b) P. Payongsri, D. Steadman, H. C. Hailes, P. A. Dalby, *Enzyme Microb. Technol.* **2015**, *71*, 45–52; c) M. E. B. Smith, E. G. Hibbert, A. B. Jones, P. A. Dalby, H. C. Hailes, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2631–2638.
- [7] P. Srere, J. R. Cooper, M. Tabachnik, E. Racker, *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, *74*, 295–305.
- [8] W.-D. Fessner, *New Biotechnol.* **2015**, *32*, 658–664.
- [9] a) R. A. Usmanov, G. A. Kochetov, *Biokhimiya* **1983**, *48*, 550–558; b) J. Bolte, C. Demuyneck, O. Constant, L. Hecquet in *Microbial Reagents in Organic Synthesis* (Ed.: S. Servi), Kluwer Academic, Dordrecht, **1992**, pp. 57–66; c) L. E. Meshalkina, H. Neef, M. V. Tjaglo, A. Schellenberger, G. A. Kochetov, *FEBS Lett.* **1995**, *375*, 220–222; d) A. Ranoux, S. K. Karmee, J. Jin, A. Bhaduri, A. Caiazzo, I. W. C. E. Arends, U. Hanefeld, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1921–1931.
- [10] a) W.-D. Fessner, C. Walter, *Top. Curr. Chem.* **1996**, *184*, 97–194; b) M. Brovetto, D. Gamenara, P. Saenz Mendez, G. A. Seoane, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4346–4403.
- [11] a) R. A. W. Frank, F. J. Leeper, B. F. Luisi, *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 892–905; b) S. J. Costelloe, J. M. Ward, P. A. Dalby, *J. Mol. Evol.* **2008**, *66*, 36–49; c) M. Widmann, R. Radloff, J. Pleiss, *BMC Biochem.* **2010**, *11*, 9; d) C. Vogel, J. Pleiss, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2014**, *82*, 2523–2537.
- [12] G. A. Sprenger, U. Schorken, T. Wiegert, S. Grolle, A. A. De Graaf, S. V. Taylor, T. P. Begley, S. Bringer-Meyer, H. Sahn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12857–12862.
- [13] N. Maltseva, Y. Kim, K. Kwon, A. Joachimiak, W. F. Anderson, *RCSB protein data bank* (PDB entry 3M49, DOI: 10.2210/pdb3m49/pdb).
- [14] a) J. Littlechild, N. Turner, G. Hobbs, M. Lilly, A. Rawas, H. Watson, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1995**, *51*, 1074–1076; b) S. Xiang, G. Usunow, G. Lange, M. Busch, L. Tong, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 2676–2682.
- [15] P. Asztalos, C. Parthier, R. Golbik, M. Kleinschmidt, G. Huebner, M. S. Weiss, R. Friedemann, G. Wille, K. Tittmann, *Biochemistry* **2007**, *46*, 12037–12052.
- [16] W. L. DeLano, The PyMOL Molecular Graphics System, v1.3, Schrödinger LLC., **2002**, <http://www.pymol.org>.
- [17] D. Yi, T. Devamani, J. Abdoul-Zabar, F. Charmantray, V. Helaine, L. Hecquet, W.-D. Fessner, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2290–2300.
- [18] a) C. Wikner, L. Meshalkina, U. Nilsson, S. Backstroem, Y. Lindqvist, G. Schneider, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 750–755; b) U. Schörken, Dissertation, University of Düsseldorf **1997**.
- [19] a) M. T. Reetz, J. D. Carballeira, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 891–903; b) M. T. Reetz, S. Prasad, J. D. Carballeira, Y. Gumulya, M. Bocola, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9144–9152.
- [20] K. Hernandez, J. Bujons, J. Joglar, S. J. Charnock, P. Dominguez de Maria, W.-D. Fessner, P. Clapes, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 1707–1711.
- [21] a) C. K. Singleton, J. J. L. Wang, L. Shan, P. R. Martin, *Biochemistry* **1996**, *35*, 15865–15869; b) L. Mitschke, C. Parthier, K. Schroeder-Tittmann, J. Coy, S. Luedtke, K. Tittmann, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 31559–31570.
- [22] J. Abdoul-Zabar, I. Sorel, V. Helaine, F. Charmantray, T. Devamani, D. Yi, V. de Berardinis, D. Louis, P. Marliere, W.-D. Fessner, L. Hecquet, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 116–128.
- [23] D. Gueclue, A. Szekrenyi, X. Garrabou, M. Kickstein, S. Junker, P. Clapes, W.-D. Fessner, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 1848–1852.
- [24] J. A. Castillo, C. Guerard-Helaine, M. Gutierrez, X. Garrabou, M. Sancelme, M. Schuermann, T. Inoue, V. Helaine, F. Charmantray, T. Gefflaut, L. Hecquet, J. Joglar, P. Clapes, G. A. Sprenger, M. Lemaire, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 1039–1046.
- [25] M. Rale, S. Schneider, G. A. Sprenger, A. K. Samland, W.-D. Fessner, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2623–2632.
- [26] A. L. Concia, C. Lozano, J. A. Castillo, T. Parella, J. Joglar, P. Clapes, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3808–3816.
- [27] M. Schürmann, M. Schürmann, G. A. Sprenger, *J. Mol. Catal. B* **2002**, *19–20*, 247–252.
- [28] a) S. Sauret-Gueto, E. M. Uros, E. Ibanez, A. Boronat, M. Rodriguez-Concepcion, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 736–740; b) N. Campos, M. Rodriguez-Concepcion, S. Sauret-Gueto, F. Gallego, L.-M. Lois, A. Boronat, *Biochem. J.* **2001**, *353*, 59–67.

Manuscript received: February 2, 2017
Final Article published: April 5, 2017

Résumé

La transcétolase thermostable de *Geobacillus stearothermophilus* (TK_{gst}, EC 2.2.1.1) permet de synthétiser efficacement à haute température des cétooses à 4, 5 et 6 atomes de carbone de configuration *D-thréo* (3*S*, 4*R*), par formation stéréosélective d'une liaison C-C, à partir d'aldéhydes α -hydroxylés (2*R*) à courte chaîne. L'objectif de ces travaux est d'utiliser la TK_{gst} à 60°C pour gagner en efficacité et étendre son spectre de substrats à de nouveaux donneurs et accepteurs par Evolution dirigée, selon une approche semi-rationnelle, basée sur la mutagenèse par saturation de site. Ainsi, à l'issue du criblage des banques générées, les TK_{gst} mutées les plus performantes (L382D/D470S, L191I, L382F/F435Y, R521Y/H462N et R521V/S385D/H462S) ont été sélectionnées pour leurs activités spécifiques supérieures à celle de la TK_{gst} sauvage (gain de 3,3 à 5) vis-à-vis d'aldéhydes α -hydroxylés (2*S*) et d'aldéhydes α -hydroxylés (2*R*) à longue chaîne polyhydroxylée (C5-C6). La TK_{gst} sauvage, ainsi que ces TK_{gst} mutées performantes ont permis d'obtenir, à 60°C, onze cétooses, dont neuf de configuration *L-érythro* (3*S*, 4*S*) à 5 à 6 atomes de carbone et de configuration *D-thréo* (3*S*, 4*R*) de 4 à 8 atomes de carbone d'intérêt biologique, avec de très bons rendements, quatre étant inaccessibles avec les TKs microbiennes utilisées jusqu'alors. D'autres TK_{gst} mutées ont par ailleurs conduit à une amélioration significative de l'activité de la TK_{gst} vis-à-vis d'aldéhydes aliphatiques et aromatiques, mais également vis-à-vis d'un nouveau substrat donneur, l'acide pyruvique et d'analogues, ouvrant le champ des applications aux 1-désoxycétooses. De plus, ces travaux ont permis de développer un procédé multi-enzymatique innovant et éco-comptable, dans lequel les substrats donneurs et accepteurs de la TK_{gst} sont générés par voie enzymatique, *via* l'utilisation d'une transaminase ou d'une *D*-aminoacide oxydase et d'une aldolase, à partir de composés naturels et peu coûteux. Cette stratégie pourra être appliquée aux TK_{gst} mutées, afin d'accéder efficacement et à moindre coût, à d'autres cétooses rares hautement valorisables.

Mots-clés : Biocatalyse, Cétooses rares, Transcétolase, Enzyme thermostable, Evolution dirigée, Mutagenèse par saturation de site, Test de criblage, Transaminase, *D*-Aminoacide oxydase, Aldolase, Cascade enzymatique

Abstract

Thermostable transketolase from *Geobacillus stearothermophilus* (TK_{gst}, EC 2.2.1.1) catalyzes efficiently the synthesis of *D-threo* (3*S*, 4*R*) ketoses having 4, 5 and 6 carbon atoms, by the stereoselective formation of a new C-C bond, from short chain (2*R*)- α -hydroxylated aldehydes. The aim of this work is to use TK_{gst} at 60°C, in order to increase reaction rates and to broad its substrate scope to new donors and acceptors by Directed Evolution, according to a semi-rational approach, based on site saturation mutagenesis. Thus, the screening of the libraries led to TK_{gst} variants (L382D/D470S, L191I, L382F/F435Y, R521Y/H462N and R521V/S385D/H462S) having significantly improved specific activities towards (2*S*)- α -hydroxylated aldehydes and (2*R*)- α -hydroxylated aldehydes having a long polyhydroxylated chain (C5-C6), compared to wild type TK_{gst} (3,3 to 5-fold increased activity). Wild-type TK_{gst} as well as these TK_{gst} variants were used, at 60°C, to obtain eleven, including nine *L-erythro* (3*S*, 4*S*) ketoses having 5 and 6 carbon atoms and *D-threo* (3*S*, 4*R*) ketoses having from 4 to 8 carbon atoms of biological interest, with good yields, four being inaccessible using common TK sources. Besides, other TK_{gst} variants led to significantly improved activities towards hydrophobic aldehydes and towards a new donor substrate, pyruvic acid and derivatives, extending TK_{gst} product scope to 1-deoxyketoses. In addition, a multienzymatic innovative and environmentally friendly process, in which TK_{gst} substrates are generated through enzymatic pathways, using a transaminase or a *D*-aminoacid oxidase and an aldolase, from non-expensive and natural compounds was developed, in the presence of wild-type TK_{gst} and will be able to be applied to TK_{gst} variants, in order to synthesize efficiently and at lower cost, other highly valuable rare ketoses.

Keywords : Biocatalysis, rare Ketoses, Transketolase, Thermostable enzyme, Screening assay, Directed Evolution, Site-saturation mutagenesis, Transaminase, *D*-Aminoacid oxidase, Aldolase, Enzymatic cascade