



**HAL**  
open science

# Recherche de nouvelles transaminases pour la synthèse d'amines chirales

Egon Heuson

► **To cite this version:**

Egon Heuson. Recherche de nouvelles transaminases pour la synthèse d'amines chirales. Chimie organique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2015. Français. NNT : 2015CLF22659 . tel-01912560

**HAL Id: tel-01912560**

**<https://theses.hal.science/tel-01912560v1>**

Submitted on 5 Nov 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.

**UNIVERSITE BLAISE PASCAL**

**U.F.R. Sciences et technologies**

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES**

**THESE**

*Présentée en vue de l'obtention du grade de*

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

*Spécialité : Chimie Organique Biologique*

Soutenue le 17/12/2015

*Par*

**Egon HEUSON**

*TITRE*

**Recherche de nouvelles transaminases pour la  
synthèse d'amines chirales**

*Rapporteurs :*

Pr. SERVI Stefano, Politecnico di Milano

Pr. TELLIER Charles, Université de Nantes

*Examineurs :*

Pr. DELORT Anne-Marie, Université Clermont-Ferrand II

Dr. MOREAU-PEDRAGOSA Sandrine, Société SERVIER

Dr. DE BERARDINIS Véronique, Génoscope CEA

Pr. GEFFLAUT Thierry, Université Clermont-Ferrand II (Directeur de thèse)

Dr. CHARMANTRAY Franck, Université Clermont-Ferrand II



# Remerciements

A l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand  
Qui m'a accueilli pendant 3 ans  
Merci à son soutien et financement  
Sans lequel je ne serais allé de l'avant

A tous les membres de mon jury  
Qui m'honorent de leur présence ici  
Vous qui avez accepté de m'évaluer  
Je tenais sincèrement à vous remercier

A tous mes partenaires d'ici et d'ailleurs  
A vous tous mes collaborateurs  
Au Génoscope et à ses occupants  
Recevez mes plus humbles remerciements

A toutes les personnes de mon laboratoire  
Que j'ai croisées parfois si tôt, parfois si tard  
Vous qui avez toujours su m'éclairer  
Sur les innombrables questions que je me posais  
Une grande partie de ceci  
Est le fruit de votre sympathie

A mes étudiants et mes stagiaires  
Qui avez tant éprouvé mes nerfs  
Ce fut pour moi un véritable honneur  
Que de partager avec vous ce labeur  
A Axel, Thomas, Charlotte, à chacun  
Ce travail est autant vôtre que mien

A vous mes proches et mes amis,  
Qui m'avez toujours soutenu jusqu'ici  
Gaetano, Marie-Laurence et Scooby  
Florent, Riikka, Yvonne et Sidi



Gwen, Max, Camille et Marina  
Mathieu, Schkoun, Nadine et Ghina,  
Ruhi, Jean-Baptiste, Geoffrey et Thomas  
Stéphanie, Saumya, David et Fiona  
Nolwenn, Bobbette, Virgile et Christine  
Bobby, Borris, Shyam, et Clémentine  
Felipe, Audrey, Romain, et Magalie  
J'avoue que sans vous, je n'aurais jamais tant rit

A mes extraordinaires encadrants  
Qui avez toujours su être exigeants  
A vous deux Franck et Thierry  
Je ne pourrai jamais assez vous dire merci  
Vous qui m'avez tant apporté  
Soyez sûr que vous me manquerez  
Et si c'était à refaire, ce serait sans hésiter  
Des deux mains, à nouveau, que je signerais

A ma famille, mon frère et à mes parents  
Je vous aime très fort et tendrement  
Merci d'avoir toujours été à mes côtés  
Partout où j'ai bien pu aller me fourrer

A Claire, l'amour de ma vie  
Sans qui je ne serais pas ici  
Mon unique, qui me calme et m'apaise  
C'est à toi que je dédie cette thèse

Enfin à vous très cher lecteur,  
Qui de lire ce texte n'avez point peur  
Merci du temps que vous m'accorderez  
J'espère que vous apprécierez





# Table des Matières

## Bibliographie

<b>1 Principales voies d'accès aux amines chirales</b> .....	<b>33</b>
<b>1.1 Synthèses par voie chimique</b> .....	<b>34</b>
1.1.1 A partir d'imines et dérivés.....	35
1.1.1.1 Exemples de réactions de formation de liaisons C-C par catalyse asymétrique .....	36
1.1.1.2 Exemples de réactions d'hydrogénation.....	37
1.1.2 Réactions de C-H amination.....	40
1.1.3 Réactions d'hydroaminations .....	41
<b>1.2 Synthèses d'amines chirales par voie biocatalytique</b> .....	<b>43</b>
1.2.1 Exemples de dédoublements cinétiques dynamiques et de déracémisations .....	44
1.2.2 Exemples de désymétrisations .....	47
<b>2 Les transaminases</b> .....	<b>49</b>
<b>2.1 Généralités</b> .....	<b>49</b>
<b>2.2 Classification des transaminases</b> .....	<b>52</b>
2.2.1 Réactions catalysées par les enzymes à pyridoxal phosphate .....	52
2.2.2 Classification générale des TA selon la spécificité de substrat .....	55
2.2.3 Classification structurale des TA .....	57
2.2.3.1 La classification selon Mehta.....	58
2.2.3.2 La classification selon Grishin .....	60
<b>2.3 Spectre de substrats des transaminases</b> .....	<b>67</b>
2.3.1 Spectre de substrats des $\alpha$ -TA .....	67
2.3.2 Spectre de substrats des amine-TA .....	70
<b>2.4 Limites des transaminases</b> .....	<b>73</b>
2.4.1 Problèmes d'inhibition.....	73
2.4.2 Réversibilité de la transamination.....	74
<b>2.5 Stratégies de déplacement d'équilibre des réactions de transamination</b> .....	<b>76</b>
2.5.1 Utilisation d'un excès de substrat donneur ou élimination d'un produit .....	76
2.5.2 Transformation du co-produit carbonyle .....	79
2.5.2.1 Transformation spontanée d'un co-produit instable .....	79
2.5.2.2 Mise en place de cascades enzymatiques .....	83
2.5.2.2.1 Exemples de cascades orthogonales .....	84
2.5.2.2.2 Exemples de cascades parallèles .....	88
<b>2.6 Tests de criblage pour la recherche de nouvelles transaminases</b> .....	<b>91</b>
2.6.1 Détection du co-produit carbonyle .....	91
2.6.1.1 Détection directe du co-produit carbonyle.....	92
2.6.1.2 Détection du co-produit carbonyle avec un réactif spécifique.....	93
2.6.1.3 Utilisation de cascades enzymatiques.....	94
2.6.1.3.1 Réduction du co-produit carbonyle.....	94
2.6.1.3.2 Oxydation enzymatique du co-produit carbonyle.....	96
2.6.1.3.3 Détection du co-produit carbonyle via d'autres réactions enzymatiques.....	98
2.6.1.4 Tests basés sur la détection du produit aminé.....	99
2.6.1.5 Autres tests .....	102

## Résultats et discussions

<b>1 Mise au point des tests enzymatiques</b> .....	<b>108</b>
<b>1.1 Tests basés sur la détection d'ions sulfites avec le DTNB</b> .....	<b>108</b>
1.1.1 Tests d'activité pour les $\alpha$ -TA.....	110
1.1.1.1 Études préliminaires à l'utilisation du DTNB .....	111
1.1.1.2 Réactions de transamination modèles.....	113
1.1.1.2.1 Modélisation du test direct avec l'AspTA.....	114

1.1.1.2.2	Modélisation du test couplé avec la BCAT et l'AspTA.....	117
1.1.2	Tests d'activité pour les amine-TA.....	121
1.1.2.1	Tests direct pour les amine-TA.....	123
1.1.2.2	Test couplé pour les amine-TA utilisant l'Hypotaurine .....	125
1.1.2.3	Test couplé pour les amine-TA utilisant l'ACS.....	129
1.1.2.3.1	Choix d'une réaction modèle .....	131
1.1.2.3.2	Origine du bruit de fond .....	131
1.1.2.3.3	Optimisation du test couplé utilisant l'ACS .....	134
1.1.2.4	Test couplé pour les amine-TA utilisant l'HPT et la butylamine comme donneur primaire 139	
<b>1.2</b>	<b>Tests à la résazurine pour étudier le spectre de substrats donneur des <math>\alpha</math>-TA.....</b>	<b>140</b>
<b>2</b>	<b>Synthèse des substrats pour le criblage .....</b>	<b>144</b>
<b>2.1</b>	<b>Synthèse des substrats donneurs.....</b>	<b>144</b>
2.1.1	Synthèse de l'ACS .....	144
2.1.2	Synthèse de l'hypotaurine .....	146
2.1.3	Synthèse des L- et D-méthylhypotaurine .....	146
<b>2.2</b>	<b>Choix et synthèse des Substrats accepteurs .....</b>	<b>148</b>
2.2.1	Synthèse de l'acide 2-oxo-4-phénylbutanoïque : OPBA .....	153
2.2.1.1	Utilisation d'un organomagnésien.....	153
2.2.1.2	Synthèse de l'OPBA via l'ozonolyse d'un acétate d'énol.....	154
2.2.2	Synthèse des cétoacides $\beta$ -hydroxylés : HOBA, HMOP et HOPP .....	155
2.2.3	Synthèse des cétoacides $\gamma$ -hydroxylés : HOP et HOPB .....	157
2.2.4	Synthèse de la 1-hydroxy-3-phénylpropan-2-one (HPPO).....	159
2.2.5	3.2.2.5 Synthèse de l'acide 3,3-diméthyl-2-oxopentanedioïque (DMOP) .....	160
2.2.6	Synthèse de l'acide 2-(carboxycarbonyl)-4-oxoazétidine-3-carboxylique (COC)...	163
2.2.6.1	Synthèse des pyridones (21-25).....	166
2.2.6.2	Réarrangement électrocyclique des pyridones et ozonolyse .....	169
2.2.6.3	Déprotection des intermédiaires 28 et 29 .....	170
<b>3</b>	<b>Création des collections de transaminases .....</b>	<b>173</b>
<b>3.1</b>	<b>Construction de la première collection : TAM(A).....</b>	<b>176</b>
3.1.1	Élaboration du set de référence .....	176
3.1.2	Sélection des enzymes de la banque TAM(A).....	179
3.1.3	Clonage et surexpression des enzymes de la banque TAM(A) .....	185
<b>3.2</b>	<b>Construction de la banque TAM(C).....</b>	<b>186</b>
3.2.1	Création du set de référence pour TAM(C) .....	186
3.2.2	Sélection des enzymes de la banque TAM(C) .....	187
<b>3.3</b>	<b>Construction de la banque TAM(D) .....</b>	<b>190</b>
3.3.1	Élaboration du set de référence de TAM(D) .....	190
3.3.2	Sélection des candidats dans UniProt et clustering.....	190
<b>4</b>	<b>Traitements statistiques et informatiques des résultats .....</b>	<b>192</b>
<b>4.1</b>	<b>Détermination du seuil de sélection (SDS) .....</b>	<b>192</b>
<b>4.2</b>	<b>Détermination d'un seuil de validation complémentaire (SDV).....</b>	<b>195</b>
<b>5</b>	<b>Criblage des banques de Transaminases .....</b>	<b>196</b>
<b>5.1</b>	<b>Criblage de TAM(A) à la recherche de nouvelles <math>\alpha</math>-TA .....</b>	<b>196</b>
5.1.1	Mesure de l'activité sans cétoacide accepteur ( $A_0$ ).....	198
5.1.2	Criblage de TAM(A) avec le KG.....	199
5.1.3	Criblage de TAM(A) avec les accepteurs du groupe 2.....	202
5.1.3.1	Criblages en série L.....	202
5.1.3.2	Criblages en série D.....	207
5.1.4	Criblage de TAM(A) avec les accepteurs du groupe 3.....	209
5.1.4.1	Criblage en série L.....	209
5.1.4.2	Criblage en série D.....	211
5.1.5	Criblage de TAM(A) avec les accepteurs du groupe 4.....	212

5.1.5.1	Criblage en série L .....	212
5.1.5.2	Criblage en série D .....	214
5.1.6	Criblage de TAM(A) avec les accepteurs hydroxylés du groupe 5 .....	215
5.1.6.1	Criblage avec les cétoacides $\beta$ -hydroxylés .....	215
5.1.6.2	Criblage avec les cétoacides $\gamma$ -hydroxylés .....	216
5.1.7	Criblages avec le KDG et le DMOP (Groupe 6) .....	221
<b>5.2</b>	<b>Criblage de TAM(C) à la recherche de nouvelles D-<math>\alpha</math>-TA .....</b>	<b>221</b>
5.2.1	Détermination des seuils de validation (SDV) .....	222
5.2.2	Résultats du criblage .....	224
<b>5.3</b>	<b>Criblage de TAM(D) à la recherche d'Hypotaurine-transaminases (HypoTA) .....</b>	<b>227</b>
<b>6</b>	<b>Caractérisation des hits et premières applications .....</b>	<b>232</b>
<b>6.1</b>	<b>Etude du spectre de substrats des hits .....</b>	<b>234</b>
6.1.1	Confirmation des activités vis-à-vis des substrats accepteurs .....	234
6.1.2	Activités vis-à-vis des aminoacides canoniques .....	238
<b>6.2</b>	<b>Etude de la PyrASTA A4A10 pour la mise au point du test couplé pour les amine- TA .....</b>	<b>239</b>
<b>6.3</b>	<b>Etude de l'activité désulfinase de la D-<math>\alpha</math>-TA A3B9 .....</b>	<b>241</b>
<b>6.4</b>	<b>Synthèse d'acides <math>\gamma</math>-hydroxylés avec les TA A3D9 et A3B9 .....</b>	<b>246</b>
<b>6.5</b>	<b>Application des SerTA dans des cascades Transaminase-Transcétolase (TA-TK) .....</b>	<b>248</b>
<b>6.6</b>	<b>Synthèse de l'Homophénylalanine avec les TA A4A10, A3D9 et A3B9 .....</b>	<b>253</b>
6.6.1	Synthèse de la L-HPhe avec la TA A4A10 .....	253
6.6.2	Synthèse de la L-HPhe avec la TA A3D9 .....	256
6.6.2.1	Déplacement des équilibres de transamination avec la glutamine .....	256
6.6.2.2	Synthèse de la L-HPhe avec la glutamine et la TA A3D9 .....	260
6.6.3	Synthèse de la D-HPhe avec la glutamine et la TA A3B9 .....	261
6.6.4	Détermination des excès énantiomériques des L- et D-HPhe .....	262

## Partie Expérimentale

<b>1</b>	<b>Généralités .....</b>	<b>273</b>
1.1	Réactifs .....	273
1.2	Réactions .....	273
1.3	Purifications .....	273
1.4	Analyses .....	273
<b>2</b>	<b>Synthèse chimique .....</b>	<b>274</b>
<b>2.1</b>	<b>Synthèse des donneurs .....</b>	<b>274</b>
2.1.1	Synthèse de l'acide cystéine sulfinique .....	274
2.1.2	Synthèse de l'HPT .....	275
2.1.3	Synthèse de la MHPT .....	276
2.1.3.1	Synthèse du composé 3 .....	276
2.1.3.2	Synthèse du composé 4 .....	277
2.1.3.3	Synthèse du composé 5 .....	277
2.1.3.4	Synthèse du composé 6 .....	278
2.1.3.5	Synthèse du composé 7 .....	279
2.1.3.6	Synthèse de la MHPT .....	280
<b>2.2</b>	<b>Synthèse des accepteurs .....</b>	<b>281</b>
2.2.1	Synthèse de l'acide 2-oxo-4-phénylbutanoïque .....	281
2.2.1.1	Synthèse du composé 9 .....	281
2.2.1.2	Synthèse du composé 10 .....	281
2.2.1.3	Synthèse du composé 11 .....	282
2.2.1.4	Synthèse de l'OPBA .....	282
2.2.2	Synthèse des composés $\beta$ -hydrolylés .....	283

2.2.2.1	Synthèse des composés 12a, 12b et 12c .....	283
2.2.2.2	Synthèse des composés 13c et 13b .....	284
2.2.2.3	Synthèse des composés 14a, 14b et 14c .....	285
2.2.2.4	Synthèse du HOBA, HMOP et HOPP.....	286
2.2.3	Synthèse des composés $\gamma$ -hydroxylés .....	288
2.2.4	Synthèse de la 1-hydroxy-3-phénylpropan-2-one .....	289
2.2.4.1	Synthèse du composé 15.....	289
2.2.4.2	Synthèse du composé 16.....	290
2.2.4.3	Synthèse du HPPO.....	290
2.2.5	Synthèse de l'acide 3,3-diméthyl-2-oxopentanoïque .....	291
2.2.5.1	Synthèse du composé 17 .....	291
2.2.5.2	Synthèse du composé 18.....	291
2.2.5.3	Synthèse du composé 19.....	292
2.2.5.4	Synthèse du composé 20.....	292
2.2.5.5	Synthèse du DMOP.....	293
2.2.6	Synthèse de l'acide 2-(carboxycarbonyl)-4-oxoazetidine-3-carboxylique .....	294
2.2.6.1	Synthèse du composé 21.....	294
2.2.6.2	Synthèse du composé 22.....	294
2.2.6.3	Synthèse du composé 23.....	295
2.2.6.4	Synthèse du composé 24.....	296
2.2.6.5	Synthèse du composé 25.....	296
2.2.6.6	Synthèse du composé 26.....	297
2.2.6.7	Synthèse du composé 27.....	297
2.2.6.8	Synthèse du composé 28.....	298
2.2.6.9	Synthèse du composé 29.....	298
2.2.6.10	Synthèse du COC.....	299
<b>3</b>	<b>Synthèses enzymatiques.....</b>	<b>300</b>
<b>3.1</b>	<b>Activité de la A3D9 pour le couple L-Gln/Pyr.....</b>	<b>300</b>
<b>3.2</b>	<b>Synthèse du 2OG.....</b>	<b>300</b>
<b>3.3</b>	<b>Synthèse de la L-homophénylalanine .....</b>	<b>301</b>
3.3.1	Avec A4A10.....	301
3.3.1.1	Synthèse avec un excès d'aspartate .....	301
3.3.1.2	Synthèse avec un excès de glutamate.....	302
3.3.1.3	Synthèse avec régénération du glutamate .....	302
3.3.2	Avec A3D9 et la L-glutamine.....	303
<b>3.4</b>	<b>Synthèse de la D-homophénylalanine.....</b>	<b>304</b>
<b>3.5</b>	<b>Synthèse du L-érythrose .....</b>	<b>305</b>
3.5.1	Avec le pyruvate .....	305
3.5.2	Avec le glyoxylate.....	305
<b>4</b>	<b>Création des banques.....</b>	<b>306</b>
<b>5</b>	<b>Tests enzymatiques et enzymologie .....</b>	<b>307</b>
<b>5.1</b>	<b>Tests enzymatiques.....</b>	<b>307</b>
5.1.1	Conditions générales .....	307
5.1.1.1	Tests au NADH.....	307
5.1.1.1.1	Test à la LDH.....	307
5.1.1.1.2	Test à la GluDH.....	307
5.1.1.1.3	Test à la MDH.....	308
5.1.1.2	Tests au DTNB .....	308
5.1.1.2.1	Test direct à l'ACS.....	308
5.1.1.2.2	Test couplé à l'ACS.....	308
5.1.1.2.3	Test direct à l'HPT .....	308
5.1.1.2.4	Test couplé à l'HPT.....	309
5.1.1.2.5	Test à amplification.....	309
5.1.1.3	Test à la résazurine.....	309
5.1.1.4	Test au WST-1 .....	309

5.1.2	Conditions spécifiques des tests .....	310
<b>5.2</b>	<b>Enzymologie.....</b>	<b>313</b>
5.2.1	Enzymes commerciales .....	313
5.2.2	Transaminases .....	314
5.2.2.1	Surexpression .....	314
5.2.2.2	Purification.....	315
5.2.2.2.1	AspTA (P00509).....	315
5.2.2.2.2	Autres enzymes .....	315
5.2.3	Dosages de protéines par la méthode de Bradford.....	316
<b>5.3</b>	<b>Autres analyses biochimiques.....</b>	<b>316</b>
5.3.1	Passage sous forme PMP de A4A10.....	316
5.3.2	Etude de la thermoactivité des enzymes.....	316
5.3.2.1	Thermoactivité de A4A10.....	316
5.3.2.2	Thermoactivité de A4C2.....	317
5.3.3	Etude de la thermostabilité des enzymes .....	317
5.3.4	Dosage de l'activité des Hits pour les cétoacides $\gamma$ -hydroxylés.....	317
5.3.5	Micro-synthèses avec les cétoacides $\gamma$ -hydroxylés.....	318
5.3.6	Analyse de la désulfination par RMN.....	318
<b>6</b>	<b>Criblages des banques de transaminases .....</b>	<b>318</b>
<b>6.1</b>	<b>Plaque mère de lysats.....</b>	<b>319</b>
<b>6.2</b>	<b>Préparation des Mix.....</b>	<b>319</b>
6.2.1	Mix pour le test direct au L-ACS .....	319
6.2.2	Mix pour le test direct au D-ACS.....	319
6.2.3	Mix pour le test couplé à l'ACS.....	320
6.2.4	Mix pour le test direct à l'HPT.....	320
<b>6.3</b>	<b>Mélange des différents composants et lecture .....</b>	<b>320</b>



# Table des Figures

Figure 1 : Les deux énantiomères du thalidomide.....	27
Figure 2 : Exemples d'amines chirales utilisées en thérapeutique. ....	28
Figure 3 : Principales voies de synthèse asymétrique d'amines chirales.....	34
Figure 4 : Principales classes d'enzymes permettant d'accéder à des amines énantiopures. ....	44
Figure 5 : Schéma général d'un dédoublement cinétique dynamique.....	45
Figure 6 : Représentation de King-Altman du mécanisme ping-pong des transaminases.....	51
Figure 7 : Différentes activités enzymatiques de la famille des EAPP, classées par numéros EC. <sup>67</sup> .....	53
Figure 8 : Intermédiaire aldimine formé entre le PLP et l'alanine, montrant l'alignement du système $\pi$ avec la liaison C-H rompue. <sup>7,82,89</sup> .....	55
Figure 9 : Présentation des FT_I-V des EAPP (respectivement (a)-(e)). Les triangles représentent les feuilletés $\beta$ et les ronds les hélices $\alpha$ . Le PLP, lié au résidu lysine est représenté en rouge. <sup>98</sup> .....	61
Figure 10 : Différents intermédiaires aldimines externes formés avec les TA de FT_I et IV. ....	62
Figure 11 : Représentation générale du site actif des TA de Fold-Type I.....	63
Figure 12 : Rôle d'un résidu Arg dans liaison du GaBa et du Glu par la GaBaTA. <sup>100</sup> .....	64
Figure 13 : Structures de site actif des TA. (A) Classes 1,2 et 5 (B) Classe III. (C) Classe IV, BCTA (D) Classe IV, D-TA. <sup>101</sup> .....	65
Figure 14 : Principaux substrats naturels des amine-TA. ....	70
Figure 15 : Relation entre la valeur de $K_{eq}$ et l'excès de donneur requis pour atteindre 90 % de conversion. <sup>158</sup> .....	77
Figure 16 : Amines préparées en utilisant l'Ala, la LDH et un système de régénération du NADH. .....	85
Figure 17 : Réactifs utilisés pour la révélation spécifique des co-produits carbonylés.....	94
Figure 18 : Schéma général du projet.....	107
Figure 19 : Structures de l'hypotaourine (HPT) et de la méthylhypotaourine (MHPT).....	122
Figure 20 : Principe du test couplé des amine-TA utilisant l'ACS. ....	130
Figure 21 : DO mesurées à 412 nm avec le test couplé utilisant l'ACS et des quantités de Q7NWG4 de 0,01 à 4,1 mUI/puits (courbes A à K).....	136
Figure 22 : DO mesurées à 340 nm avec le test LDH/NADH et des quantités de Q7NWG4 de 0,01 à 4,1 mUI/puits (courbes A à K).....	137
Figure 23 : Structure de principes actifs intégrant l'HPhe, la tert-Leu ou la phénylglycine. ....	152
Figure 24 : Suivi par RMN <sup>1</sup> H de la déprotection du produit <b>29</b> en présence de résine acide....	172
Figure 25 : Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO-D <sub>6</sub> ) obtenu pour l'hydrolyse du cétoester <b>29</b> en présence d'HCl à 0,5 M après 22 h. ....	173
Figure 26 : Démarche générale d'exploration génomique pour la recherche de nouvelles TA...	175
Figure 27 : Arbre d'identité de TAM(A).....	184
Figure 28 : Gel de vérification de la surexpression des TA de TAM(A).....	185
Figure 29 : Arbre d'identité de TAM(C).....	189
Figure 30 : Arbre d'identité de TAM(D).....	191
Figure 31 : Représentation selon une loi normale d'une série de mesures d'activité témoins...	193
Figure 32 : Point de vue statistique du seuil de sélection (SDS). ....	194
Figure 33 : Point de vue statistique pour le seuil de validation (SDV). ....	195
Figure 34 : Répartition au sein de TAM(A) des hits obtenus avec le couple KG/L-ACS (en orange) et le couple KG/D-ACS (en vert). Tous les histogrammes sont à la même échelle. La barre la plus importante (L-ACS, AspTA) représente 13 hits.....	202
Figure 35 : Répartition au sein de TAM(A) des hits obtenus avec les différents cétoacides du groupe 2 avec les tests direct (plus près du centre) et couplé (vers l'extérieur). Tous les histogrammes sont à la même échelle. La barre la plus importante (MOPA, BCAT) représente 68 hits. ....	205

Figure 36 : Répartition au sein de TAM(A) des hits obtenus avec les différents cétoacides du groupe 2 en utilisant le D-ACS dans le test direct. Tous les histogrammes sont à la même échelle. La barre la plus importante (Glyox, D-AlaTA) représente 14 hits. ....	208
Figure 37 : Cétoacides du groupe 3. ....	209
Figure 38 : Répartition au sein de TAM(A) des hits obtenus avec les cétoacides du groupe 3 en utilisant le L-ACS dans les tests direct (plus près du centre) et couplé (à l'extérieur). Tous les histogrammes sont à la même échelle. La barre la plus importante (AOP, BCAT) représente 80 hits. ....	211
Figure 39 : Cétoacides aromatiques constituant le groupe 4. ....	212
Figure 40 : Cétoacides hydroxylés constituant le groupe 5. ....	215
Figure 41 : Répartition au sein de TAM(A) des hits obtenus avec les cétoacides du groupe 5 en utilisant l'ACS dans les tests directs (plus près du centre) et couplé (à l'extérieur). Tous les histogrammes sont à la même échelle. La barre la plus importante (HMOP, BCAT) représente 61 hits. ....	220
Figure 42 : Cétoacides constituant le groupe 6. ....	221
Figure 43 : Répartition au sein de TAM(C) des hits obtenus en utilisant le D-Glu et le L-ACS dans le test couplé. Tous les histogrammes sont à la même échelle. La barre la plus importante (Pyr, D- $\alpha$ -TA) représente 81 hits. ....	225
Figure 44 : Répartition au sein de TAM(D) des hits obtenus en utilisant l'HPT dans le test direct. Tous les histogrammes sont à la même échelle. La barre la plus importante (Pyr, Diverses) représente 25 hits. ....	231
Figure 45 : Suivi RMN <sup>1</sup> H de la conversion du D-CSA en Ala catalysée par la TA A3B9 après 0 (1), 1 (2), 2 (3), 7 (4) et 8 h (5) de réaction. (ACS : $\delta$ 2,80 (2H, m), $\delta$ 4,19 (1H, dd) ; Ala : $\delta$ 1,56 (3H, d), $\delta$ 3,83 (1H, q)). ....	242
Figure 46 : Suivi RMN <sup>1</sup> H de la conversion du L-CSA en Ala catalysée par la TA A3B9 après 0 (1), 1 (2), 2 (3), 7 (4) et 8 h (5) de réaction. (ACS : $\delta$ 2,80 (2H, m), $\delta$ 4,19 (1H, dd) ; Ala : $\delta$ 1,56 (3H, d), $\delta$ 3,83 (1H, q)). ....	242
Figure 47 : Spectre RMN <sup>13</sup> C du 2-oxoglutaramate (2OG). ....	258
Figure 48 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du 2-oxoglutaramate (2OG). ....	259
Figure 49 : Spectre RMN <sup>13</sup> C de la L-homophénylalanine. ....	261
Figure 50 : Spectre RMN <sup>1</sup> H de la L-homophénylalanine. ....	261
Figure 51 : Spectre RMN <sup>1</sup> H de la D-homophénylalanine. ....	262
Figure 52 : Chromatogrammes obtenus pour le mélange racémique (à gauche), la L-HPhe (au centre) et la D-HPhe (à droite). ....	262

## Table des Schémas

Schéma 1 : Procédé biocatalytique pour la synthèse de la sitagliptine.....	29
Schéma 2 : Schéma général pour la synthèse d'amines chirales à partir d'imines et dérivés.....	35
Schéma 3 : Utilisation d'un auxiliaire chiral de type sulfinyle.....	35
Schéma 4 : Réaction de Strecker avec un catalyseur de transfert de phase asymétrique.....	36
Schéma 5 : Exemple de réaction de Mannich catalysé par un acide phosphorique chiral.....	36
Schéma 6 : Addition d'organozinciques sur des phosphinoyl-imines catalysée par Me-DuPHOS monoxide-Cu(I).....	37
Schéma 7 : Addition d'aryl-boroxines catalysée par un catalyseur chiral à base de Rh.....	37
Schéma 8 : Hydrogénation d'un énamide précurseur de la L-Dopa avec un complexe Rh-DiPAMP. .....	38
Schéma 9 : Exemples d'hydrogénation énantiosélective d'énamides.....	38
Schéma 10 : Procédé de synthèse du métolachlor par hydrogénation d'imine.....	39
Schéma 11 : Hydrogénation d'imines par des catalyseurs chiraux à base d'Iridium.....	39
Schéma 12 : Exemples de procédés d'amination réductrice.....	40
Schéma 13 : Exemple de procédé d'amination réductrice organocatalysée.....	40
Schéma 14 : Schéma général d'une réaction de C-H amination avec un réactif de type métal- nitride.....	41
Schéma 15 : Exemple de catalyse asymétrique de la réaction de C-H amination.....	41
Schéma 16 : Exemples de catalyse asymétrique de la réaction d'aza-Michael.....	42
Schéma 17 : Exemple d'hydroamination d'alcènes non activés.....	42
Schéma 18 : Dédoublent cinétique dynamique d'amines chirales associant une lipase et un catalyseur organométallique.....	45
Schéma 19 : Dédoublent cinétiques dynamiques d'hydantoines utilisant une hydantoine- racémase.....	46
Schéma 20 : Déracémisation de la Leucine combinant une L-aminoacide oxydase et BH <sub>3</sub> -NH <sub>3</sub> ....	46
Schéma 21 : Principe des déracémisations multienzymatiques d'aminoacides combinant une D- AAO avec une L-aaDH ou un L- $\alpha$ -TA.....	47
Schéma 22 : Exemple de désymétrisation utilisant une amine oxydase.....	47
Schéma 23 : Exemple d'amination réductrice catalysées par une L-aaDH.....	48
Schéma 24 : Exemple d'amination réductrice catalysées par une amineDH.....	49
Schéma 25 : Réaction de transamination.....	50
Schéma 26 : Mécanisme réactionnel de la transamination enzymatique.....	50
Schéma 27 : Ensemble des réactions catalysées par les EAPP. <sup>7</sup> .....	53
Schéma 28 : Principaux types d'inhibition par les substrats/produits de la réaction de transamination.....	74
Schéma 29 : Synthèse de la sitagliptine utilisant l'isopropylamine comme donneur d'amine.....	78
Schéma 30 : Exemple de synthèse de L-aminoacides en utilisant l'Asp comme donneur. <sup>164</sup> .....	79
Schéma 31 : Synthèse d'analogues du Glu avec l'AspTA d' <i>E. coli</i> et l'ACS comme donneur.....	80
Schéma 32 : Synthèse de la L-HPhe avec une AspTA modifiée et la Lys comme donneur.....	80
Schéma 33 : Utilisation de l'Orn ou de la Lys comme donneur avec une $\omega$ -TA.....	81
Schéma 34 : Exemple de synthèse d'une amine chirale avec l'ATA-113 (codexis) et la PDMA.....	81
Schéma 35 : Utilisation d'un aminocyclohexadiène comme donneur irréversible.....	82
Schéma 36 : Exemple de déplacement d'équilibre par lactamisation du produit aminé.....	82
Schéma 37 : Déplacement d'équilibre par cyclisation de produits de type $\delta$ -aminocétones.....	83
Schéma 38 : Cascades enzymatiques pour le déplacement d'équilibre des transaminations.....	83
Schéma 39 : Utilisation de la LDH pour déplacer l'équilibre d'une transamination.....	84
Schéma 40 : Utilisation de la FDH ou GDH pour régénérer le NADH.....	85
Schéma 41 : Déplacement d'équilibre avec la pyruvate décarboxylase (PDC).....	86
Schéma 42 : Procédés multienzymatiques de synthèse de l'Hala utilisant L'ALS.....	86
Schéma 43 : Couplage d'une carboligase et d'amine-TA pour la préparation d'aminoalcools.....	87
Schéma 44 : Exemple de couplage d'une amine-TA et d'une $\alpha$ -TA.....	87

Schéma 45 : Exemple de couplage entre une AroTA et une phénylpyruvate-décarboxylase (PPDC).....	88
Schéma 46 : Synthèse d'analogues du Glu en couplant la BCAT et l'ASpTA d' <i>E. coli</i> .....	89
Schéma 47 : Synthèse de la L- <i>tert</i> -leucine en couplant la BCAT (ou TyrTA) d' <i>E. coli</i> avec une OrnTA.....	89
Schéma 48 : Régénération des donneurs d'amine en utilisant des aaDH.....	90
Schéma 49 : Synthèse de diamines à partir de diols via une cascade trienzymatique.....	90
Schéma 50 : Test de criblage basé sur la production d'un énolate conjugué.....	92
Schéma 51 : Détection par fluorimétrie d'une acétonaphtone.....	93
Schéma 52 : Détection en continu de l'activité enzymatique d'une TA à l'aide d'une déshydrogénase.....	94
Schéma 53 : Test pH-métrique utilisant une DH et la GDH.....	96
Schéma 54 : Test continu pour les GaBaTA utilisant la succinate-semialdéhydeDH (SSDH).....	97
Schéma 55 : Tests colorimétriques ou fluorimétriques mettant en jeu la régénération du NAD <sup>+</sup> .....	98
Schéma 56 : Test pour les L- $\alpha$ -TA en jeu la régénération de NADP <sup>+</sup> et la production de formazan.....	98
Schéma 57 : Test pour l' Asp-TA utilisant la citrate synthase (CS) et le DTNB.....	99
Schéma 58 : Test colorimétrique pour les TA utilisant la PyrOx et l'HRP.....	99
Schéma 59 : Test pour les amine-TA utilisant le CuSO <sub>4</sub> .....	100
Schéma 60 : Test pour les $\alpha$ -TA utilisant la GluOx, l'HRP et l'Amplex Red.....	101
Schéma 61 : Test pour les amine-TA utilisant la glycine oxydase (GlyOx).....	101
Schéma 62 : Test pour les $\alpha$ -TA utilisant la GluDH et la diaphorase.....	102
Schéma 63 : Test au TTC pour les amine-TA permettant de détecter les $\beta$ -hydroxycétones.....	102
Schéma 64 : Test conductimétrique pour les amine-TA.....	103
Schéma 65 : Utilisation de l'ACS comme donneur pour les réactions de transamination.....	108
Schéma 66 : Réaction du DTNB avec les ions sulfites.....	109
Schéma 67 : Test direct permettant la mesure de l'activité des $\beta$ ASTA.....	109
Schéma 68 : Complémentarité des tests direct et couplé applicables à toutes les classes de TA.....	110
Schéma 69 : Tests développés pour la mesure de l'activité des $\alpha$ -TA.....	110
Schéma 70 : Réaction modèle pour le test direct des $\alpha$ -TA.....	114
Schéma 71 : Test d'activité de l'AspTA basé sur l'utilisation de la LDH et du NADH.....	116
Schéma 72 : Réaction modèle pour le test couplé des $\alpha$ -TA.....	118
Schéma 73 : Test d'activité de la BCAT basé sur l'utilisation de la GluDH et du NADH.....	120
Schéma 74 : Tests direct (a) et couplés (b) permettant l'étude des amine-TA.....	122
Schéma 75 : Réaction modèle pour le test direct des amine-TA avec l'enzyme Q9A3Q9.....	124
Schéma 76 : Réaction modèle pour le test couplé des amine-TA utilisant l'HPT.....	128
Schéma 77 : Principe du test couplé des amine-TA utilisant l'ACS.....	129
Schéma 78 : Réaction modèle pour le test couplé des amine-TA, utilisant l'ACS.....	131
Schéma 79 : Hypothèse expliquant le bruit de fond observé en absence d'accepteur.....	132
Schéma 80 : Préparation de la TA A4A10 sous forme E-PMP.....	133
Schéma 81 : Principe d'un test couplé utilisant la butylamine comme donneur d'amine.....	139
Schéma 82 : Dosage du Glu avec la GluDH, la diaphorase et la résazurine.....	140
Schéma 83 : Test pour l'étude du spectre de substrats donneurs des L- $\alpha$ -TA.....	141
Schéma 84 : Première réaction modèle pour le test à la résazurine.....	141
Schéma 85 : Seconde réaction modèle pour le test à la résazurine.....	143
Schéma 86 : Synthèse du L- ou D-ACS à partir de la L- ou D-cystine.....	144
Schéma 87 : Mécanisme de dismutation du disulfoxyde <b>1</b> .....	145
Schéma 88 : Synthèse de l'hypotaurine à partir de la cystamine.....	146
Schéma 89 : Rétrosynthèse envisagée pour la méthylhypotaurine.....	147
Schéma 90 : Synthèse des L- et D-Méthylhypotaurine.....	148
Schéma 91 : Synthèse de l'OPBA via un organomagnésien.....	153
Schéma 92 : Synthèse de l'OPBA via l'ozonolyse d'un acétate d'énol.....	154
Schéma 93 : Rétrosynthèse envisagée pour les $\alpha$ -céto- $\beta$ -hydroxyacides.....	155

Schéma 94 : Isomérisation du composé <b>12c</b> .....	156
Schéma 95 : Synthèse des $\alpha$ -céto- $\beta$ -hydroxyacides, HOBA, HMOP et HOPP.....	157
Schéma 96 : Approche générale décrite pour la synthèse des cétoacides $\gamma$ -hydroxylés.....	157
Schéma 97 : Synthèse des cétoacides $\gamma$ -hydroxylés.....	158
Schéma 98 : Tentative de synthèse du HOP via la lactone correspondante.....	158
Schéma 99 : Rétrosynthèse envisagée pour l'HPPO.....	159
Schéma 100 : Synthèse de la diazocétone.....	159
Schéma 101 : Synthèse de l'HPPO.....	160
Schéma 102 : Rétrosynthèse envisagée pour le DMOP.....	160
Schéma 103 : Synthèse de l'intermédiaire <b>17</b> .....	161
Schéma 104 : Mécanisme du réarrangement de Claisen-Johnson et de la formation d'un impureté.....	162
Schéma 105 : Synthèse du DMOP.....	163
Schéma 106 : Structure d'analogues contraints du Glu.....	164
Schéma 107 : Rétrosynthèse proposée pour le COC.....	164
Schéma 108 : Synthèse d'un analogue N-méthylé du COC.....	165
Schéma 109 : Synthèse envisagée pour le COC, via les intermédiaires <b>22</b> et <b>23</b> .....	166
Schéma 110 : Synthèse de la pyridone <b>21</b> .....	166
Schéma 111 : Synthèse de la pyridone <b>22</b> .....	167
Schéma 112 : Méthode envisagée pour les synthèses des pyridones <b>24</b> et <b>25</b> .....	168
Schéma 113 : Synthèse et isomérisation de la pyridone <b>25</b> .....	168
Schéma 114 : Produits de réarrangement électrocyclique issus des composés <b>22</b> et <b>25</b> .....	169
Schéma 115 : Règles de Woodward-Hoffmann pour le réarrangement électrocyclique.....	169
Schéma 116 : Synthèse des composés <b>28</b> et <b>29</b> par ozonolyse des composés <b>26</b> et <b>27</b> .....	170
Schéma 117 : Intermédiaires formés au cours de l'hydrolyse en milieu acide du composé <b>29</b> ..	171
Schéma 118 : Réaction modèle pour le témoin positif.....	193
Schéma 119 : Proposition de mécanisme pour la réaction de désulfination de l'ACS.....	244
Schéma 120 : Mécanisme avec production de PMP pour la réaction de désulfination de l'ACS.	245
Schéma 121 : Accès aux 4 stéréoisomères d'acides aminés $\gamma$ -hydroxylés avec les TA A3D9 et A3B9. .....	247
Schéma 122 : Principe des boucles AL-TA pour la synthèse d'acides aminés $\gamma$ -hydroxylés.....	248
Schéma 123 : Réaction catalysée par la transcétolase.....	249
Schéma 124 : Couplage d'une TK et d'une SerTA pour la synthèse d'un cétose.....	249
Schéma 125 : Mesure de l'activité des SerTA par dosage du HPA avec le Test au WST-1.....	250
Schéma 126 : Synthèse du L-érythrose par couplage de la TK <sub>gst</sub> avec la TA A4C2.....	252
Schéma 127 : Mesure de l'activité de la TA A4A10 avec différents couples de substrats.....	254
Schéma 128 : Formation d'Ala à partir d'Asp catalysée par la TA A4A10.....	255
Schéma 129 : Déplacement d'équilibre par cyclisation du 2OG formé à partir de Gln.....	257
Schéma 130 : Stratégies de déplacement d'équilibre pour les $\alpha$ -TA et amine-TA utilisant des « smart donor ».....	260

## Table des Tableaux

Tableau 1 : Classification des TA en fonction de leur spécificité de substrat.....	56
Tableau 2 : Classification structurale des TA, basée sur les sous-groupes décrits par Mehta. <sup>70</sup> ....	58
Tableau 3 : Classification structurale des EAPP proposée par Mehta en trois familles : $\alpha$ , $\beta$ , et $\gamma$ .	59
Tableau 4 : Résumé des classifications des TA selon Grishin, Mehta et selon la spécificité de substrat.....	62
Tableau 5 : Classification des principales activités TA répertoriées à ce jour.....	66
Tableau 6 : Aminoacides rares ou non naturels préparés avec des $\alpha$ -TA.....	67
Tableau 7 : Exemples d'amines chirales synthétisées à l'aide d'amine-TA.....	70
Tableau 8 : Constantes d'équilibre de réactions catalysées par des amines-TA.....	75
Tableau 9 : Déshydrogénases utilisées dans des tests d'activités de TA. ....	95
Tableau 10 : Paramètres calculés lors de la mise au point des nouveaux tests de criblage pour les $\alpha$ -TA.....	121
Tableau 11 : Activités relatives de Q9A3Q9 avec l'HPT et divers accepteurs carbonyles. ....	123
Tableau 12 : Activités relatives de Q7NWG4 et Q9A3Q9 avec différents accepteurs <sup>a</sup> .....	126
Tableau 13 : Vitesses maximales sur 30 min. ( $\Delta DO_{\max}/\text{min} \times 10^2$ ) avec différentes quantités de TA.....	134
Tableau 14 : Substrats choisis pour le criblage des collections de TA.....	149
Tableau 15 : Séquences sélectionnées pour le set de référence de TAM(A). ....	176
Tableau 16 : Spectre de substrat des transaminases du SDR(A). ....	178
Tableau 17 : Matrice du pourcentage d'identité des TA du SDR(A), obtenue avec l'outil MUSCLE. ....	179
Tableau 18 : Nombre de candidats obtenus pour chaque séquence du SDR(A).....	180
Tableau 19 : Nombre de représentants sélectionnés pour TAM(A) avant et après clustering. ..	182
Tableau 20 : Annotations dans Uniprot et répartition des enzymes de TAM(A). ....	183
Tableau 21 : Matrice du pourcentage d'identité des TA du SDR(C), obtenue avec l'outil MUSCLE. ....	186
Tableau 22 : Nombre de séquences sélectionnées à partir des différentes TA du SDR(C). ....	188
Tableau 23 : cétoacides testés lors du criblage de TAM(A).....	197
Tableau 24 : Résultats obtenus pour les deux criblages effectués en série L avec le second groupe de substrat sur TAM(A). ....	203
Tableau 25 : Résultats obtenus pour les deux criblages de la banque TAM(A) effectués en série L et avec le troisième groupe de substrats. ....	209
Tableau 26 : Résultats obtenus pour les deux criblages de la banque TAM(A) effectués en série L avec les cétoacides $\gamma$ -hydroxylés HOP et HOPB.....	216
Tableau 27 : Cétoacides testés lors du criblage de TAM(C). ....	222
Tableau 28 : Résultats obtenus lors du criblages de la banque TAM(C) en utilisant le test couplé avec le D-Glu.....	224
Tableau 29 : Substrats accepteurs testés lors du criblage de TAM(D) avec le test direct utilisant l'HPT.....	227
Tableau 30 : Résultats du criblage de la banque TAM(D) avec le test direct utilisant l'HPT.....	228
Tableau 31 : Activités (UI/mL de Lysat) des 24 hits sélectionnés, mesurées avec le test direct utilisant le L-ACS. ....	233
Tableau 32 : Activités (UI/mL de Lysat) des 24 hits sélectionnés, mesurées avec le test couplé utilisant le L-Glu. ....	233
Tableau 33 : Activités (UI/mL de Lysat) des 24 hits sélectionnés, mesurées avec le test direct utilisant le D-ACS.....	234
Tableau 34 : Activités des 24 hits tagués et purifiés mesurées avec les tests directs (L- ou D-ACS). ....	235
Tableau 35 : Activités des 24 hits tagués et purifiés mesurées avec les tests couplés (L- ou D-Glu). ....	236

Tableau 36 : Activités spécifiques (UI/mg) des 24 hits mesurées avec les tests directs (L- ou D-ACS).....	237
Tableau 37 : Activités spécifiques (UI/mg) des 24 hits mesurées avec les tests couplés (L- ou D-Glu).....	237
Tableau 38 : Activités spécifiques (UI/mg) des hits mesurés avec le test GluDH/NAD <sup>+</sup> avec les aminoacides protéinogènes. ....	238
Tableau 39 : Paramètres cinétiques de la TA A4A10 pour la réaction entre Pyr et L-ACS. ....	239
Tableau 40 : Activités relatives des TA A3D9 et A3B9 pour le KG, le HOP et le HOPB. ....	246
Tableau 41 : Km apparents déterminés pour Pyr, Glyox et KG avec A4C2 en présence de Ser 20mM.....	251
Tableau 42 : Rendements obtenus (%) pour la synthèse du L-érythrulose dans la cascade TA-TK. ....	253
Tableau 43 : Activités (UI/mg) de la TA A4A10 mesurées avec différents couples donneur (20mM) – accepteur (2 mM). Entre parenthèse, activités relatives (%) par rapport à l’activité maximale mesurée avec le couple KG – L-ACS. ....	254
Tableau 44 : Conditions spécifiques des tests.....	310
Tableau 45 : Résultats de la purification des transaminases.....	315

## Table des Graphiques

Graphique 1 : Densité optique mesurée à 412 nm en fonction de [NaHSO <sub>3</sub> ].	112
Graphique 2 : Densité optique mesurée à 412 nm en fonction de [L-ACS].	113
Graphique 3 : Activités mesurées avec le test direct dans les 48 essais du témoin positif.	115
Graphique 4 : ΔDO/min à 412 nm en fonction de la quantité d'AspTA avec le test direct.	115
Graphique 5 : ΔDO/min à 340 nm en fonction de la quantité d'AspTA avec le test LDH/NADH.	116
Graphique 6 : Corrélation entre activité réelle et activité mesurée de la BCAT dans les conditions du test couplé (20 mUI d'AspTA).	118
Graphique 7 : ΔDO/min à 412 nm en fonction de la quantité de BCAT avec le test couplé.	119
Graphique 8 : ΔDO/min mesuré à 340 nm en fonction de la quantité de BCAT avec le test GluDH/NADH.	120
Graphique 9 : ΔDO/min à 412 nm en fonction de la quantité de Q9A3Q9 avec le test direct.	125
Graphique 10 : ΔDO/min à 412 nm en fonction de la quantité de A4A10 dans le test couplé avec HPT.	128
Graphique 11 : Production de SO <sub>2</sub> avec A4A10 en absence d'accepteur et à [PLP] variable.	133
Graphique 12 : Temps pour atteindre une ΔDO de 1 (●), 2 (◆), et 3 (+) à différentes [Q7NWG4].	135
Graphique 13 : Activité des TA Q7NWG4 et A4A10 en fonction de la concentration en PLP.	135
Graphique 14 : Courbe de calibration pour le test couplé utilisant l'ACS.	137
Graphique 15 : Courbe de calibration pour le test LDH/NADH.	138
Graphique 16 : Variation du signal de fluorescence (ΔRFU/min) en fonction de [NAD+].	142
Graphique 17 : Courbe de calibration pour le test à la résazurine.	143
Graphique 18 : Nombre d'occurrences des pourcentages d'identité calculés au sein de TAM(A).	184
Graphique 19 : Nombre d'occurrences des pourcentages d'identité calculés au sein du SDR(C).	187
Graphique 20 : Nombre d'occurrences des pourcentages d'identité calculés au sein de TAM(C).	188
Graphique 21 : Nombre d'occurrences des pourcentages d'identité calculés au sein de TAM(D).	190
Graphique 22 : Activités A <sub>0</sub> mesurées lors du criblage des 5 plaques constituant TAM(A) avec le L-ACS dans le test direct (premier plan) et couplé (second plan).	199
Graphique 23 : Classement des meilleurs hits pour le KG avec le test direct au L-ACS en fonction de leur activité.	200
Graphique 24 : Classement des meilleurs hits pour le KG avec le test direct au D-ACS en fonction de leur activité.	201
Graphique 25 : Annotation des hits détectés avec le test direct et le couple KG/D-ACS.	201
Graphique 26 : Activités des hits détectés avec le D-ACS dans le test direct avec les différents cétoacides du groupe 2. Le SDV (= 4A <sub>0</sub> ) calculé pour chaque enzyme est représenté en noir.	207
Graphique 27 : Activités des hits détectés avec le D-ACS dans le test direct avec les cétoacides AOP et AOH.	211
Graphique 28 : Classement des 10 meilleurs hits obtenus avec le test couplé et l'OPBA.	213
Graphique 29 : Classement des 10 meilleurs hits obtenus avec le test couplé et l'OPA.	213
Graphique 30 : Classement des hits obtenus avec l'OPBA (en bleu) et l'OPA (en rouge) en utilisant le test direct avec le D-ACS.	214
Graphique 31 : Classement des 10 meilleurs hits obtenus avec le test couplé et HMOP.	215
Graphique 32 : Classement des 10 meilleurs hits obtenus avec le test couplé et HOPP.	216
Graphique 33 : Classement des 5 meilleurs hits obtenus avec le test couplé et HOP.	217
Graphique 34 : Classement des 11 meilleurs hits obtenus avec le test couplé et HOPB.	218
Graphique 35 : Comparaison des activités mesurées avec HOP et Pyr pour les des 5 meilleurs hits détectés avec le test couplé et HOP.	218



Graphique 36 : Comparaison des activités mesurées avec HOPB et Pyr pour les 10 meilleurs hits détectés avec le test couplé et HOPB.....	219
Graphique 37 : Activités des D- $\alpha$ -TA de TAM(A) pour le Pyr, le HOP et le HOPB. Le SDV pour chaque enzyme est représenté en noir.....	219
Graphique 38 : Activités mesurées sans cétoacide pour toutes les enzymes de TAM(C). ....	223
Graphique 39 : Annotations dans Uniprot des 50 TA de TAM(C) présentant la plus forte activité A <sub>0</sub> . ....	223
Graphique 40 : Classement des 10 meilleurs hits obtenus avec le test direct utilisant l'HPT et le Pyr.....	229
Graphique 41 : Classement des 10 meilleurs hits obtenus avec le test direct utilisant l'HPT et le HPA.....	229
Graphique 42 : Hits obtenus avec l'acétaldéhyde lors du criblage avec le test direct à l'HPT. ....	230
Graphique 43 : Profil d'activité de la A4A10 en fonction de la température.....	240
Graphique 44 : Influence du pH sur l'activité de la TA A4A10 avec le tampon phosphate (●) et Tris (x).....	240
Graphique 45 : Influence du pourcentage volumique de DMSO sur l'activité de la TA A4A10. ....	241
Graphique 46 : Conversion du D-ACS (▲) en Ala (■) catalysée par la TA A3B9 avec PLP 50 $\mu$ M. ....	243
Graphique 47 : Conversion du L-ACS (▲) en Ala (■) catalysée par la TA A3B9 avec PLP 50 $\mu$ M. ....	243
Graphique 48 : Conversion du D-ACS (▲) en Ala (■) catalysée par la TA A3B9 sans addition de PLP.....	244
Graphique 49 : Taux de conversion des réactions de transamination mettant en jeu HOP et HOPB avec la L- ou D-Ala et les 2 TA A3D9 et A3B9. ....	247
Graphique 50 : Activité de 13 SerTA de TAM(A) en présence de Ser et de Pyr, Glyox ou KG. ....	250
Graphique 51 : Activité de la TA A4C2 en fonction de la température. ....	251
Graphique 52 : Activité de la TA A4C2 en fonction du temps d'incubation à 60 °C.....	252
Graphique 53 : Conversion de l'OPBA (7,2 mM) en HPhe en présence de A4A10 et de Glu.....	255
Graphique 54 : Consommation du Pyr en fonction du temps en présence de Gln (200 mM) et de la TA A3D9. Concentrations initiales de Pyr : 20 mM (×), 50 mM (■), 100 mM (+) et 200 mM (●).....	257

# Abréviations

## A

**A<sub>0</sub>** : activité sans cétoacide  
**A<sub>0</sub>'** : activité sans aminoacide  
**Aa** : aminoacides  
**Aad** : acide aminoadipique  
**aaDH** : aminoacide déshydrogénase  
**AAO** : aminoacide oxydase  
**ABA** : 4-aminobutanamide  
**ABTS** : acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)  
**AcOrn** : acétylornithine  
**ACS** : acide cystéine sulfinique  
**ADH** : alcool déshydrogénase  
**AL** : aldolase  
**ALDH** : aldéhyde déshydrogénase  
**ALS** : acétolactate synthase  
**AOH** : acide 2-oxohéxanoïque  
**AOP** : acide 2-oxopentanoïque  
**Aro** : aminoacides aromatiques

## B

**βAS** : acide β-aminosulfinique  
**βASTA** : β-aminosulfinique transaminase  
**BCAT** : *branched chain aminoacid transaminase*  
**Boc** : tert-butyloxycarbonyle

## C

**CALB** : lipase B de *Candida antartica*  
**CCM** : chromatographie sur couche mince  
**CL** : carboligase  
**COC** : acide 2-(carboxycarbonyl)-4-oxoazetidine-3-carboxylique  
**CS** : citrate synthase

## D

**DaBa** : acide diaminobutyrique  
**DABCO** : diazabicyclo[2.2.2]octane  
**Dap** : acide diaminopimélique  
**DaPa** : acide diaminopélargonique  
**DBO** : 3,3-diméthyl-2-butanone  
**DCC** : N,N'-dicyclohexylcarbodiimide  
**de** : excès diastéréoisomérique  
**DH** : déshydrogénase  
**DIAD** : azodicarboxylate de diisopropyle  
**DMAP** : diméthylaminopyridine  
**DMOB** : acide 3,3-Diméthyl-2-oxobutanoïque  
**DMOP** : acide 3,3-diméthyl-2-oxopentanedioïque  
**DMS** : sulfure de diméthyle  
**DMSO** : diméthylsulfoxyde  
**DO** : densité optique  
**dr** : rapport diastéréoisomérique  
**DTNB** : 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)

## **E**

**E. coli** : *Escherichia coli*

**EAPP** : enzymes à PLP

**ee** : excès énantiomérique

**EWG** : *electron withdrawing group*

## **F**

**FDH** : formate déshydrogénase

**Fum** : fumosinin B1

**FT** : *fold-type*

## **G**

**GaBa** : acide  $\gamma$ -aminobutyrique

**GDH** : glucose déshydrogénase

**GluDH** : glutamate déshydrogénase

**GluOx** : glutamate oxydase

**Glyox** : acide glyoxylique

**GlyOx** : glycine oxydase

## **H**

**Hala** : homoalanine

**HGDH** : hydroxycétoglutarate déshydrogénase

**HICDH** : hydroxyisocaproate déshydrogénase

**HisP** : histidinol-phosphate

**HMOP** : acide 3-hydroxy-4-méthyl-2-oxopentanoïque

**HOBA** : acide 3-hydroxy-2-oxobutanoïque

**HOP** : acide 4-hydroxy-2-oxopentanoïque

**HOPB** : acide 4-hydroxy-2-oxo-4-phénylbutanoïque

**HOPP** : acide 3-hydroxy-2-oxo-3-phénylpropanoïque

**HPA** : acide 3-hydroxy-2-oxopropanoïque (acide hydroxypyruvique)

**HPA-Red** : hydroxypyruvate réductase

**HPhe** : homophénylalanine

**HPPO** : 1-hydroxy-3-phénylpropan-2-one

**HPT** : hypotaurine

**HRP** : peroxydase de raifort

**HypoTA** : hypotaurine transaminase

## **I**

**IPA** : isopropylamine

**INT** : 2-(*p*-iodophényl)-3-(*p*-nitrophényl)-5-phenyltétrazolium

**IR** : infrarouge

**IRED** : imine réductase

## **K**

**kcat** : constante catalytique

**KDG** : acide 2-céto-2-désoxygluconique

**KG** : acide  $\alpha$ -cétoglutarique

**Km** : constante de Mickaelis

## L

**LDH** : lactate déshydrogénase

**LeuDH** : leucine déshydrogénase

**LOD** : limite de détection

## M

**1-méthoxy-PMS** : 1-méthoxy-5-méthyl-phénaziniumméthylsulfate

**MDH** : malate déshydrogénase

**mGluR** : récepteur métabotropique

**MHPT** : méthylhypotaurine

**MOPA** : acide 4-méthyl-2-oxopentanoïque

**MTOB** : acide 4-(méthylthio)-2-oxobutanoïque

## N

**NAD** : nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)

**NADH** : nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)

**NADP** : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée)

**NADPH** : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)

**NE** : noréphédrine

**Nea** : néamine

**NPE** : nor-pseudoéphédrine

**norVal** : norvaline

## O

**OA** : acide oaxaloacétique

**OAT** :  $\omega$ -transaminase

**OPA** : acide 2-oxo-2-phénylacétique

**OPBA** : acide 2-oxo-4-phénylbutanoïque

**Orn** : ornithine

## P

**PBO** : 1-phényl-2-butanone

**PDC** : pyruvate décarboxylase

**PDMA** : 1,2-phénylènediméthanamine

**PEA** : phényléthylamine

**PheDH** : phénylalanine déshydrogénase

**Pi** : phosphate inorganique

**PLP** : pyridoxal phosphate

**PMP** : pyridoxamine phosphate

**PMS** : phénazine méthosulfate

**PPDC** : phénylpyruvate décarboxylase

**PPO** : 1-phénylpropan-1-one

**Pre** : préphénate

**PSer** : phosphosérine

**Putre** : putrescine

**PYCR1** : pyrroline-5-carboxylate réductase

**Pyr** : acide pyruvique

**PyrASTA** : pyruvate-ACS transaminase

**PyrOx** : pyruvate oxydase

## **R**

**RMN** : résonance magnétique nucléaire

## **S**

**SDR** : set de référence

**SDS** : seuil de sélection

**SDV** : seuil de validation

**SM** : spectrométrie de masse

**SNC** : système nerveux central

**SSDH** : succinate-semialdéhyde déshydrogénase

**SucOrn** : succinylornithine

## **T**

**TA** : transaminase

**Taur** : taurine

**tBu** : tert-butyle

**ThDP** : thiamine diphosphate

**TK** : transcétolase

**TOF** : fréquence de *turnover*

**TON** : nombre de *turnover*

**TPF** : triphényl-formazan

**TTC** : 2,3,5-triphenyltetrazolium

## **U**

**UreGly** : uréidoglycine

## **V**

**Van** : vanillylamine

**Vm** : vitesse maximale

## **W**

**WST-1** : 4-(2-(4-nitrophenyl)-3-(p-tolyl)-2H-tetrazol-3-ium-5-yl)benzene-1,3-disulfonate

**WST-8** : 2-(2-méthoxy-4-nitrophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfo-phényl)-2H-tetrazolium

## **X**

**XTT** : disodium 2,3-bis-(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfo-phényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide

## **Y**

**YADH** : *yeast* alcool déshydrogénase

# **Introduction**



## Introduction

La chiralité est la propriété d'un objet de n'être pas superposable à son image dans un miroir. C'est par exemple le cas de la main, keir (χειρ) en grec, dont le terme est issu. Bien que ce concept soit assez ancien, il fut énoncé pour la première fois à l'échelle moléculaire en 1848 par Louis Pasteur.<sup>1</sup> Depuis, de nombreuses molécules sont connues sous deux formes différentes, images l'une de l'autre, et que l'on dénomme énantiomères. En dépit de leurs similitudes, deux énantiomères peuvent présenter des activités biologiques très différentes. Il est donc indispensable de bien connaître les propriétés respectives de chacun, avant d'envisager leur utilisation dans les domaines agricoles, agroalimentaires ou pharmaceutiques. Il n'est en effet pas rare qu'une molécule ait des propriétés thérapeutiques et que son énantiomère soit un puissant poison.<sup>2,3</sup> L'exemple le plus tristement célèbre, est celui du Thalidomide (Figure 1).

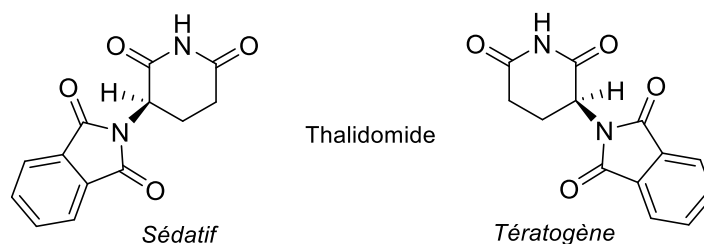


Figure 1 : Les deux énantiomères du thalidomide.

Il a été prescrit entre les années 1950 et 1960 comme sédatif et anti-nauséux, notamment chez les femmes enceintes, sous la forme d'un mélange racémique. Or il se trouve que seul un des deux énantiomères possède l'activité thérapeutique escomptée, alors que l'autre fait preuve d'un fort pouvoir tératogène, ce qui a malheureusement conduit à la naissance de très nombreux enfants malformés.<sup>4</sup> Suite à ce scandale sanitaire, des règles de sécurité strictes ont été mises en place, visant à évaluer rigoureusement l'activité des deux énantiomères d'un candidat médicament chiral et à réduire drastiquement la commercialisation de molécules bioactives sous la forme de mélanges racémiques. Ces réglementations ont ainsi poussé la communauté des chimistes à mettre au point de nouvelles voies de synthèses « énantiosélectives » pour la préparation de molécules sous la forme d'un seul énantiomère.<sup>2</sup>

Parmi les molécules bioactives chirales, on trouve très souvent des structures présentant au moins un atome d'azote engagé dans une fonction amine. Les amines



chirales sont ainsi très largement représentées dans l'arsenal thérapeutique comprenant des antibiotiques, des antiviraux, des anticancéreux ou encore des médicaments contre l'hypertension (Figure 2).

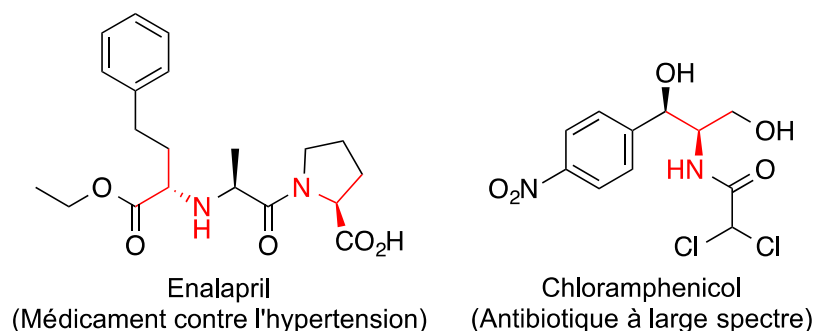


Figure 2 : Exemples d'amines chirales utilisées en thérapeutique.

Cette prépondérance de la fonction amine est liée aux propriétés physico-chimiques des amines (basicité, nucléophilie, possibilité de liaisons hydrogènes et ioniques) mais aussi à la haute densité d'informations structurales liée aux possibilités de substitutions au niveau de l'azote et des carbones liés à l'azote. La mise au point de méthodes de synthèse permettant de préparer des amines chirales « énantiomériquement pures » demeure un domaine de recherche très actif qui donne lieu à de très nombreux travaux aux niveaux académiques et industriels. Si la majorité des approches développées repose sur le développement de catalyseurs chimiques exploitant notamment les propriétés de divers métaux, l'utilisation industrielle des catalyseurs biologiques (biocatalyseurs) que sont les enzymes, constitue un domaine émergent offrant de riches perspectives. En plus de leurs excellentes propriétés catalytiques, les enzymes se prêtent, en effet, particulièrement bien au développement de procédés écoresponsables et durables, en répondant aux différents principes de la chimie verte. Ainsi de nombreux principes actifs pharmaceutiques initialement produits par des voies de synthèse chimique classiques sont désormais obtenus selon des procédés intégrant des biocatalyseurs. C'est par exemple le cas de la sitagliptine, un antidiabétique commercialisé par la société Merck (Januvia) dont l'étape clé de synthèse correspond à la formation d'une amine chirale via l'utilisation d'une enzyme : une transaminase (TA) (Schéma 1).<sup>5</sup>

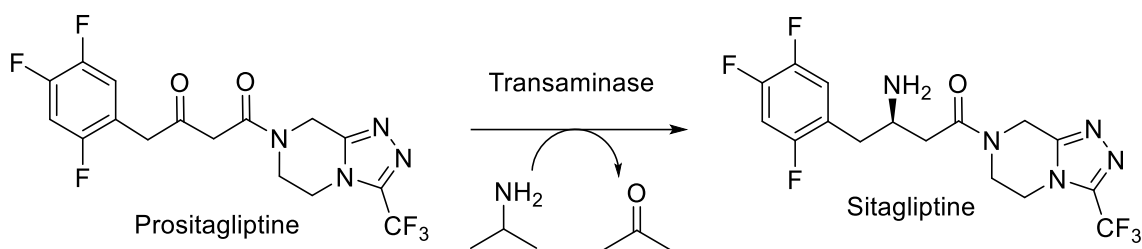


Schéma 1 : Procédé biocatalytique pour la synthèse de la sitagliptine.

Parmi les enzymes qui permettent la synthèse d'amines chirales, les transaminases (TA) sont parmi les plus efficaces.<sup>6,7</sup> Ces enzymes catalysent le transfert du groupement amino d'un substrat donneur (dans ce cas l'isopropylamine) sur le groupement carbonyle d'un substrat accepteur (dans ce cas la prositagliptine) pour former une amine chirale en une seule étape, avec une pureté énantiomérique proche de 100 %.

Les performances catalytiques de ces enzymes sont le résultat de centaines de millions d'années d'évolution au sein des organismes vivants. Ce gain d'efficacité catalytique s'est par ailleurs accompagné d'une spécialisation plus ou moins marquée du biocatalyseur vis-à-vis de ses substrats naturels, ce qui restreint malheureusement son champ d'applications dans le domaine industriel. Il existe cependant, au sein des organismes vivants, une grande diversité de TA, permettant d'envisager la synthèse d'une grande variété d'amines chirales. Afin de trouver l'enzyme adaptée à un besoin industriel particulier, il existe deux approches complémentaires : la modification et l'optimisation d'un candidat déjà connu en utilisant les techniques d'ingénierie des protéines, et la recherche de nouveaux biocatalyseurs en explorant la biodiversité.

C'est cette seconde approche que nous avons choisi de développer. Pour cela nous avons mis au point de nouveaux tests de criblage haut débit afin de détecter et de quantifier une variété d'activités catalytiques de transamination au sein de collections d'enzymes issues de la biodiversité. Ces collections ont été construites en partenariat avec le Génoscope d'Evry par clonage et surexpression de gènes sélectionnés dans des bases de données génomiques. Une fois ces deux éléments en notre possession, nous avons pu mettre en œuvre nos tests pour la recherche de nouvelles TA capables de produire plusieurs amines chirales sélectionnées pour leur fort potentiel industriel.

Dans une première partie bibliographique sont donc, tout d'abord, présentées les différentes voies d'accès aux amines chirales, incluant les principales approches

chimiques et biocatalytiques. Les propriétés des diverses TA sont aussi détaillées, accompagnées de la description des différentes méthodes de criblage décrites pour ces enzymes. Nos travaux sont décrits dans une seconde partie, incluant la mise au point des nouveaux tests de criblages, la construction des banques de TA, la synthèse des précurseurs de nos cibles d'intérêt, les résultats de nos criblages et enfin les premières études de caractérisation et d'application des nouvelles TA identifiées au cours de ce travail.

Au cours de cette thèse nous avons aussi mené de front plusieurs autres études enzymatiques, dont celle du spectre de substrat des monoamine oxydases humaines A et B. Cette étude, effectuée dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. Bunch de l'université de Copenhague, a donné lieu à une première publication, dont le contenu ne sera pas détaillé dans ce manuscrit, mais qui est jointe en annexe à ce document.

# **Bibliographie**



# Bibliographie

## 1 Principales voies d'accès aux amines chirales

Le terme amine chirale peut être appliqué à toute molécule chirale possédant la fonction amine. Cependant, nous nous concentrerons au cours de cette étude sur les amines dont le centre stéréogénique est le carbone adjacent à l'azote (amines  $\alpha$ -chirales). De plus, nous décrirons principalement les voies d'accès aux amines primaires (non substituées sur l'azote) qui constituent souvent des synthons pour accéder à des molécules plus complexes par alkylation ou acylation de l'azote.

L'extraction d'amines chirales naturelle est l'une des premières techniques à avoir été utilisée, notamment parce qu'elle est souvent moins coûteuse qu'un procédé synthétique. Ainsi un grand nombre de petites molécules chirales sont encore aujourd'hui extraites à partir de plantes ou de micro-organismes. C'est par exemple le cas de la pénicilline G<sup>8</sup> ou de la quinine, un antipaludique. Cette dernière est d'ailleurs facilement obtenue à partir de l'écorce d'arbres du genre des *Cinchona*<sup>9</sup> alors que sa synthèse comporte plus d'une vingtaine d'étapes.<sup>10,11</sup> À ces extractions de molécules naturelles vient s'ajouter la modification génétique des organismes qui permet aujourd'hui la production de molécules à très grande échelle. C'est notamment le cas des aminoacides naturels qui sont pour la plupart produits industriellement par fermentation.<sup>12-15</sup>

Cependant, le nombre de molécules facilement disponibles par extraction reste relativement modeste. De nombreux procédés synthétiques permettent, quant à eux, d'accéder à une grande variété d'amines chirales. Nombre d'entre eux sont basés sur le dédoublement de mélanges racémiques selon une variété d'approches (cristallisation, dédoublement cinétique). Le dédoublement de racémiques présente cependant l'inconvénient d'offrir un rendement maximum de 50 % si un recyclage de l'énantiomère non souhaité n'est pas mis en place. Alternativement, diverses méthodes de synthèse stéréosélective permettent d'accéder préférentiellement à l'énantiomère ciblé. Plus ou moins chronologiquement, les chimistes ont préparé des molécules chirales bioactives (i) en utilisant des substrats issus du pool chiral, (ii) en mettant en œuvre des approches diastéréosélectives utilisant des auxiliaires chiraux en quantité stoechiométrique et enfin (iii) en développant des catalyseurs chiraux pour convertir de façon hautement

énantiosélective, des substrats prochiraux en amines chirales. Notre étude bibliographique sera focalisée sur les méthodes de catalyse asymétrique dont fait partie l'approche biocatalytique.

## 1.1 Synthèses par voie chimique

Les principales approches de synthèse permettant d'accéder aux amines chirales sont décrites ci-dessous (Figure 3).

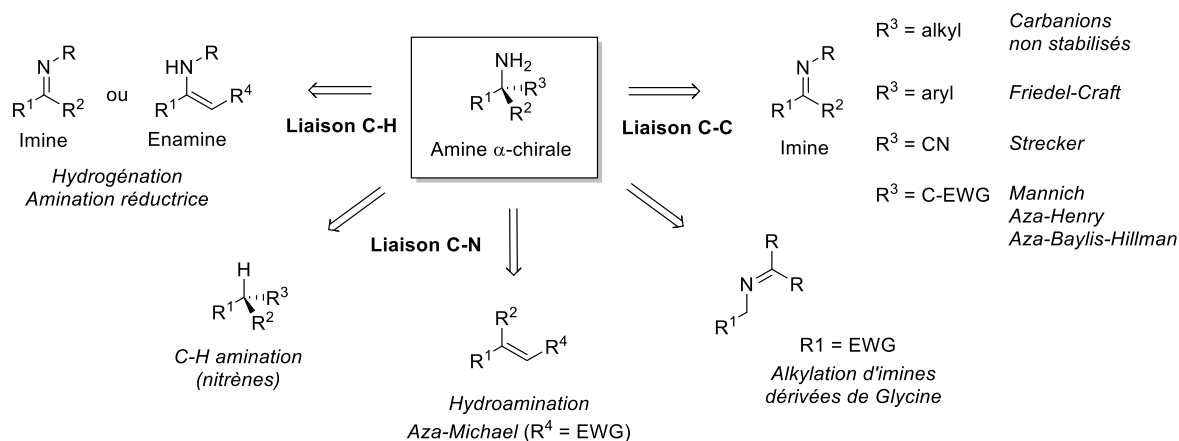


Figure 3 : Principales voies de synthèse asymétrique d'amines chirales.

Les imines et leurs dérivés, préparés à partir des dérivés carbonyles, constituent les précurseurs les plus courants de la fonction amine. Ces dérivés peuvent être hydrogénés ou subir l'addition d'une variété de nucléophiles carbonés. Dans des cas particuliers où le carbone α porte un groupement attracteur d'électrons (EWG = Electron Withdrawing Group) il est aussi possible d'alkyler cette position après formation d'une imine. De nombreux travaux ont aussi porté sur la formation de la liaison C-N via des réactions d'amination permettant d'insérer un réactif azoté dans une liaison C<sub>sp<sup>3</sup></sub>-H ou bien d'hydroamination permettant l'addition d'amines sur des composés insaturés. Toutes ces réactions ont donné lieu à des développements en catalyse asymétrique et ont fait l'objet de nombreuses revues.<sup>16-18</sup> Une multitude de catalyseurs organiques ou organométalliques ont été développés pour mener à bien la synthèse hautement énantiosélective d'une variété d'amines chirales. Quelques exemples représentatifs sont décrits ci-après.

### 1.1.1 A partir d'imines et dérivés

La plupart des réactions menées à partir des imines nécessitent la présence d'un groupement protecteur ou activateur sur l'atome d'azote. Beaucoup de réactions mettent par ailleurs en jeu des imines  $\alpha$ -aromatiques ( $R^1$  et/ou  $R^2 = \text{Ar}$ ) qui sont facilement préparées et relativement stables (Schéma 2).

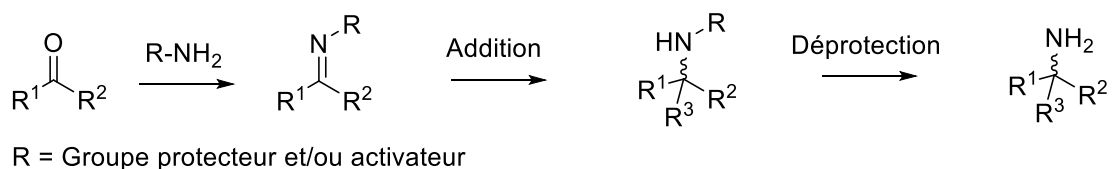


Schéma 2 : Schéma général pour la synthèse d'amines chirales à partir d'imines et dérivés.

Comparés aux dérivés carbonylés dont elles sont issues, les imines sont moins électrophiles mais leur caractère basique permet une activation plus facile en présence d'acides de Lewis.

D'autre part, dans de nombreux cas, la substitution de l'azote par des groupements attracteurs d'électrons permet d'activer l'imine vis-à-vis des réactifs nucléophiles. Il est intéressant de noter que, compte tenu de la présence nécessaire d'un substituant sur l'azote, l'utilisation d'auxiliaires chiraux demeure une stratégie compétitive par rapport à la catalyse asymétrique, en offrant, en plus, l'avantage d'une purification plus aisée des produits (séparation de diastéréoisomères). Parmi les très nombreux exemples d'utilisation d'auxiliaires chiraux, on peut citer les travaux d'Ellman mettant en jeu un auxiliaire sulfinyle permettant d'obtenir d'excellents rendements et puretés énantiomériques pour la réaction d'addition d'organomagnésiens (Schéma 3).<sup>19</sup>

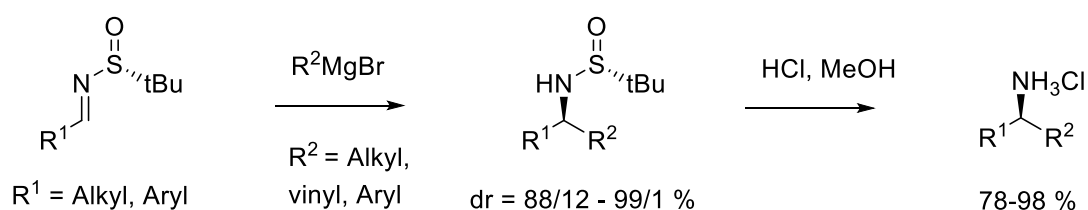


Schéma 3 : Utilisation d'un auxiliaire chiral de type sulfinyle.

De très nombreux travaux ont aussi concerné le développement de catalyseurs chiraux pour la formation de liaisons C-C ou la réduction des imines et des énamines.



### 1.1.1.1 Exemples de réactions de formation de liaisons C-C par catalyse asymétrique

L'addition de carbanions stabilisés sur des imines prochirales a donné lieu à de nombreuses réactions performantes de type Strecker, Mannich, aza-Henry ou encore aza-Baylis-Hillman. La version asymétrique de la réaction de Strecker constitue ainsi une voie de synthèse performante pour les  $\alpha$ -aminoacides. On peut citer dans ce cadre un exemple de catalyse par transfert de phase mettant en jeu un ammonium quaternaire de type binaphtyl (Schéma 4).<sup>20</sup>

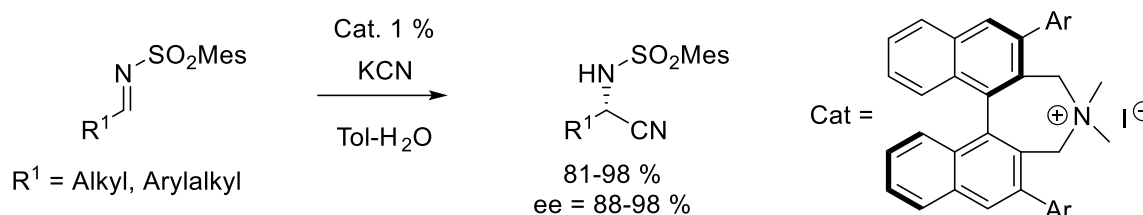


Schéma 4 : Réaction de Strecker avec un catalyseur de transfert de phase asymétrique.

Une série d'aminonitriles précurseurs de divers aminoacides rares ou non naturels ont ainsi été obtenus avec de bons rendements et puretés énantiomériques comme par exemple le précurseur de la *L-tert*-leucine (R<sup>1</sup> = tBu, 94 %, ee = 94 %) un acide aminé présent dans plusieurs peptidomimétiques utilisés en thérapeutique.

L'utilisation d'acides phosphoriques chiraux également dérivés du binaphtol a donné d'excellents résultats dans de nombreuses réactions d'addition de nucléophiles carbonés sur des imines. On peut par exemple citer des réactions de type Mannich mettant en jeu des  $\alpha$ -aryl imines protégées par un groupement Boc (Schéma 5).<sup>21</sup>

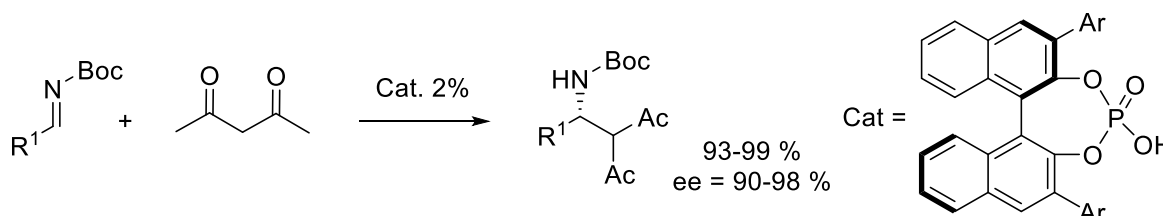


Schéma 5 : Exemple de réaction de Mannich catalysée par un acide phosphorique chiral.

Des carbanions non stabilisés (non substitués par des EWG) peuvent aussi être additionnés sur les imines. Dans ce cas, des catalyseurs métalliques liés à une variété de ligands chiraux permettent d'activer par transmétallation des composés

organométalliques peu réactifs. On peut ainsi additionner des dérivés dialkyl-Zinc en présence de catalyseurs chiraux à base de Rh, Zr, Hf ou encore de Cu, comme l'illustre l'exemple suivant (Schéma 6).<sup>22</sup>

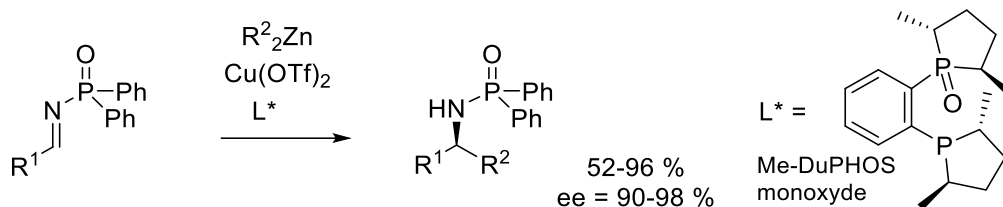


Schéma 6 : Addition d'organozinciques sur des phosphinoyl-imines catalysée par Me-DuPHOS monoxide-Cu(I).

Des nucléophiles carbonés de type alcényle, alcynyle ou aryle peuvent également être additionnés selon cette approche, comme dans l'exemple suivant mettant en jeu des nucléophiles de type boroxine et un catalyseur chiral à base de Rh (Schéma 7).<sup>23</sup>

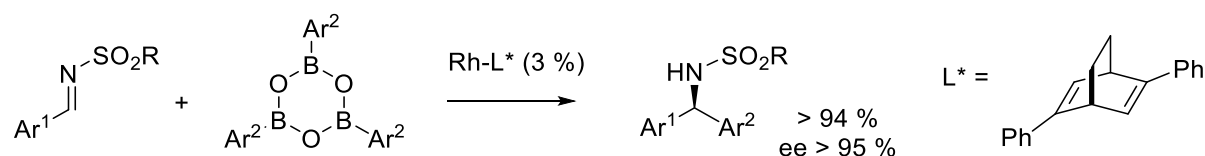


Schéma 7 : Addition d'aryl-boroxines catalysée par un catalyseur chiral à base de Rh.

Ces quelques réactions ne donnent qu'un aperçu très succinct de la diversité des méthodes qui ont été développées dans ce vaste domaine des réactions d'addition de nucléophiles carbonés sur les imines. Un autre domaine tout aussi vaste est celui de la préparation d'amines chirales par hydrogénation de cétones ou d'énamines.

### 1.1.1.2 Exemples de réactions d'hydrogénation

La catalyse organométallique est la principale approche développée pour la réduction des imines, des énamines ou pour l'amination réductrice des cétones. Parmi les métaux les plus fréquemment employés, on trouve ici encore le Rh, le Ru et l'Ir. Les ligands chiraux développés pour l'hydrogénation asymétrique sont d'une très grande diversité, avec tout de même une prépondérance des ligands bidentates de type bisphosphine. Les résultats de ces réactions en terme de stéréosélectivité demeurent malheureusement très dépendants des substrats et le criblage d'un grand nombre de ligands est souvent nécessaire.

De plus, plusieurs difficultés sont associées à la réduction des imines et des énamines. Il est ainsi fréquent d'observer la désactivation des catalyseurs par les produits aminés qui complexent les métaux. La protection de l'azote est donc souvent nécessaire et des EWG qui sont fréquemment introduits peuvent participer à la chélation du métal et conditionner la stéréosélectivité. De plus, l'isomérisation Z/E des imines et des énamines doit être contrôlée car elle impacte presque toujours la stéréosélectivité de la réduction. Dans le cas particulier de l'amination réductrice, il faut aussi assurer la réduction chimiosélective de l'imine en présence de la cétone correspondante. Malgré ces challenges de nombreux procédés efficaces ont été développés.

Le premier exemple industriel de synthèse d'amines chirales par hydrogénation est le procédé développé par Knowles et Monsanto pour la synthèse de la L-Dopa (Schéma 8).<sup>24</sup>

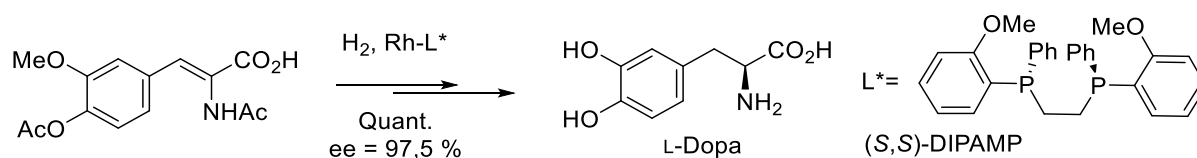


Schéma 8 : Hydrogénation d'un énamide précurseur de la L-Dopa avec un complexe Rh-DiPAMP.

En plus des  $\alpha$ -aminoacides, la réduction des énamides en présence de catalyseurs organométalliques chiraux permet d'accéder de façon efficace aux  $\beta$ -aminoacides mais aussi à une variété d'amines chirales comme l'illustre les exemples suivants (Schéma 9).<sup>25,26</sup>

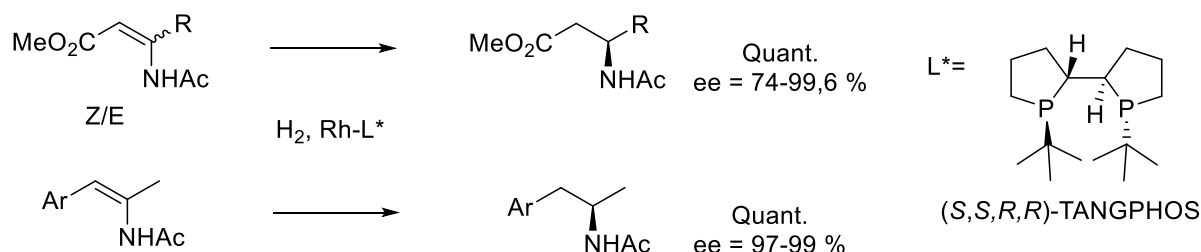


Schéma 9 : Exemples d'hydrogénation énantiosélective d'énamides.

L'hydrogénation des imines a aussi donné lieu à de nombreuses applications. Un exemple majeur est le procédé industriel développé pour la synthèse du (*S*)-metolachlor, un herbicide très largement utilisé pour la culture du maïs et produit à

l'échelle de 20000 tonnes par an. Ce procédé met en jeu un catalyseur à base d'Ir (Schéma 10).<sup>27</sup> En dépit de la stéréosélectivité modérée de la réaction, ce catalyseur montre d'excellentes performances cinétiques avec un nombre (TON) et une fréquence (TOF) de *turnover* très élevé.

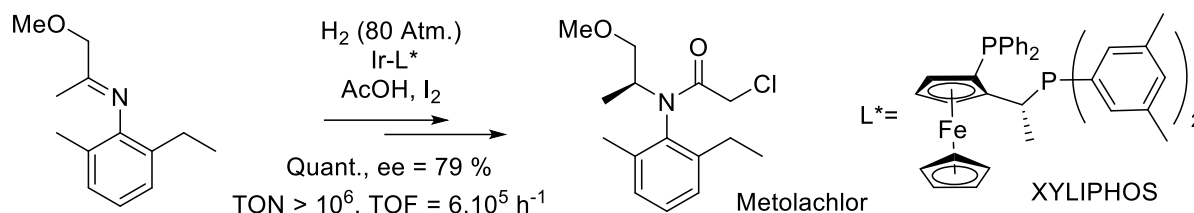


Schéma 10 : Procédé de synthèse du métolachlor par hydrogénation d'imine.

L'énantiosélectivité modeste obtenue dans ce procédé, illustre par ailleurs la difficulté de réduire des imines α-dialkylées (ou α-diarylées) de façon hautement énantiosélective. L'exemple suivant montre cependant que de très bons résultats peuvent être obtenus en combinant divers ligands (Schéma 11).<sup>28</sup>

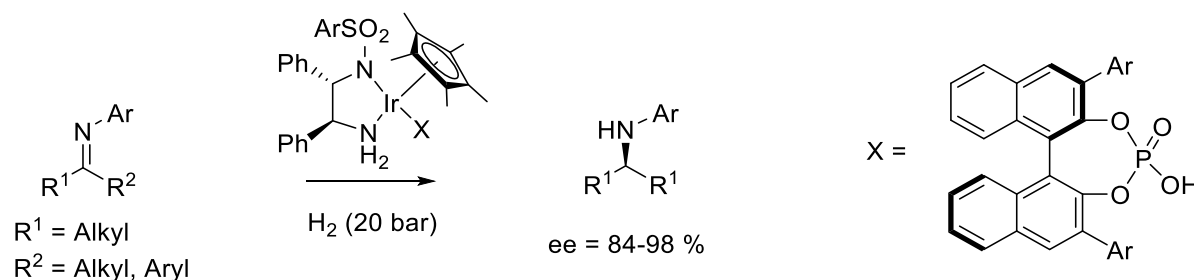


Schéma 11 : Hydrogénation d'imines par des catalyseurs chiraux à base d'Iridium.

L'amination réductrice des cétones, qui ne requiert pas la synthèse préalable d'une imine ou d'une énamine, a aussi fait l'objet de très nombreux travaux. D'une façon générale, les catalyseurs développés pour la réduction des imines et des énamines se révèlent moins efficaces pour l'amination réductrice, en raison des difficultés supplémentaires liées à la formation de l'imine *in situ* (équilibre défavorable à la formation d'imine, isomérisation Z/E, équilibre imine-énamine, inhibition du catalyseur par le substrat aminé...). Plusieurs réactions performantes ont cependant été mises au point, comme la synthèse de la L-phénylalanine en utilisant un catalyseur à base de Rh ou encore celle de la Sitagliptine, développée par la société Merck (Schéma 12).<sup>29,30</sup>

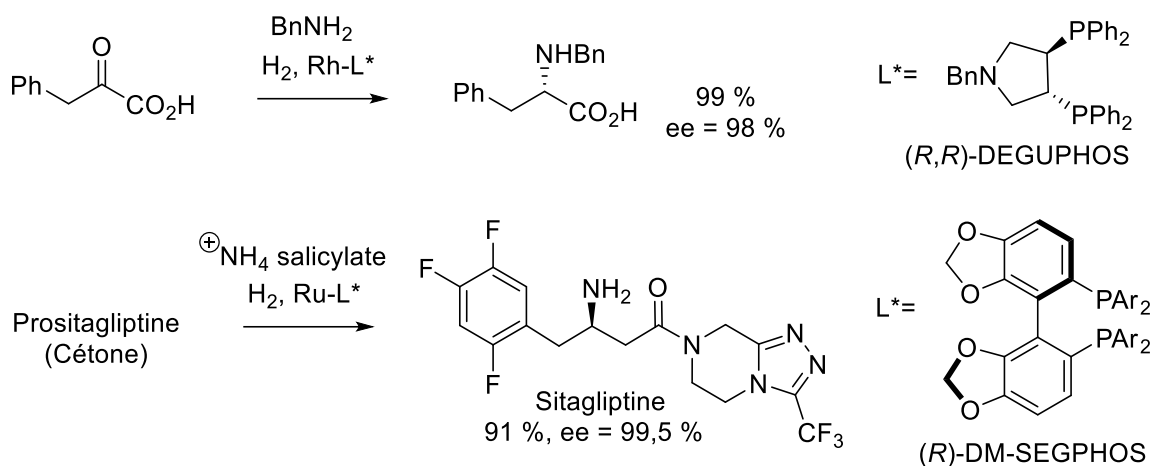


Schéma 12 : Exemples de procédés d'amination réductrice.

L'utilisation de catalyseurs organiques (sans métal), a également permis d'obtenir d'excellents résultats pour l'hydrogénation des imines. Ces réductions organocatalysées mettent en jeu des donneurs d'hydrures comme les hydrosilanes ou les esters de Hantzsch. Ces derniers peuvent être considérés comme des mimes des cofacteurs nicotinamides mis en jeu dans les réductions enzymatiques. Le dernier exemple ci-dessous concerne la synthèse de N-aryl- $\alpha$ -aminoesters utilisant un ester de Hantzsch et un acide phosphorique chiral comme catalyseur (Schéma 13).<sup>31</sup>

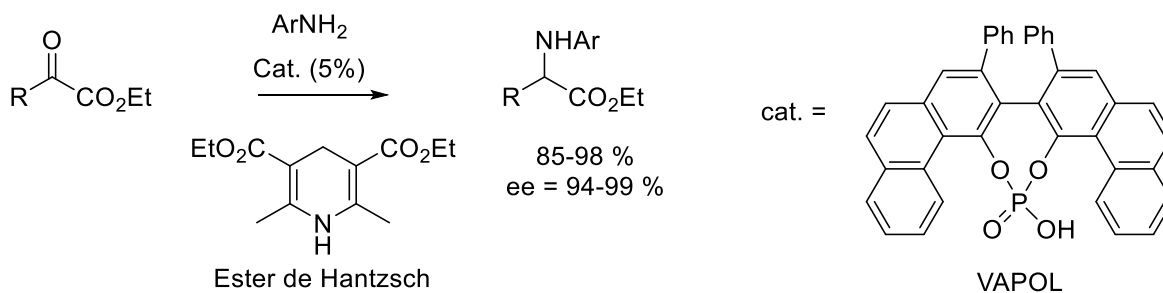


Schéma 13 : Exemple de procédé d'amination réductrice organocatalysée.

### 1.1.2 Réactions de C-H amination

Ces réactions présentent l'avantage d'introduire la fonction amine sur une position non fonctionnalisée. Elles consistent essentiellement en l'insertion de réactifs de type métallonitrènes au sein de liaison C-H (Schéma 14).

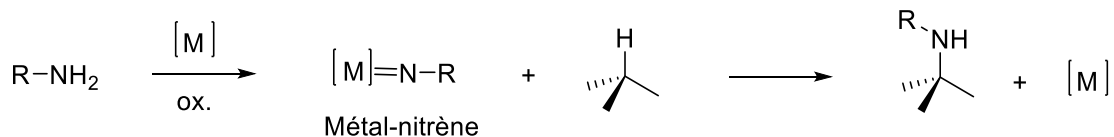


Schéma 14 : Schéma général d'une réaction de C-H amination avec un réactif de type métal-nitrène.

Ces réactions sont régiosélectives et se font en position allylique, benzylique, en  $\alpha$  d'hétéroatomes ou au niveau de carbones tertiaires. Les exemples les plus nombreux mettent en jeu des catalyseurs à base de Rh ou de Ru et concernent des réactions intramoléculaires. Quelques exemples de réactions intermoléculaires efficaces ont cependant été décrits comme l'illustre le Schéma 15.

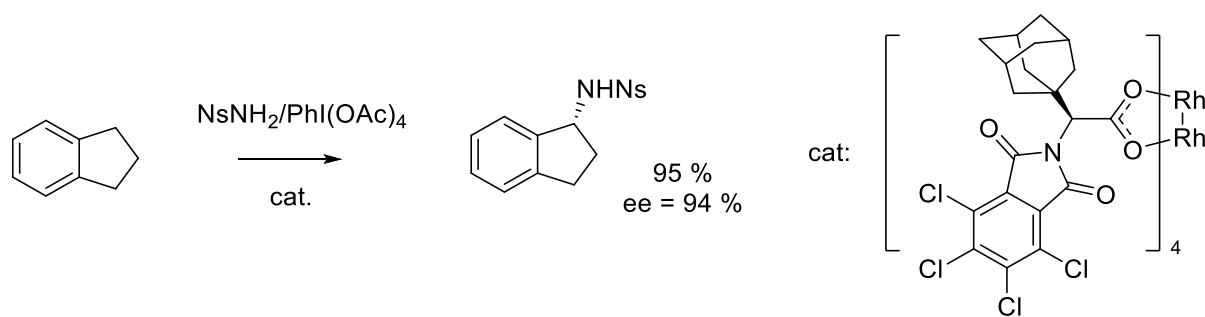


Schéma 15 : Exemple de catalyse asymétrique de la réaction de C-H amination.

Récemment une série de substrats insaturés ont été aminés de façon régio- et énantiosélective en utilisant un catalyseur de type Ru-CO-Salen et un azoture de sulfonyle comme précurseur de nitrène.<sup>32</sup> Il est vraisemblable que les réactions de C-H amination conduiront, dans un avenir proche, à de nombreuses applications dans le domaine de la synthèse d'amines chirales.

### 1.1.3 Réactions d'hydroaminations

L'addition des amines sur les composés éthyléniques est une réaction thermodynamiquement favorable mais cinétiquement limitée dans le cas des alcènes non activés et faiblement électrophiles. Par contre, lorsque l'alcène est appauvri par un EWG, l'addition de nucléophiles azotés est une voie d'accès classique aux amines, via des réactions de type Aza-Michael. De nombreux exemples de catalyse asymétrique ont été rapportés pour cette réaction. On peut par exemple citer l'utilisation de catalyseurs

organométalliques à base de Pd<sup>33</sup> ou encore de catalyseurs aminés chiraux permettant la formation d'un intermédiaire imminium avec des cétones conjuguées (Schéma 16).<sup>34</sup>

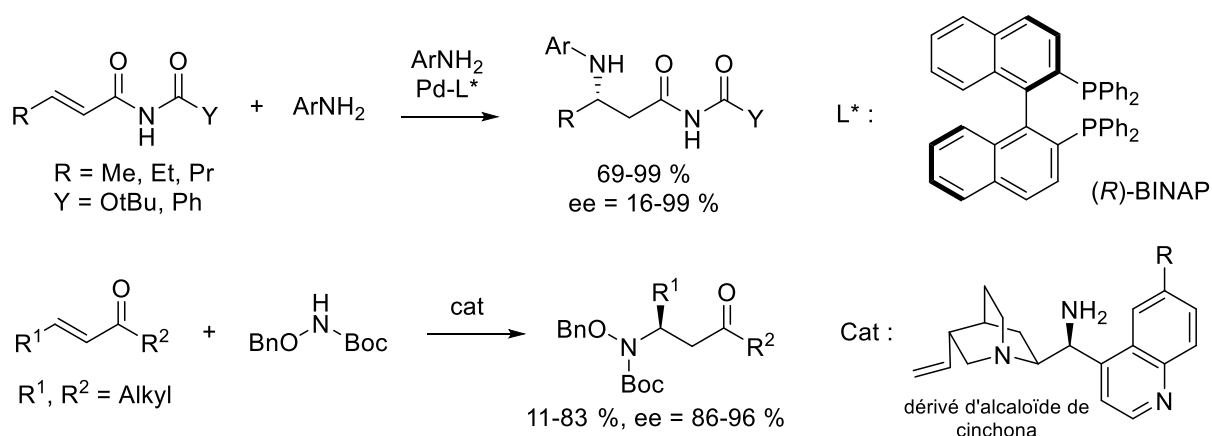


Schéma 16 : Exemples de catalyse asymétrique de la réaction d'aza-Michael.

L'hydroamination d'alcènes non activés a aussi fait l'objet de nombreux travaux au cours de la dernière décennie.<sup>35</sup> Des progrès notables ont été fait dans ce domaine comme l'illustre l'exemple suivant mettant en jeu un catalyseur de type Cu-diphosphine (Schéma 17).<sup>36</sup>

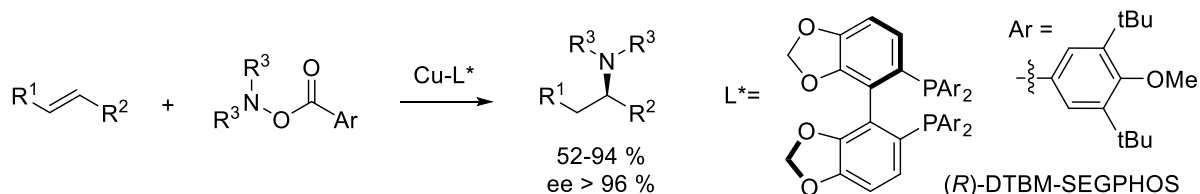


Schéma 17 : Exemple d'hydroamination d'alcènes non activés.

L'ensemble des exemples précédents donne un aperçu de la diversité des approches et du volume considérable de la littérature concernant les voies d'accès aux amines chirales par catalyse asymétrique. En dépit de résultats très marquants, de nombreux challenges restent à relever dans le domaine de la catalyse organique et organométallique, comme par exemple l'utilisation de substrats azotés non protégés ou l'obtention d' $\alpha$ -dialkylamines variées de façon hautement énantiosélective. En parallèle de la catalyse organique et organométallique, l'utilisation d'enzymes constitue aujourd'hui une alternative performante pour accéder aux amines chirales.

## 1.2 Synthèses d'amines chirales par voie biocatalytique

L'intérêt de l'approche biocatalytique en synthèse organique n'est aujourd'hui plus à démontrer.<sup>37,38</sup> De part leur chimio-, régio- et stéréosélectivité, les catalyseurs enzymatiques permettent de raccourcir les voies de synthèse en évitant notamment des étapes de protection/déprotection ou de purification. Leur efficacité catalytique exceptionnelle permet, par ailleurs, de travailler dans des conditions douces (milieux neutres, température ambiante) et leur activité en milieu aqueux limite la nécessité d'utiliser des solvants organiques. Leur nature protéique, biodégradable, et leur production à priori illimitée à partir de la biomasse constitue un autre atout majeur par rapport à certains catalyseurs métalliques dont la toxicité, le coût et l'approvisionnement variables peuvent poser problème. La chimiosélectivité des biocatalyseurs permet enfin de les combiner dans des procédés de type cascades multienzymatiques qui peuvent être mises en place dans un seul réacteur (one-pot) ou au sein d'une cellule vivante pour mettre au point des « usines cellulaires » (*cell-factories*) optimisées pour la production de molécules complexes.<sup>39</sup> Aujourd'hui les progrès dans le domaine de la biologie moléculaire et de l'ingénierie des protéines permettent d'envisager un fort développement de l'approche biocatalytique dans les années futures.

D'un point de vue de la stéréosélectivité, les enzymes permettent de catalyser deux types de processus. En catalysant la transformation sélective d'un énantiomère au sein d'un mélange racémique, les enzymes permettent d'une part d'effectuer des dédoublements cinétiques. D'autre part, elles peuvent aussi permettre de désymétriser des molécules via une réaction sélective au niveau des groupes ou des faces énantiotopes de substrats prochiraux. Les désymétrisations qui offrent potentiellement des rendements quantitatifs sont des processus plus intéressants que les dédoublements cinétiques qui, comme nous l'avons déjà évoqué, présentent un rendement maximum de 50 %. Cependant certains dédoublements cinétiques peuvent être réalisés de manière dynamique ou inclus dans des procédés de déracémisation qui peuvent aussi offrir des rendements quantitatifs. Nous limiterons donc notre bibliographie à des exemples relatifs à ces deux derniers types de procédés en plus des désymétrisations.



Les différents types d'enzymes permettant d'accéder aux amines chirales sont décrits dans la Figure 4.<sup>40,41</sup>

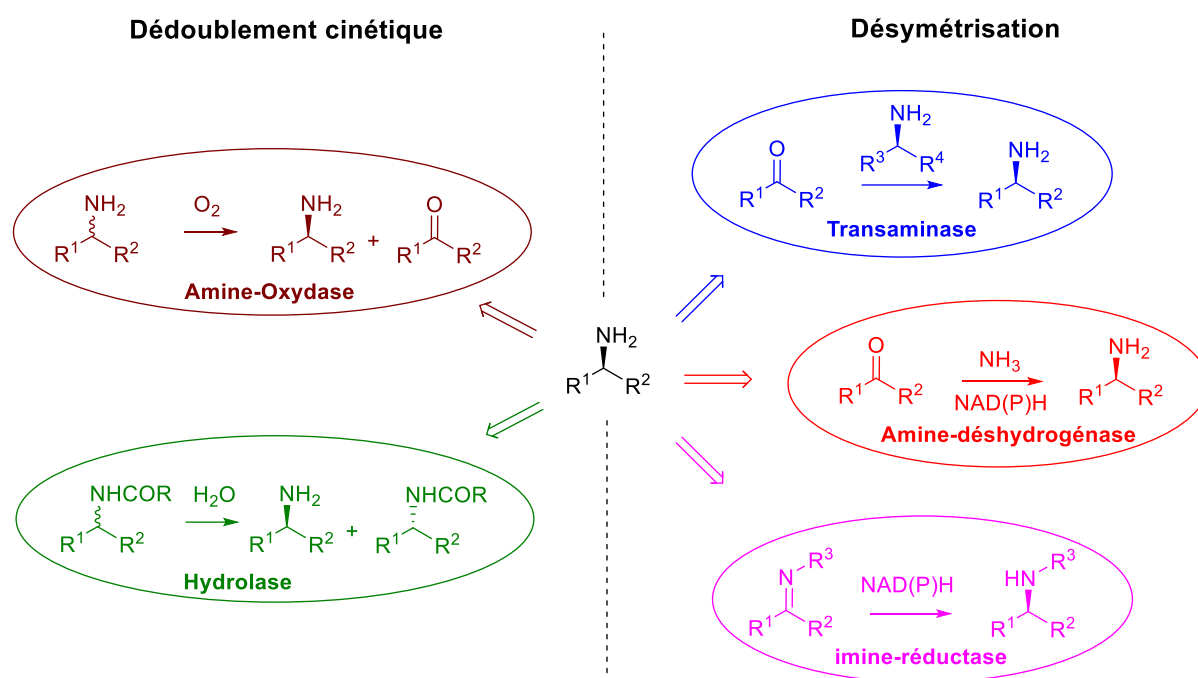


Figure 4 : Principales classes d'enzymes permettant d'accéder à des amines énantiopures.

La désymétrisation de cétones prochirales via des processus de type amination réductrice est la principale voie biocatalytique pour accéder aux amines chirales. Ainsi les imines réductases et amines déshydrogénases mettent en jeu des transferts d'hydrure sur des imines, tandis que les transaminases permettent le transfert d'une fonction amine. Des processus d'hydroamination utilisant des lyases ont également été décrits.<sup>42</sup> Par ailleurs, des hydrolases ou des amines oxydases ont aussi été mises en œuvre dans des procédés de dédoublement cinétique dynamique et de déracémisation. Quelques exemples représentatifs sont décrits ci-après.

### 1.2.1 Exemples de dédoublements cinétiques dynamiques et de déracémisations

Le schéma général d'un dédoublement cinétique dynamique associe un processus de dédoublement cinétique à une réaction de racémisation du substrat (Figure 5). Ce type de processus permet donc la conversion quantitative d'un substrat racémique en un seul produit énantiomériquement pur.

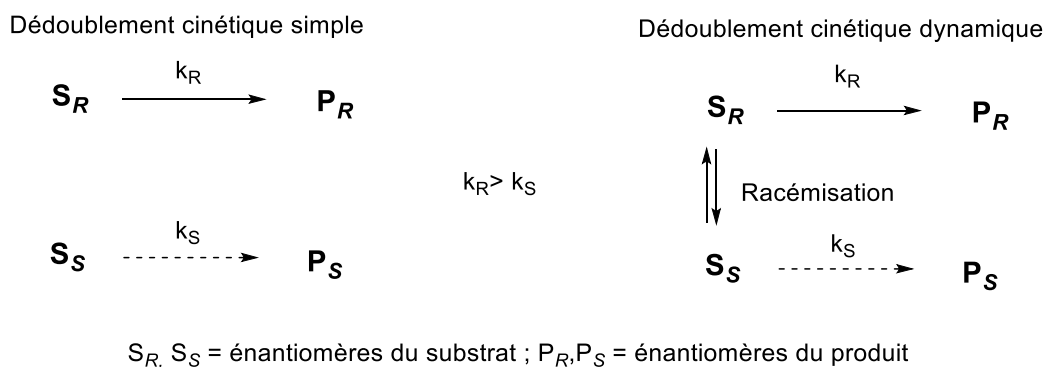


Figure 5 : Schéma général d'un dédoublement cinétique dynamique.

Ce type de procédé est cependant limité par la possibilité de racémiser facilement un substrat dans des conditions compatibles avec l'activité des enzymes. Dans le cas des amines chirales, cette racémisation est relativement difficile et peu d'exemples ont été décrits. On peut cependant citer l'utilisation du catalyseur de Shvo, à base de Ruthénium qui permet la racémisation par oxydoréduction des amines primaires  $\alpha$ -disubstituées. L'association de ce catalyseur à une lipase thermophile, la lipase B de *Candida antarctica* (CALB) a ainsi permis de préparer une série d'amines chirales acétylées avec d'excellents excès énantiomériques (Schéma 18).<sup>43</sup>

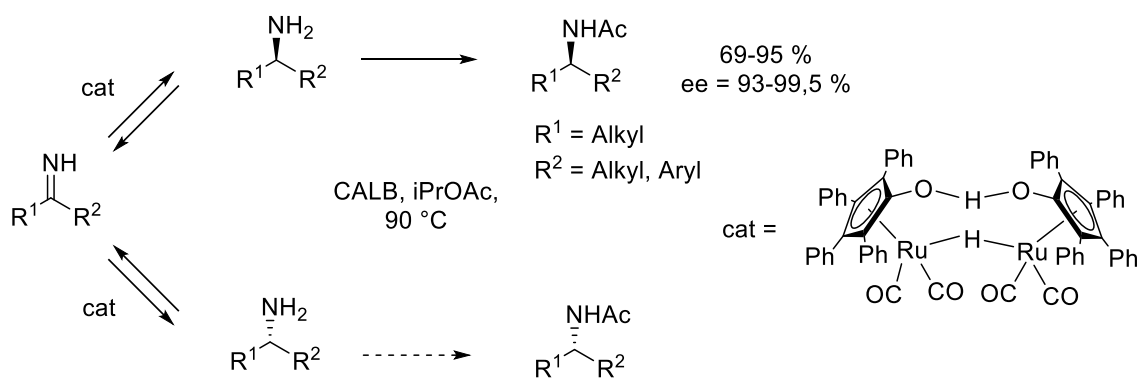


Schéma 18 : Dédoublage cinétique dynamique d'amines chirales associant une lipase et un catalyseur organométallique.

La racémisation peut aussi être catalysée par une enzyme comme dans le procédé industriel « hydantoinase » développé par la société Degussa. Dans ce procédé une hydantoine-racémase, une D- ou L-hydantoinase et une carbamoylase surexprimées dans une même souche d'*E. coli* recombinante permettent de préparer une variété de D- ou L-aminoacides à partir d'hydantoines racémiques faciles à synthétiser (Schéma 19).<sup>44,45</sup>

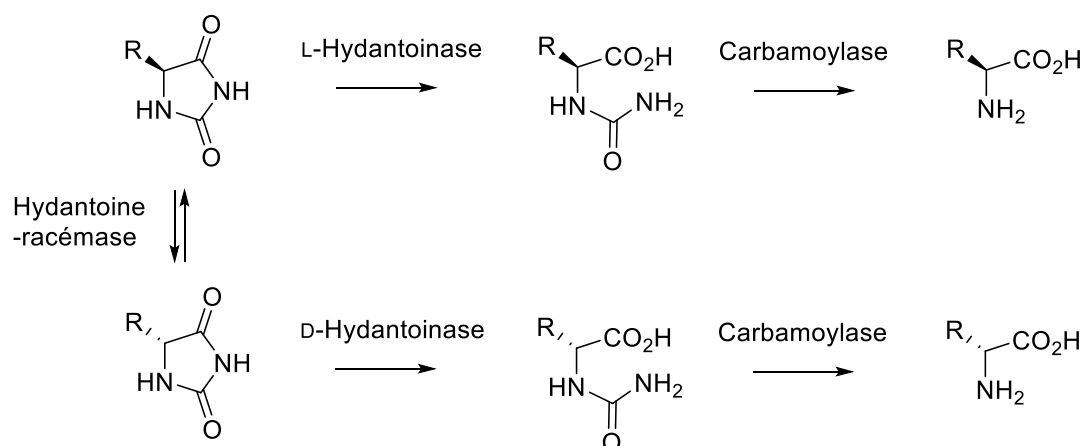


Schéma 19 : Dédoublings cinétiques dynamiques d'hydantoïnes utilisant une hydantoïne-racémase.

Des procédés de déracémisation qui s'apparentent aux dédoublements dynamiques ont été développés en combinant des amine oxydases et des agents réducteurs non sélectifs. Parmi les différents réducteurs utilisés, les amine-boranes qui permettent la réduction chimiosélective des imines en milieu aqueux ont donné de très bons résultats comme l'illustre la synthèse de la D-Leucine mettant en jeu une L-aminoacide oxydase (Schéma 20).<sup>46</sup> Dans ce procédé, l'imine formée par oxydation sélective du L-aminoacide en présence d'oxygène est reconvertie de façon non sélective en mélange d'aminoacide L et D, ce dernier non oxydé en imine, s'accumulant dans le milieu.

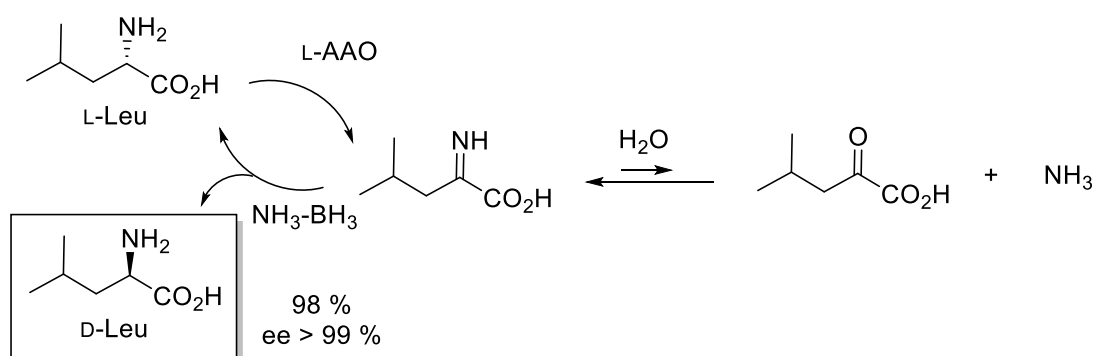


Schéma 20 : Déracémisation de la Leucine combinant une L-aminoacide oxydase et  $\text{BH}_3\text{-NH}_3$ .

Une variété de D-aminoacides a ainsi été préparée tandis que l'utilisation de D-aminoacide oxydases (D-AAO) a permis d'accéder selon le même principe aux L-aminoacides. Par ailleurs, l'ingénierie de la monoamine oxydase-N d'*Aspergillus niger* a permis de générer une série de mutants efficaces pour la déracémisation de diverses amines chirales.<sup>40</sup>

Des procédés de déracémisation multienzymatiques ont aussi été mis en œuvre en combinant une D-AAO avec une L-aaDH ou une L- $\alpha$ -transaminase (L- $\alpha$ -TA) permettant de reconverter en L-aminoacide le cétoacide produit à partir du D-aminoacide (Schéma 21).<sup>47,48</sup> Ces procédés de déracémisation présentent l'avantage d'utiliser comme substrats des aminoacides racémiques facilement accessibles par des méthodes bien établies au niveau industriel.

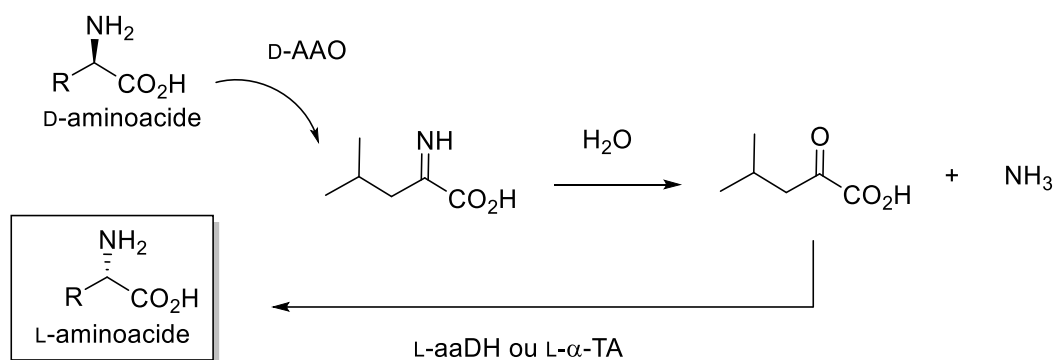


Schéma 21 : Principe des déracémisations multienzymatiques d'aminoacides combinant une D-AAO avec une L-aaDH ou un L- $\alpha$ -TA.

## 1.2.2 Exemples de désymétrisations

Les amine oxydases évoquées dans le paragraphe précédent ont aussi été utilisées dans des procédés de désymétrisation d'une série d'hétérocycles azotés. Ce type de procédés a notamment permis la synthèse d'un intermédiaire clé dans la synthèse du boceprevir, un inhibiteur de protéase du virus de l'hépatite C (Schéma 22).<sup>49</sup>

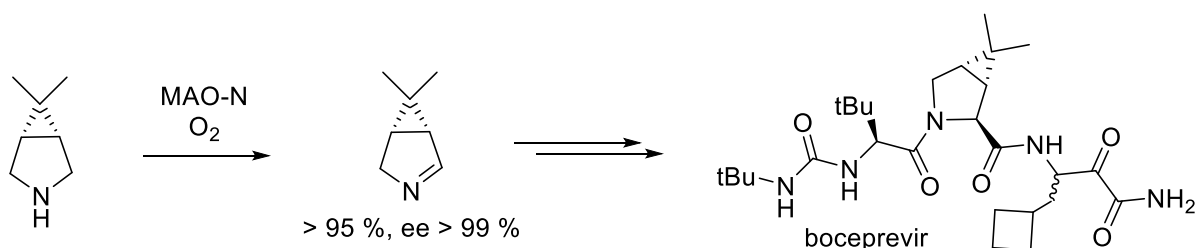


Schéma 22 : Exemple de désymétrisation utilisant une amine oxydase.

De façon plus classique, les imines et les dérivés carbonylés sont les précurseurs des amines chirales dans les procédés de désymétrisation biocatalysés avec des amines déshydrogénases, des imines réductases ou encore des TA.

Les déshydrogénases (DH) catalysent des réactions de transfert d'hydrogène en utilisant des cofacteurs de type nicotinamide (NADH ou NADPH). Compte tenu du coût très élevé de ces cofacteurs, l'utilisation des DH dans des procédés synthétiques requiert la mise en place d'un système de régénération de ces derniers afin de les utiliser en quantité catalytique. Les aminoacides déshydrogénases (aaDH) et en particulier la LeuDH, la PheDH et la GluDH ont fait l'objet de très nombreux travaux et ont permis de préparer une variété d'acides aminés rares ou non naturels de série L par amination réductrice des  $\alpha$ -cétoacides correspondants.<sup>50</sup> Parmi les nombreux exemples, on peut citer le premier procédé industriel développé par la société Degussa pour la synthèse de la *tert*-leucine<sup>51</sup> ou encore la synthèse de la L-3-hydroxyadamantylglycine, présente dans la saxagliptine, un antidiabétique développé par la société Bristol-Myers Squibb (Schéma 23).<sup>52</sup>

Dans ce dernier exemple, le biocatalyseur est une souche recombinante d'*E. coli* surexprimant une PheDH modifiée par ingénierie et une formate déshydrogénase (FDH) permettant la régénération du NADH.

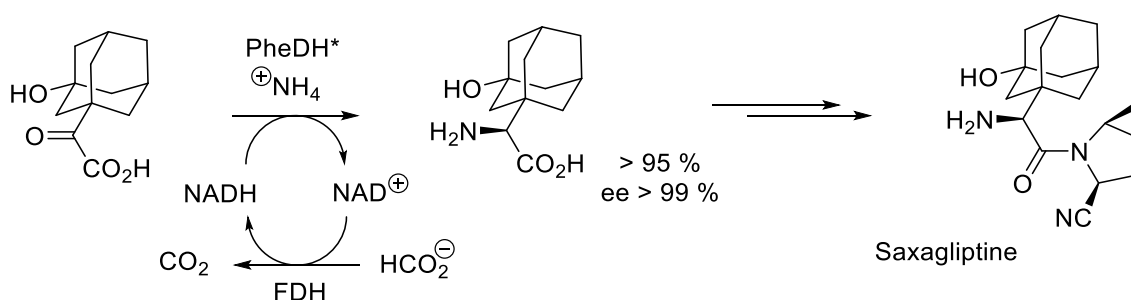


Schéma 23 : Exemple d'amination réductrice catalysées par une L-aaDH.

Les aaDH permettent aussi d'accéder aux D-aminoacides. L'évolution dirigée d'une méso-diaminopimélate-D-déshydrogénase a ainsi conduit à un mutant présentant un large spectre de substrat et offrant des produits énantiomériquement purs (ee  $> 99\%$ ).<sup>53</sup> Par ailleurs, l'évolution dirigée d'une LeuDH a conduit à l'obtention d'une amineDH active avec des cétones dépourvues du groupement  $\alpha$ - $\text{CO}_2\text{H}$  comme la 4-méthyl-pentane-2-one (Schéma 24).<sup>54</sup>

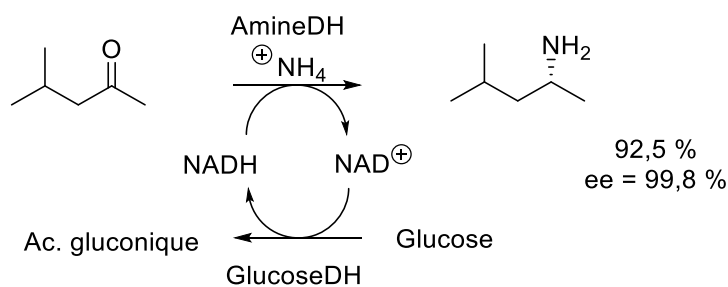


Schéma 24 : Exemple d'amination réductrice catalysée par une amineDH.

Des imines réductases (IRED) ont également été identifiées et utilisées pour la préparation d'amines chirales. Deux enzymes issues de *Streptomyces sp.* utilisant le NADPH comme cofacteur ont montré des stéréosélectivités complémentaires et une activité vis-à-vis de différentes imines cycliques.<sup>55-57</sup> Des IRED ont également été récemment utilisées dans des réactions d'aminations réductrices intermoléculaires mettant en jeu divers composés carbonylés et diverses amines.<sup>58,59</sup>

Parmi les enzymes permettant la synthèse d'amines chirales par désymétrisation de dérivés carbonylés, les TA occupent aujourd'hui une place prépondérante. Elles ont été utilisées de longue date pour préparer une grande diversité d' $\alpha$ -aminoacides des séries D ou L. Au cours de la dernière décennie, le domaine des transaminations enzymatiques a connu un grand essor. Les TA sont désormais reconnues comme des catalyseurs compétitifs au niveau industriel, pour accéder à une grande diversité d'amines chirales. Le chapitre suivant est consacré à la description des caractéristiques et des applications de cette famille d'enzymes.

## 2 Les transaminases

### 2.1 Généralités

Les TA, qui sont aussi communément dénommées aminotransférases, sont des enzymes ubiquitaires, impliquées dans de nombreuses voies métaboliques.<sup>60-62</sup> La première évocation d'une transamination enzymatique remonte aux travaux de Neldham sur la différence entre les taux en Glu, Asp, et oxaloacétate (OA) dans le muscle de pigeon.<sup>63</sup> Depuis, de très nombreuses TA ont été découvertes, isolées, caractérisées, et utilisées en synthèse.

Les TA appartiennent à la classe des transférases, et plus particulièrement à la famille des enzymes à pyridoxal phosphate (PLP) ou vitamine B<sub>6</sub>. Ces enzymes utilisent,

en effet, le PLP comme cofacteur afin de catalyser le transfert réversible d'un groupement amino d'un substrat donneur d'amine, sur le groupement carbonyle d'un substrat accepteur (Schéma 25).

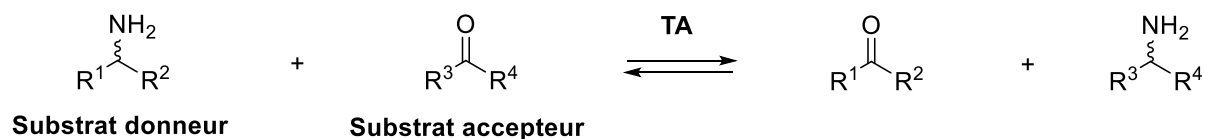


Schéma 25 : Réaction de transamination.

Le mécanisme d'action des TA repose sur la formation d'intermédiaires de type imine entre les substrats et le cofacteur présent au sein du site actif (Schéma 26). Le PLP est initialement lié à un résidu lysine du site actif, sous la forme de l'intermédiaire « aldimine interne ». Ce résidu lysine est essentiel pour catalyser la transamination et est par conséquent conservé chez toutes les TA.

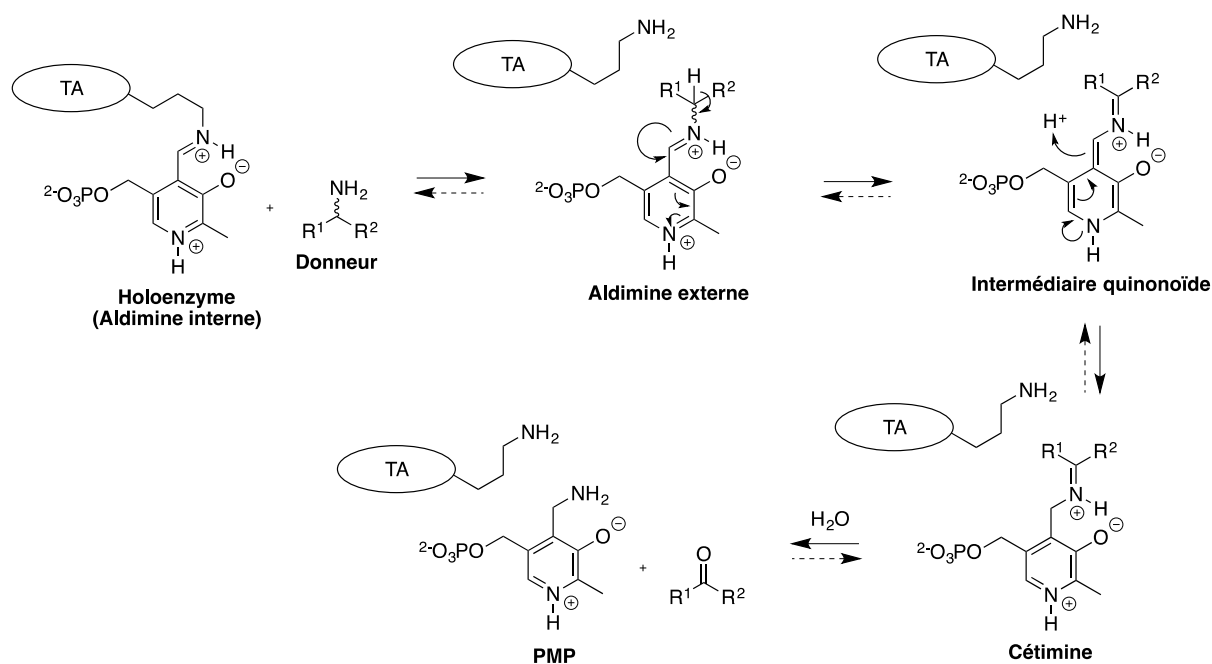
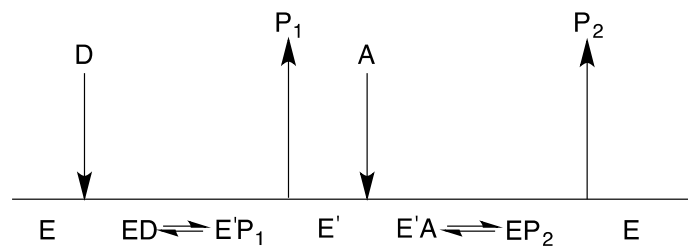


Schéma 26 : Mécanisme réactionnel de la transamination enzymatique.

La réaction de transamination correspond à l'enchaînement de 2 demi-réactions. La première (flèches pleines dans le Schéma 26), débute par une transamination entre l'aldimine interne et le substrat donneur, qui conduit à la formation d'une « aldimine externe ». Le substrat donneur, activé par sa liaison au PLP subit alors une déprotonation au niveau du carbone α conduisant à une intermédiaire « quinonoïde ».

La reprotonation de cet intermédiaire au niveau du Carbone 2 du coenzyme conduit ensuite à l'intermédiaire « cétimine » dont l'hydrolyse entraîne la formation du produit carbonylé correspondant au substrat donneur, ainsi que du pyridoxamine phosphate (PMP). Au cours de cette première demi-réaction, la fonction amine a donc été transférée du substrat donneur sur le coenzyme. Après libération du produit carbonylé et liaison du PMP avec le substrat accepteur, la seconde demi-réaction correspond au processus inverse (flèche en pointillés dans le Schéma 26) au cours duquel le groupement amino est transféré du coenzyme sur ce dernier. Le produit aminé correspondant est alors libéré et le PLP régénéré sous la forme de l'aldimine interne.

La réaction de transamination obéit à un modèle cinétique de type « Ping-Pong, bi-bi » qui peut être schématisé selon la représentation de King-Altman (Figure 6) :



*E : Enzyme liée au PLP, D : substrat donneur, P<sub>1</sub> : produit carbonylé, E' : Complexe Enzyme-PMP, A : Substrat accepteur, P<sub>2</sub> : produit aminé.*

Figure 6 : Représentation de King-Altman du mécanisme ping-pong des transaminases.

L'exploitation mathématique de ce modèle permet, grâce à l'étude des vitesses en état quasi-stationnaire, de formuler l'Équation 1 dans laquelle l'inverse de la vitesse initiale (V) de transamination est une fonction linéaire dépendante de la concentration en substrats ([D] et [A]) :

Équation 1 : Equation de Mickaelis-Menten.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_{m_D}}{V_m [D]} + \frac{1}{V_m} \left( \frac{1 + K_{m_A}}{[A]} \right)$$

*K<sub>mX</sub> : Constante de Michaelis-Menten de l'enzyme pour le substrat X, V<sub>m</sub> : Vitesse maximale à concentrations saturantes en substrats.*



## 2.2 Classification des transaminases

Comme nous l'avons vu, les TA font partie de la grande famille des enzymes à PLP (EAPP). Ces enzymes présentent de nombreuses caractéristiques communes, et il n'est pas possible d'évoquer la classification des TA d'un point de vue phylogénique ou structural sans les replacer parmi les autres EAPP.

Les EAPP sont au centre de très nombreuses voies métaboliques et sont responsables de la quasi-totalité des réactions métaboliques mettant en jeu des amines.<sup>64-66</sup> Elles représentent en moyenne 1,5 % des gènes exprimés au niveau cellulaire et 4 % de l'ensemble des activités enzymatiques répertoriées par l'Enzyme Commission (EC).<sup>67,68</sup> Elles constituent ainsi la famille d'enzymes la plus grande et la plus variée aussi bien en terme de structures que d'activités.<sup>69-72</sup> L'étude des EAPP, et en particulier des TA, a donné lieu à de très nombreux travaux et a conduit à diverses applications dans le domaine de la biocatalyse. Ce chapitre présente les éléments caractéristiques des TA et des EAPP de manière plus générale, sur les plans phylogénique, structural et fonctionnel.

### 2.2.1 Réactions catalysées par les enzymes à pyridoxal phosphate

Le PLP a été découvert en 1951.<sup>73</sup> Il s'agit d'une molécule particulièrement abondante au niveau cellulaire,<sup>74</sup> qui est synthétisée par trois voies métaboliques différentes<sup>74-78</sup> et qui est impliqué dans des réactions enzymatiques très variées.<sup>7,67,68,79</sup> On le retrouve ainsi associé à des enzymes appartenant à 5 des 6 classes d'activités enzymatiques répertoriées et en particulier à des transférases, dont la majorité sont des TA ((2.6.1.x) Figure 7).

Les EAPP catalysent des réactions de transamination, de racémisation, de réduction, d'élimination, de substitution, de décarboxylation, de phosphorylation,<sup>80</sup> ou encore des réactions radicalaires.<sup>71,81</sup> Dans quasiment tous les cas, la formation d'une imine avec un substrat aminé (aldimine externe) permet de fragiliser et d'induire la coupure spécifique d'une liaison en position  $\alpha$ ,  $\beta$ , ou  $\gamma$  de la fonction amine. Le Schéma 27 résume la diversité de ces réactions.<sup>7,82</sup>

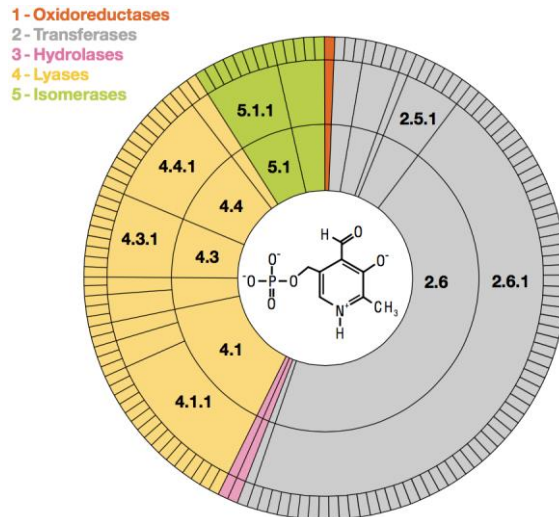


Figure 7 : Différentes activités enzymatiques de la famille des EAPP, classées par numéros EC.<sup>67</sup>

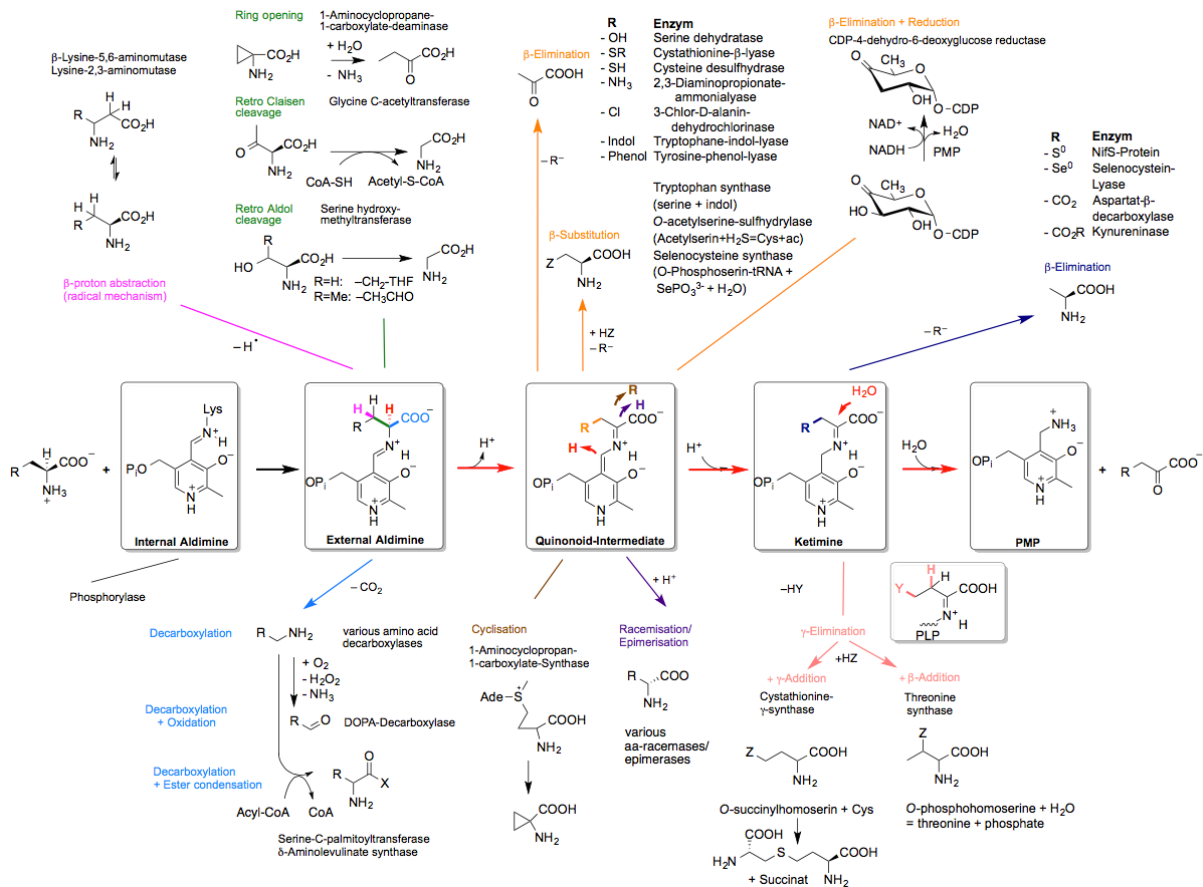


Schéma 27 : Ensemble des réactions catalysées par les EAPP.<sup>7</sup>

L'aldimine externe peut subir la coupure d'une des 3 liaisons portées par le carbone  $\alpha$ . Ainsi on pourra observer une déprotonation, une décarboxylation ou encore la coupure  $C\alpha-C\beta$  dans des réactions de rétroaldolisation ou de rétroclaisen.

L'intermédiaire quinonoïde formé pourra ensuite donner lieu à différentes transformations. Il pourra fixer des électrophiles en position  $\alpha$ , comme par exemple un proton, ce qui conduira à des réactions de racémisation ou d'épimérisation. Il pourra aussi subir une réaction d'élimination d'un substituant en position  $\beta$ , éventuellement suivie d'une addition sur la même position, résultant finalement en une substitution en position  $\beta$ . Alternativement, une reprotonation de l'intermédiaire quinonoïde sur le carbone 2 du coenzyme conduira à l'intermédiaire cétimine. Ce dernier pourra encore subir la perte d'un groupement en  $\beta$ , comme dans le cas de la  $\beta$ -décarboxylation de l'Asp, ou encore subir une élimination correspondant au départ d'un nucléofuge en position  $\gamma$ . L'intermédiaire formé pourra encore subir une addition en position  $\gamma$  (cas de la cystathionine synthase) ou en position  $\beta$  (cas de la thréonine synthase). Alternativement, l'intermédiaire cétimine pourra subir une hydrolyse conduisant à la libération d'un produit cétonique et à la formation de PMP comme au cours de la réaction de transamination. Dans ce cas, comme nous l'avons vu précédemment, la seconde demi-réaction permet de régénérer le PLP. D'autres réactions conduisent à la formation de PMP comme par exemple la décarboxylation de 2,2-dialkylglycines conduisant à la formation de dialkylcétones et de PMP.<sup>83-86</sup> Dans ce cas, le PLP est régénéré via une seconde réaction de transamination, généralement effectuée avec le pyruvate comme accepteur et conduisant à la formation d'Alanine. Cet exemple, illustre la variété des possibilités de réactions mettant en jeu le PLP et dont certaines restent sans doute à découvrir.

La plupart des voies réactionnelles des EAPP ont été établies dès la fin des années 90<sup>87,88</sup> et les facteurs déterminants l'orientation vers un type de réaction ont aussi fait l'objet de nombreux travaux. Les premiers éléments ont été établis dès 1966 par Dunathan qui explique la fragilisation préférentielle de la liaison du substrat située perpendiculairement au plan du coenzyme, permettant ainsi un recouvrement orbitalaire optimal (Figure 8).<sup>89</sup>

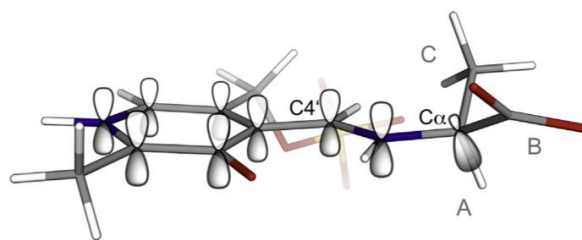


Figure 8 : Intermédiaire aldimine formé entre le PLP et l'alanine, montrant l'alignement du système  $\pi$  avec la liaison C-H rompue.<sup>7,82,89</sup>

Ainsi en l'absence d'une enzyme permettant une orientation spécifique du substrat, la réaction entre une amine et le PLP conduit à divers produits via des réactions assez lentes.<sup>90</sup> Ce premier élément, appelé principe de Dunathan, explique comment la structure tridimensionnelle de l'enzyme est responsable de la sélection de l'une des trois réactions possibles au niveau de l'aldimine externe. Un autre élément clé se situe au niveau de l'azote du noyau pyridine.<sup>7,82</sup> L'état de protonation de cet azote dépend en effet fortement de la nature des résidus situés à proximité. Si la forme pyridinium est stabilisée par la présence d'un résidu Asp ou Glu, son caractère électroattracteur permet une meilleure délocalisation de la charge du  $C_{\alpha}$  après coupure de la liaison. Ceci fait tendre le mécanisme réactionnel vers les réactions de décarboxylation, de clivage  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$  ou vers la formation de l'intermédiaire quinonoïde, favorisant par exemple la réaction de transamination. En revanche, dans les cas de résidus neutres (Ser, Thr, Cys) ou basiques (Arg) ne permettant pas de stabiliser efficacement la forme pyridinium, le caractère nucléophile du carbanion est augmenté, favorisant plutôt les réactions de reprotonation du  $C_{\alpha}$  (racémisation) ou de substitution nucléophile. Ceci est cohérent avec l'observation que les transaminations et les décarboxylations sont les principales réactions observées avec le PLP en milieu acide. En plus de ces facteurs, l'ensemble des éléments structuraux du site actif d'une EAPP est à l'origine du contrôle fin de l'évolution des intermédiaires réactionnels, en particulier de l'intermédiaire quinonoïde. Cependant, en dépit de nombreux travaux, il demeure encore difficile à ce jour de prédire l'activité d'une EAPP sur la seule base structurale de son site actif.

### 2.2.2 Classification générale des TA selon la spécificité de substrat

Le nombre de séquences annotées en tant que TA dans les bases de données génomiques et protéiques (environ 260 000 séquences dans UniProtKB (<http://www.uniprot.org>) à l'heure où ces lignes sont écrites) et de structures

cristallographiques (plus de 500 dans la PDB (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/>)) ne cesse de croître. Dans l'optique de leur utilisation en biocatalyse, l'utilisation d'une classification claire et pertinente des TA apparaît comme primordiale.

La première approche possible pour le classement des TA se base sur la spécificité de substrat. On peut tout d'abord distinguer 4 grands types d'enzymes parmi la centaine d'activités de transamination répertoriées au sein de la base de données BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.org>). Ces catégories sont liées à la présence et la position d'un groupement acide carboxylique au sein de la structure des substrats (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification des TA en fonction de leur spécificité de substrat.

Groupe :	$\alpha$ -TA		$\beta$ -TA	$\omega$ -TA	Amine-TA
	L- $\alpha$ -TA	D- $\alpha$ -TA			
Structure générale des substrats :	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{HO}_2\text{C}-\text{C}-\text{R}^1 \end{array}$ R <sup>1</sup> = Virtuellement illimité en terme de possibilités		$\begin{array}{c} \text{R}^2 \\   \\ \text{HO}_2\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \end{array}$ R <sup>2</sup> = H, NHR	$\begin{array}{c} \text{R}^3 \\   \\ \text{HO}_2\text{C}-\text{C}(\text{---})_{n>1}-\text{NH}_2 \end{array}$ R <sup>3</sup> = H, NHR	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{R}^4-\text{C}-\text{R}^5 \end{array}$ R <sup>4</sup> = CO <sub>2</sub> H, alkyl, aryl R <sup>5</sup> = H, CH <sub>3</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , CH <sub>2</sub> OH
Donneur préférentiel :	L-Glu	D-Ala	L/D-Ala		
Accepteur préférentiel :	KG	Pyr	Pyr		

Le premier groupe de TA est responsable de transaminations mettant en jeu exclusivement des  $\alpha$ -aminoacides. Les enzymes de ce groupe, communément appelées  $\alpha$ -TA, sont impliquées dans le métabolisme des aminoacides appartenant aux séries L ou D. Très abondantes et très variées, les L- ou D- $\alpha$ -TA sont particulièrement intéressantes pour la synthèse d'aminoacides rares ou non naturels, en particulier d'analogues d'aminoacides protéinogènes, comme par exemple l'homophénylalanine, l'homoalanine, ou encore la *tert*-leucine, présents dans la structure de nombreux peptidomimétiques à visée thérapeutique. Les L- $\alpha$ -TA, malgré leur grande diversité, présentent en général la particularité d'accepter le couple L-Glu/KG comme substrats préférentiels.<sup>37,70</sup> En revanche, la plupart des D- $\alpha$ -TA sont presque toutes annotées en tant que D-Ala-TA, et semblent quant à elle accepter communément le couple D-Ala/Pyr.

Le deuxième groupe, plus restreint, contient les enzymes qui acceptent des  $\beta$ -aminoacides. Ces  $\beta$ -TA ont comme substrats principaux la  $\beta$ -Ala et la taurine. Elles permettent elles aussi d'accéder à une variété de  $\beta$ -aminoacides rares ou non naturels.

Le troisième groupe nommé  $\omega$ -TA contient diverses enzymes qui acceptent des substrats dont le groupement carboxyle est séparé par plus de 2 atomes de carbone de l'amine généralement située en bout de chaîne. Les substrats les plus courants de ces enzymes sont la lysine, l'ornithine et l'acétyl-ornithine, pour lesquelles la transamination a lieu au niveau de la chaîne latérale, ainsi que l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GaBa).

Enfin, le quatrième et dernier groupe est celui des amine-TA. Il s'agit du groupe le plus étudié à l'heure actuelle en raison de la diversité des applications qu'offrent les enzymes qui le constituent. Les amine-TA acceptent en effet une variété de substrats dépourvus d'acide carboxylique et offrent ainsi accès à une très grande diversité d'amines chirales, y compris quelques aminoacides. On notera d'ailleurs que les groupes 2, 3 et 4 sont souvent rassemblés sous le terme générique d'amine-TA par opposition aux  $\alpha$ -TA qui n'acceptent que des  $\alpha$ -aminoacides. Il est aussi fréquent de rencontrer l'utilisation du terme  $\omega$ -TA pour désigner ces 3 mêmes groupes, mais elle s'avère erronée et nous ne l'emploierons pas dans ce manuscrit. Enfin, les enzymes de ces 3 groupes présentent la particularité de toutes, ou presque, accepter le pyruvate et la L- ou D-Ala.

Ce premier niveau de classification est donc limité à une description générale du type de TA étudié et ne repose pas sur des données structurales et phylogéniques, ce qui limite sa pertinence lors de l'étude théorique de ces enzymes.

### **2.2.3 Classification structurale des TA**

La seconde classification proposée pour les TA repose sur leur structure tridimensionnelle, elle-même liée à leur séquence primaire. Cette classification structurale fait donc appel au traitement bio-informatique des séquences connues pour ces enzymes, et nécessite des structures tridimensionnelles pour des représentants de chaque famille d'enzyme. Ceci explique que cette classification ne soit pas fixe et qu'elle puisse évoluer à l'avenir, comme elle a pu le faire par le passé. L'ensemble de ces données conduit alors au regroupement des TA en familles et sous-familles, dont un aperçu est donné dans les paragraphes ci-après en suivant l'évolution de la classification de ces enzymes, en parallèle avec celle des EAPP qui lui est intimement liée.

La toute première structure tridimensionnelle d'une EAPP à avoir été décrite est celle de l'AspTA, en 1980.<sup>91</sup> Il a fallu attendre encore 9 ans avant que la structure

tridimensionnelle d'une autre EAPP, une  $\omega$ -TA, soit à son tour déterminée.<sup>92</sup> Plus globalement, la Protein Data Bank (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/node/1>) est longtemps restée assez pauvre en structures d'EAPP, ne comportant presque exclusivement que des structures de TA. Cependant, l'amélioration des techniques de cristallographie ainsi que l'accroissement continu du débit de traitement de données ont permis d'accéder à des structures d'EAPP de plus en plus diversifiées. Une classification structurale des EAPP a ainsi pu être développée à partir des travaux initiaux de Mehta et de Grishin dans les années 90.<sup>70,71</sup> Cette classification a par ailleurs donné lieu à la construction d'une base de données numérique regroupant toutes les caractéristiques connues des différentes EAPP répertoriées: *The B<sub>6</sub> Database* (<http://bioinformatics.unipr.it/cgi-bin/bioinformatics/B6db/home.pl>).<sup>68</sup>

### 2.2.3.1 La classification selon Mehta

En 1993, sur la base de l'alignement des 51 séquences des TA alors répertoriées, Mehta définit 4 sous-groupes dans lesquels sont classées ces différentes enzymes (Tableau 2).<sup>70</sup>

Tableau 2 : Classification structurale des TA, basée sur les sous-groupes décrits par Mehta.<sup>70</sup>

Sub-group	Enzyme	EC no.	Main substrates		Structure of amino acid substrates
			amino acid	oxo acid	
I	AspAT	2.6.1.1	L-aspartate	2-oxoglutarate	
	AlaAT	2.6.1.2	L-alanine	2-oxoglutarate	
	TyrAT	2.6.1.5	L-tyrosine	2-oxoglutarate	
	HisPAT	2.6.1.9	L-histidinol-P	2-oxoglutarate	
	PheAT	2.6.1.58	L-phenylalanine	pyruvate	
II	AcornAT	2.6.1.11	<i>N</i> -acetyl-L-ornithine	2-oxoglutarate	
	OrnAT	2.6.1.13	L-ornithine	2-oxoglutarate	
	$\omega$ -AaAT	2.6.1.18	$\beta$ -alanine	pyruvate	
	GaBaAT	2.6.1.19	4-aminobutyrate	2-oxoglutarate	
	DapaAT	2.6.1.62	7,8-diaminopelargonate	<i>S</i> -adenosyl-4-methylthio-2-oxobutanoate	
III	D-AlaAT	2.6.1.21	D-alanine	2-oxoglutarate	
	BcaaAT	2.6.1.42	L-leucine	2-oxoglutarate	
IV	SerAT	2.6.1.51	L-serine	pyruvate	
	PSerAT	2.6.1.52	3-phospho-L-serine	2-oxoglutarate	

Le premier sous-groupe (I) est le plus varié. Il contient des TA acceptant les L- $\alpha$ -aminoacides (L- $\alpha$ -TA), hormis la sérine et la phosphosérine. Ces derniers aminoacides constituent les substrats naturels de TA classées dans le sous-groupe IV. Le sous-groupe

Il est, quant à lui, plus éloigné en terme d'activité. Les TA qui le composent sont plutôt du type amine-TA et regroupent des activités  $\omega$ -TA,  $\beta$ -TA, GaBaTA et DaPaTA. Enfin le sous-groupe III, très hétérogène, est composé par les D- $\alpha$ -TA (D-AlaTA) et les L- $\alpha$ -TA de type *Branched Chain Aminoacid Transaminase* (BCAT). Il apparaît d'ailleurs déjà comme un groupe structuralement et phylogéniquement très différent de tous les autres, avec notamment des séquences nettement plus courtes. Il a cependant fallu attendre 1995 avec la caractérisation de la première structure 3D d'une D-Ala-TA<sup>93</sup> et les travaux de Grishin<sup>71</sup> pour que des précisions soient apportées sur ce sous-groupe III. Mehta proposera par la suite une classification plus générale des EAPP divisées en trois grandes familles, notées  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ . Cette notation est directement liée à la position du carbone qui est le siège de la réaction enzymatique (Tableau 3).<sup>94</sup>

Tableau 3 : Classification structurale des EAPP proposée par Mehta en trois familles :  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ .

Enzyme	Abbreviation	EC number	Representative sequence	Sequence of other species
$\alpha$ Family				
Glycine hydroxymethyltransferase	SerHM	2.1.2.1	rabbit (cytosolic)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , rabbit (mitochondrial)
Glycine C-acetyltransferase	GlyAcT	2.3.1.29	<i>E. coli</i>	<i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>B. japonicum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , chicken (erythroid, nonspecific), mouse (erythroid), rat (nonspecific), human (erythroid, nonspecific)
5-Aminolevulinatase synthase	AlevSYN	2.3.1.37	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	
8-Amino-7-oxononanoate synthase	AmoxSYN	2.3.1.47	<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>E. coli</i>
Serine-pyruvate aminotransferase	SerAT	2.6.1.51	human	rat (mitochondria)
$\beta$ Family				
L-Serine dehydratase	LSerDHT	4.2.1.13	rat	<i>S. cerevisiae</i> , human
D-Serine dehydratase	DSerDHT	4.2.1.14	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> (biodegradative), <i>S. cerevisiae</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> (biosynthetic)
Threonine dehydratase	ThrDHT	4.2.1.16	<i>E. coli</i> (biosynthetic)	
Tryptophan synthase ( $\beta$ subunit or domain)	TrpSYN	4.2.1.20	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>Brevibacterium lactofermentum</i> , <i>Caulobacter crescentus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Halobacterium volcanii</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> , <i>Methanococcus voltae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Thermus aquaticus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Coprinus cinereus</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> ( $\beta$ -chain 1)
Threonine synthase	ThrSYN	4.2.99.2	<i>B. lactofermentum</i>	<i>B. subtilis</i>
Cysteine synthase (A and B)	CysSYN	4.2.99.8	<i>E. coli</i> (A)	<i>E. coli</i> (B)
$\gamma$ Family				
O-Succinylhomoserine (thiol)-lyase	CystSYN	4.2.99.9	<i>E. coli</i>	
O-Acetylhomoserine (thiol)-lyase	MetSYN	4.2.99.10	<i>S. cerevisiae</i>	
Cystathionine $\gamma$ -lyase	GCYSTAT	4.4.1.1	rat	
Cystathionine $\beta$ -lyase	BCASTAT	4.4.1.8	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>

Les EAPP de la famille  $\alpha$  agissent ainsi toutes sur le carbone  $\alpha$  du substrat aminé. On y retrouve donc les TA (représentées dans le tableau par la sérine-pyruvate-TA) qui



constituent les représentants les plus nombreux. Cette famille sera aussi appelée « famille de l'AspTA », cette dernière étant son premier et principal représentant. Il est important de noter que Mehta regroupe dans cette famille l'ensemble des TA, y compris celles du sous-groupe III malgré leurs différences évidentes avec celles des autres sous-groupes. Cette famille  $\alpha$  contient aussi d'autres transférases comme des méthyltransférases ou encore des ligases. La famille  $\beta$  compte des Ser- et Thr-déshydratases, ainsi que la sous-unité  $\beta$  de la tryptophane synthase, qui catalysent des réactions de  $\beta$ -élimination et de  $\beta$ -substitution. Enfin, la famille  $\gamma$  agit donc sur le  $C_\gamma$ , et regroupe par conséquent principalement des  $\gamma$ -lyases. Fait surprenant, Mehta y classe aussi quelques  $\beta$ -lyases dont la structure s'apparente plus aux enzymes de la famille  $\gamma$  que  $\beta$ . La dernière constatation que fait Mehta sur cette classification, concerne la proximité de séquence entre les familles  $\alpha$  et  $\gamma$ . Il émet alors l'hypothèse que les enzymes qui les composent puissent être rapprochées dans la classification, hypothèse qui sera confirmée par la suite, grâce à la détermination de la structure cristallographique de la cystathionine  $\beta$ -lyase.<sup>95</sup> Cette enzyme classée au sein de la famille  $\gamma$  a en effet révélé un type de repliement identique à celui des enzymes de la famille  $\alpha$ .<sup>87</sup>

Cette classification en familles ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) et en sous-groupes (I, II, III et IV) est toujours utilisée par certains chercheurs et il est possible de trouver quelques publications récentes en faisant mention. Elle est cependant, comme nous venons de le voir, assez peu précise, et ne sera donc pas utilisée dans ce manuscrit.

### **2.2.3.2 La classification selon Grishin**

Peu de temps après celle de Mehta, et notamment grâce à l'élucidation de la structure d'une D-AlaTA<sup>93</sup>, d'une BCAT<sup>96</sup> et d'une Ala-racémase, Grishin établit une seconde classification regroupant les TA et les EAPP qui est à la base de la classification communément utilisée aujourd'hui.<sup>71</sup> Grishin définit tout d'abord des types de repliement (fold-types) pour l'ensemble des EAPP. Les familles  $\alpha$  et  $\gamma$  sont ainsi regroupées dans le Fold-Type I (FT\_I). La famille  $\beta$  correspond au FT\_II. L'Ala-racémase est la seule représentante du FT\_III<sup>97</sup> et le Fold-Type IV, très différent des trois autres, est celui de la BCAT et de la D-AlaTA. L'AspTA, la Trp-synthase, l'Ala-racémase et la D-Ala-TA deviennent alors les représentants structuraux des FT\_I-IV. Grishin définit aussi trois autres Fold-Types (FT\_V-VII) comptant très peu de représentants. La Figure 9

donne une vision schématique de la structure protéique tridimensionnelle des 5 principaux FT.

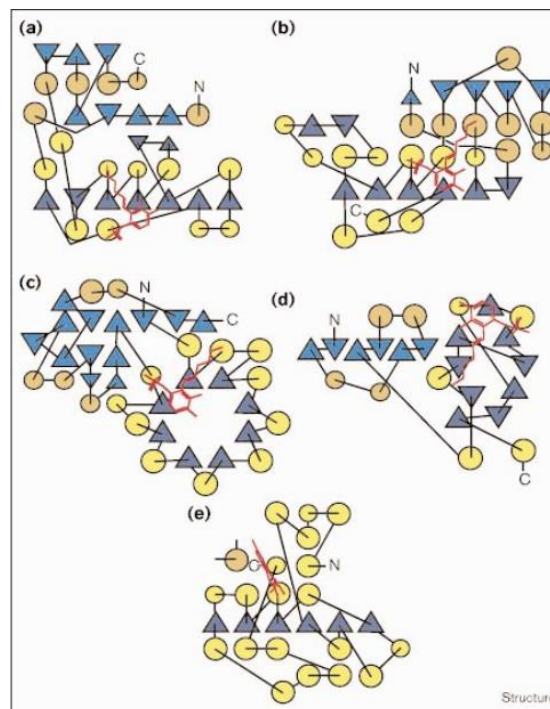


Figure 9 : Présentation des FT\_I-V des EAPP (respectivement (a)-(e)). Les triangles représentent les feuillets  $\beta$  et les ronds les hélices  $\alpha$ . Le PLP, lié au résidu lysine est représenté en rouge.<sup>98</sup>

Suite à cette première classification, les TA font donc partie du FT\_I, avec l'AspTA comme représentant, à l'exception de la D-Ala-TA et la BCTA qui appartiennent au FT\_IV. Les enzymes du FT\_I sont toutes actives sous la forme d'homodimères, même si certaines peuvent être composées de plus de sous-unités.<sup>87</sup> Chaque monomère est constitué en moyenne de 450 résidus et est composé de 2 domaines. Un grand domaine (Figure 9a, éléments jaunes et violets) situé au milieu de la chaîne peptidique, est constitué par l'enchaînement de 7 feuillets  $\beta$ , et un second domaine (Figure 9a, éléments oranges et bleus) de plus petite taille contient quant à lui les extrémités C- et N-terminales.<sup>98</sup> Le grand domaine est le lieu de fixation du PLP et le site actif est situé à l'interface formée par les deux grands domaines des deux monomères. Les TA du FT\_IV sont, elles aussi, actives sous la forme d'homodimères, mais chaque monomère n'est plus constitué que d'environ 250 résidus. L'organisation des domaines change aussi puisqu'ici, les enzymes possèdent un grand domaine C-terminal qui contient le site de fixation du PLP et un petit domaine N-terminal (Figure 9d).<sup>98</sup> Le nombre et l'agencement des éléments de structure secondaire composant les deux domaines sont en plus

radicalement différents de ceux du FT\_I. Cependant, et de manière très intéressante, la D-Ala-TA présente un site actif dont la structure est virtuellement l'image dans un miroir de celle des TA du FT\_I, traduisant un phénomène d'évolution convergente.<sup>93</sup> Dans le cas de la BCAT présentant le même FT que la D-Ala-TA, une inversion du mode de fixation du substrat explique la spécificité pour les L-aminoacides, comme dans le cas des TA de FT\_I (Figure 10).

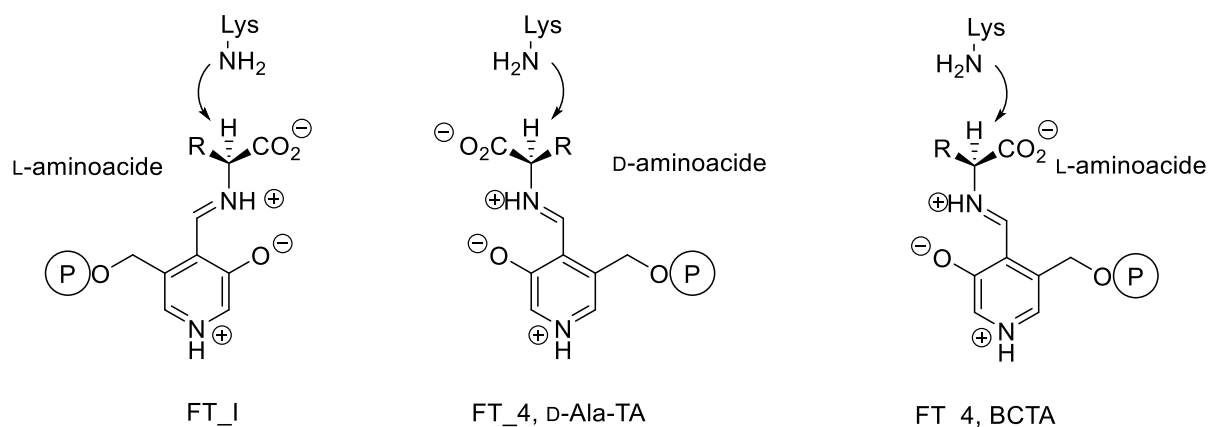


Figure 10 : Différents intermédiaires aldimines externes formés avec les TA de FT\_I et IV.

En plus de les regrouper selon les FT\_I et IV, Grishin propose une répartition des TA en 5 classes (C\_I-5), qui seront complétées plus tard par 2 classes supplémentaires (C\_VI et VII). La C\_IV regroupe l'ensemble des enzymes du FT\_IV, tandis que les TA de FT\_I se répartissent dans les autres classes. Le Tableau 4, résume les différentes classifications des TA.

Tableau 4 : Résumé des classifications des TA selon Grishin, Mehta et selon la spécificité de substrat.

Classification selon Grishin		Classification selon Mehta		Spécificité de substrats
Fold-Type	Classe	Famille	Sous-Groupe	Type
I	I/II	α	I	α-TA
	III		II	Amine-TA
IV	IV		III	α-TA
I	V		IV	α-TA
	VI/VII			Aminosucre-TA

Au sein du FT\_I, les classes I, II, III, et V diffèrent principalement par la structure et la disposition spatiale de leur extrémité N-terminale.<sup>98,99</sup> L'extrémité N-terminale peut d'ailleurs, dans certains cas, être en contact avec le site actif et être directement à l'origine de la spécificité de substrat.<sup>100</sup> Le site actif des TA de FT\_I peut d'autre part être divisé en 2 parties. La première, très conservée, correspond au site de liaison du groupement phosphate (phosphate binding cup, Figure 11) composé d'acides aminés établissant des liaisons hydrogène avec le groupement phosphate. Ce site est retrouvé presque à l'identique, chez les enzymes de la Classe IV (FT\_IV) et il est par ailleurs complété par un résidu Asp interagissant avec l'azote du noyau pyridine.<sup>100</sup>

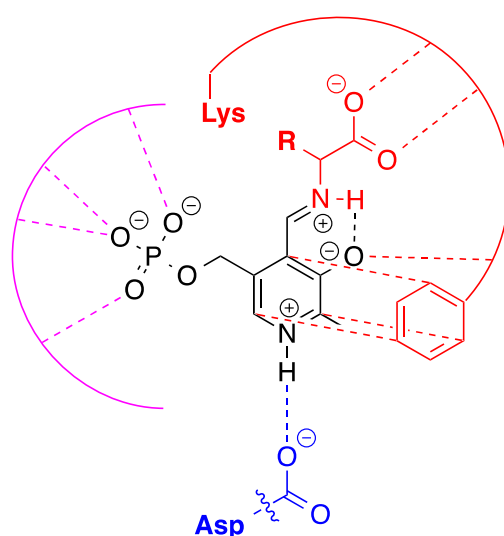


Figure 11 : Représentation générale du site actif des TA de Fold-Type I.

La seconde partie du site actif est en revanche très variable d'une classe à l'autre et au sein d'une même classe. Elle se situe à l'opposé de la partie conservée, par rapport au PLP, et définit le site de fixation des substrats (Figure 11, partie rouge). Cette poche contient aussi plusieurs résidus permettant une interaction spécifique avec le PLP. Parmi ceux-ci, un résidu aromatique situé sur la face *ré* du PLP assure une interaction de type «  $\pi$ -stacking ». Des résidus assurent aussi une interaction avec l'oxyanion du PLP. Un certain nombre de résidus variables interagissent avec les substrats et permettent notamment via des modifications de conformation d'assurer la liaison de différents types de substrat (*dual substrate recognition*). Cette « reconnaissance duale », qui est au cœur de la diversité des réactions de transamination, repose sur la présence de résidus flexibles au sein du site actif lui-même globalement plastique. Ainsi, un résidu Arg est fréquemment impliqué dans la liaison de substrats présentant un groupement

carboxylique et son groupement guanidinium s'écarte lorsqu'un autre substrat non carboxylé est lié dans le site actif. La Figure 12 illustre ce phénomène dans le cas de la GaBaTA qui stabilise dans son actif à la fois le Glu et le GaBa.<sup>100</sup> Le même type de phénomène est par ailleurs observé pour la plupart des TA qui acceptent à la fois le Glu et des acides aminés hydrophobes.

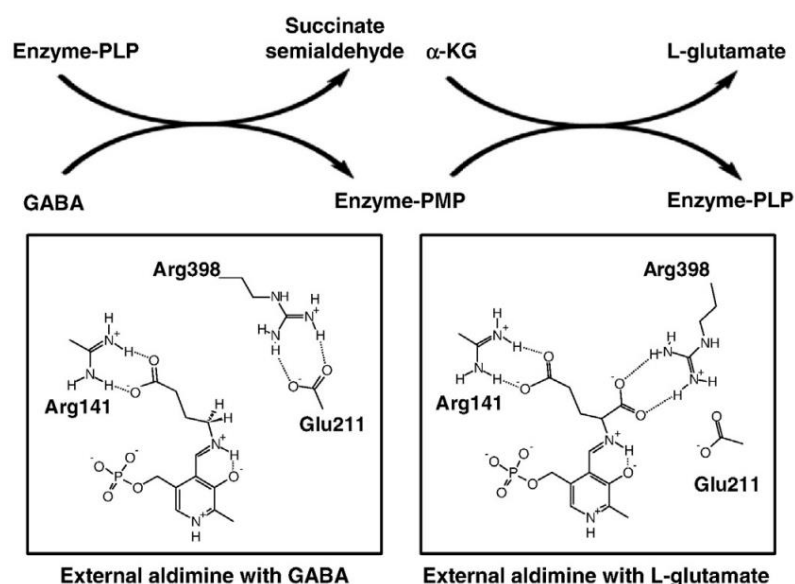


Figure 12 : Rôle d'un résidu Arg dans liaison du GaBa et du Glu par la GaBaTA.<sup>100</sup>

Cette structure générale du site actif se retrouve aussi chez les TA de FT\_IV, pour lesquelles la « reconnaissance duale » joue aussi un rôle essentiel. Les quatre grands types de sites actifs que l'on retrouve chez les TA au sein des Classes I-V sont présentés dans la Figure 13.

Si chaque TA a sa propre spécificité de substrat, on retrouve cependant des tendances au sein d'une même classe. Ainsi, la C\_I contient des  $\alpha$ -TA actives avec les aminoacides canoniques (Ala, Tyr, Asp, Gln, etc.). La C\_II, très proche de la C\_I et souvent associée à celle-ci, comprend des TA actives avec des aminoacides de type hydrophobe et aromatique. La C\_II comprend aussi des enzymes de type amine-TA catalysant le transfert d'amines dépourvues d'acide carboxylique en position  $\alpha$  comme l'histidinol-phosphate.

C'est cependant la C\_III qui regroupe la plupart des amine-TA (Tableau 5). Elle comprend ainsi aussi bien les  $\beta$ -TA, que les  $\omega$ -TA ou encore les amine-TA proprement dites.

La Classe V regroupe des  $\alpha$ -TA dont les substrats principaux sont Gly, Ala, Ser, ou encore la Phospho-sérine.

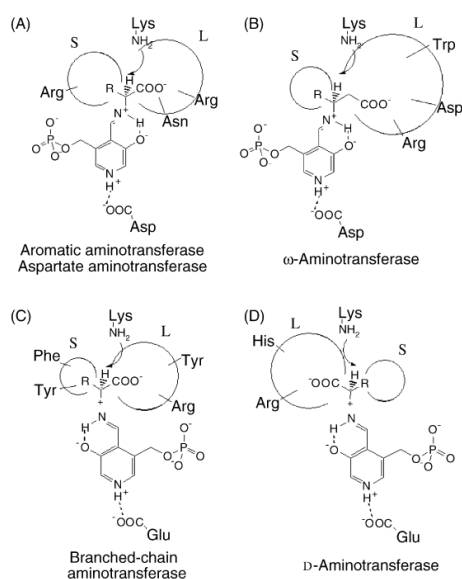


Figure 13 : Structures de site actif des TA. (A) Classes 1,2 et 5 (B) Classe III. (C) Classe IV, BCAT (D) Classe IV, D-TA.<sup>101</sup>

La C\_IV (FT\_IV) comprend, comme nous l'avons déjà évoqué, des D- $\alpha$ -TA à large spectre, des BCAT actives avec les L-aminoacides branchés hydrophobes mais aussi des (*R*)-amine-TA récemment découvertes.<sup>102</sup> Ces dernières catalysent des transaminations mettant en jeu des amines chirales avec une stéréosélectivité complémentaire à celle des TA de C\_III. Au vu de l'hétérogénéité des TA de la C\_IV, il est probable que cette classe soit, dans un futur proche, divisée en plusieurs sous-classes. Enfin, les deux nouvelles classes décrites depuis peu (C\_VI et VII), correspondent à des TA acceptant des substrats plus complexes et intervenant notamment dans la synthèse de composés de type aminosucre. Bien qu'encore peu étudiées, ces TA présentent un intérêt certain en biocatalyse.<sup>101</sup>

L'établissement de relations fiables entre la nature des résidus du site actif et le spectre de substrat constitue aujourd'hui un enjeu majeur dans le domaine de la biocatalyse.<sup>7</sup> Compte tenu de l'évolution des méthodes bioinformatiques, de nombreux progrès devraient être faits dans ce domaine dans un futur proche.

Pour conclure ce chapitre, le Tableau 5 résume la classification des principales TA décrites à ce jour, classification que nous avons utilisée dans notre travail et dans ce manuscrit.<sup>100</sup>

Tableau 5 : Classification des principales activités TA répertoriées à ce jour.

Fold-Type	Classe	Sous-Type	TA	Réaction type : donneur + accepteur	Type	
I	I/II	L- $\alpha$ -TA	AlaTA	Ala + KG	$\alpha$ -TA	
			AspTA	Asp + KG		
			AroTA	Aro + KG		
			PreTA	Préphénate + KG		
			AadTA	Amino adipate + KG		
			DapTA	Diaminopimélate + KG		
			KynTA	Kynurénine + KG		
			TyrTA	Tyr + KG		
	HisPTA	Histidinol-phosphate + KG	Amine-TA			
	I		$\beta$ -TA	$\beta$ -TA	$\beta$ -aminoacides + Pyr	Amine-TA
				$\beta$ -AlaTA	$\beta$ -Ala + Pyr	
				$\beta$ -PheTA	$\beta$ -Phe + Pyr	
				TaurTA	Taurine + Pyr	
		III	$\omega$ -TA	$\omega$ -TA	$\omega$ -aminoacides + Pyr	
				AcOrnTA	Acétylornithine + KG	
				Ala:GlyoxTA	Ala + Glyox	
				DaBaTA	Diaminobutyrate + KG	
				DaPaTA	Diaminopélargonate + ( <i>S</i> )-Adénosyl-L-méthylthio-2-oxobutanoate	
				Lys/DaPaTA	Diaminopélargonate + ( <i>S</i> )-2-Amino-6-oxohexanoate	
				GaBaTA	GaBa + KG	
				GSalTA	Glu-1-semialdéhyde + KG	
				ASalTA	Asp-1-semialdéhyde + KG	
				Lys- $\epsilon$ -TA	Lys + KG	
				OrnTA	Ornithine + KG	
				SucOrnTA	Succinylornithine + KG	
				( <i>S</i> )-AmineTA	( <i>S</i> )-Amines + Pyr	
FumTA				Fumosinin B <sub>1</sub> + Pyr		
NeaTA	Néamine + KG					
PutreTA	Putrescine + KG					
VanTA	Vanillylamine + Pyr					
	( <i>R</i> )-Amine-TA	( <i>R</i> )-AmineTA	( <i>R</i> )-Amines + Pyr	Amine-TA		
IV	IV	D- $\alpha$ -TA	D-AlaTA	D-Ala + KG	$\alpha$ -TA	
			D-AaTA	D-aminoacides + KG		
		L- $\alpha$ -TA	BCAT	L-Leu + KG		
I	V	L- $\alpha$ -TA	Ser:GlyoxTA	L-Ser + Glyox/KG	$\alpha$ -TA	
			PSerTA	L-Phospho-Ser + KG		
			Ala:GlyoxTA	L-Ala + Glyox/KG		
			UreGlyTA	Uréidoglycine + Glyox		
I	VI/VII	Sugar-TA	SugarTA	---	Sugar-TA	
			(ArnB/TylB/StsC)			
			GlnSugarTA	L-Gln + cétosucre		

Abbréviations autre qu'aminoacide canonique : Aa = Aminoacides, Aad = Amino adipate, AcOrn = Acétylornithine, Aro = Aminoacides aromatiques, ASal = Asp-1-semialdéhyde, BCAT = Branched chain aminoacids, DaBa = Diaminobutyrate, Dap = Diaminopimélate, DaPa = Diaminopélargonate, Fum = Fumosinin B<sub>1</sub>, GaBa =  $\gamma$ -Aminobutyrate, Glyox = glyoxylate, GSal = Glu-1-semialdéhyde, HisP = Histidinol-phosphate, KG = céto glutarate, Nea = Néamine, Orn = Ornithine, Pre = Préphénate, PSer = Phosphosérine, Putre = Putrescine, SucOrn = Succinylornithine, Taur = Taurine, UreGly = Uréidoglycine, Van = Vanillylamine.

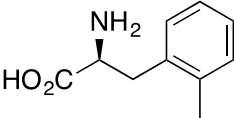
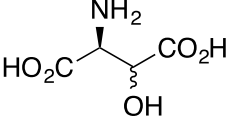
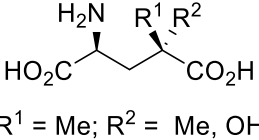
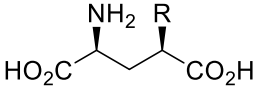
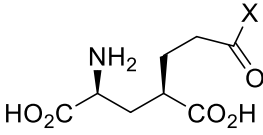
## 2.3 Spectre de substrats des transaminases

Comme nous venons de le voir, les TA acceptent une très grande variété de substrats aminés naturels. Il apparaît, de plus que les TA ne présentent généralement pas une haute spécificité vis-à-vis de leurs substrats naturels mais sont aussi capables de catalyser des réactions de transamination mettant en jeu divers analogues. Ces propriétés ont déjà été largement exploitées en biocatalyse pour accéder à une grande diversité d'acides aminés non naturels et d'amines chirales.

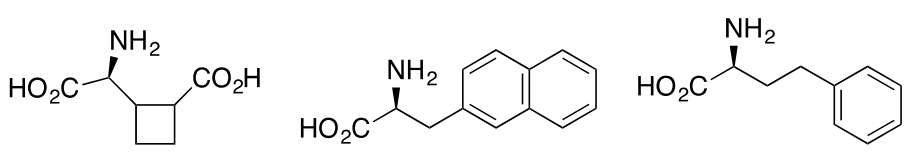
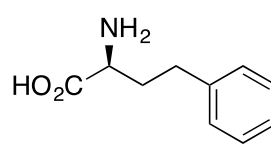
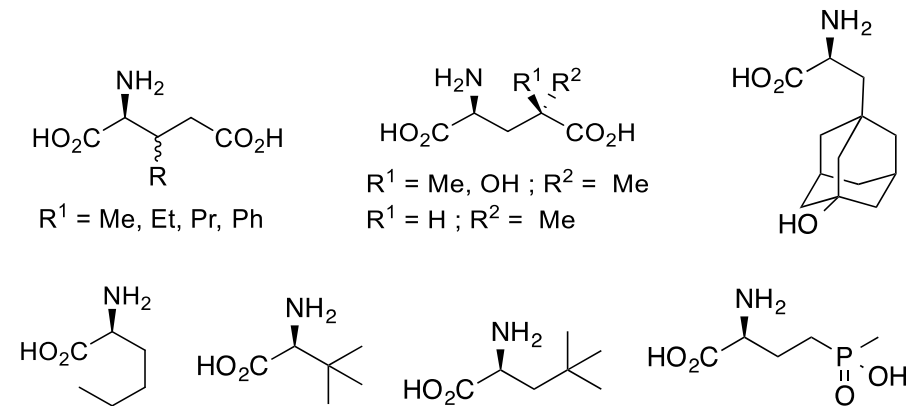
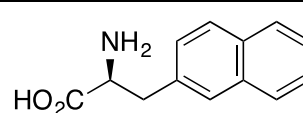
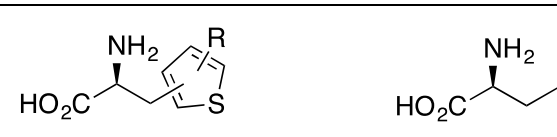
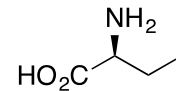
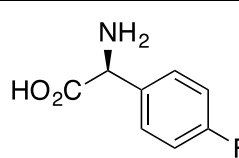
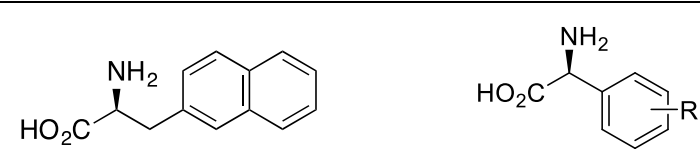
### 2.3.1 Spectre de substrats des $\alpha$ -TA

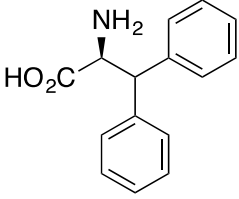

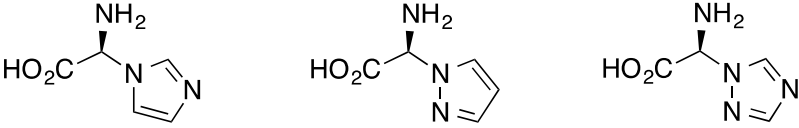
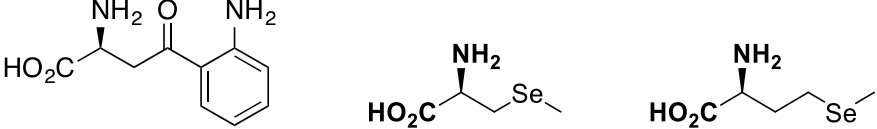
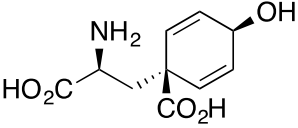
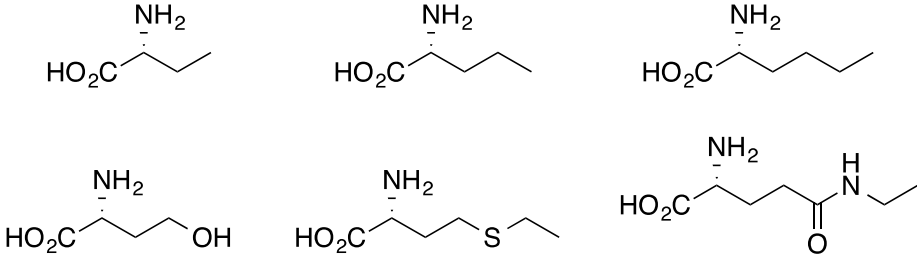
Comme nous l'avons évoqué, la variété des L- $\alpha$ -TA permet d'accéder à la plupart des acides aminés canoniques. De même, le large spectre de substrats des D- $\alpha$ -TA a permis d'accéder à plusieurs D-acides aminés naturels (D-Ala, D-Glu, D-Trp, D-Asp, D-Met, D-Asn, D-Phe, D-His, D-Leu).<sup>103</sup> Ces D-acides aminés ont en réalité été préparés avec une seule enzyme, la D-aaTA de *Bacillus sphaericus* qui a aussi permis d'accéder à de nombreux acides aminés non-naturels. De nombreuses  $\alpha$ -TA ont ainsi été utilisées pour la préparation d'acides aminés naturels à des fins agroalimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.<sup>13,104</sup> Cependant, leur potentiel synthétique a surtout été exploité pour la synthèse d'acides aminés non naturels, analogues des acides aminés canoniques, qui présentent un intérêt particulier dans le domaine pharmaceutique.<sup>105-109</sup> Le Tableau 6 dresse une liste non-exhaustive d'exemples d'applications synthétiques des  $\alpha$ -TA, incluant les travaux réalisés au laboratoire pour la synthèse d'analogues du Glu.<sup>106,107,109-112</sup>

Tableau 6 : Acides aminés rares ou non naturels préparés avec des  $\alpha$ -TA.

Biocatalyseur	L- ou D-aminoacides
<b>AspTA</b> <i>E. coli</i> ou cœur de porc 106,107,109,111,113-120	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  <p>R<sup>1</sup> = Me; R<sup>2</sup> = Me, OH</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>R = OH, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>OBn,            CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me,            Me, Et, Pr, Bu, Pn, iPr, iBu, IPn</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>X = OH, OMe,            NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub>,</p> </div> </div>



	
<b>AspTA modifiée</b> <i>E. coli</i> 105,121	
<b>BCAT</b> <i>E. coli</i> 110,122-125	 <p> <math>R^1 = \text{Me, Et, Pr, Ph}</math>  <math>R^1 = \text{Me, OH}; R^2 = \text{Me}</math>  <math>R^1 = \text{H}; R^2 = \text{Me}</math> </p>
<i>Thermococcus profundus</i> 126	
<b>TyrTA</b> <i>E. coli</i> 127,128	
<b>L-Ala-TA</b> <i>E. coli</i> 119	
<i>Pseudomonas sp.</i> <i>et Bacillus sp.</i> 129	
$\alpha$ -TA thermophiles 130	 <p> Mono-, di-, trisubstitué  <math>R = \text{Me, OH, OMe, F}</math> </p>

<b>AroTA modifiée</b> <i>E. coli</i> 131	
<b><math>\alpha</math>-TA</b> 132	
<b>AroTA</b> <i>E. coli</i> 133	
<b>KynTA</b> <i>Mammifère</i> 134	
<b>PrephenateTA</b> <i>Arabidopsis thaliana</i> 135,136	
<b>D-<math>\alpha</math>-TA</b> <i>Bacillus sphaericus</i> <i>Bacillus sp.</i> 103,137,138	

L'ensemble de ces synthèses a été mené à partir des  $\alpha$ -cétoacides correspondants et en présence d'un substrat donneur d'amine approprié : la plupart du temps un aminoacide comme Glu, Ala ou Asp. Dans presque tous les cas, afin d'atteindre un rendement acceptable, une stratégie de déplacement d'équilibre a été mise en place. Les différentes stratégies utilisées feront l'objet, ci-après d'un chapitre à part.

## 2.3.2 Spectre de substrats des amine-TA

La Figure 14 regroupe les principaux substrats naturels des amines-TA.

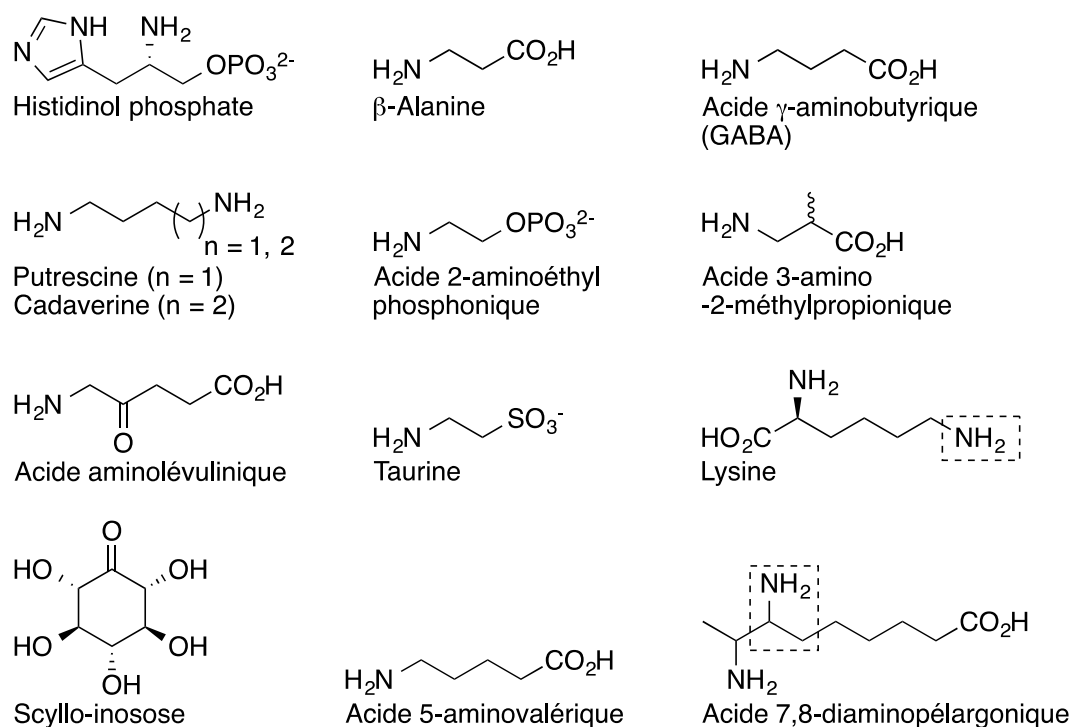
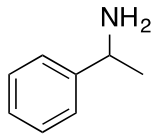
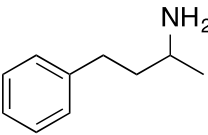
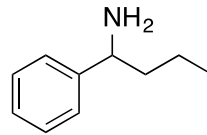


Figure 14 : Principaux substrats naturels des amine-TA.

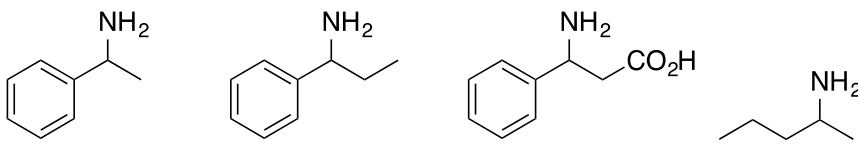
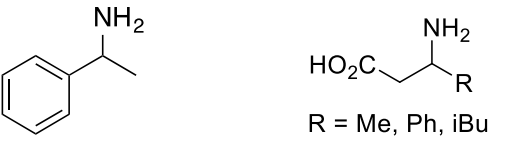
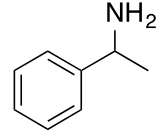
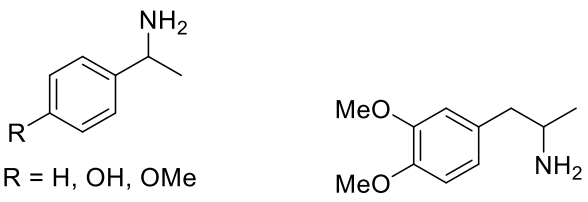
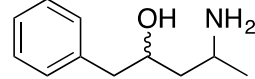
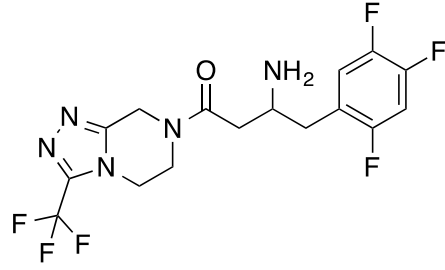
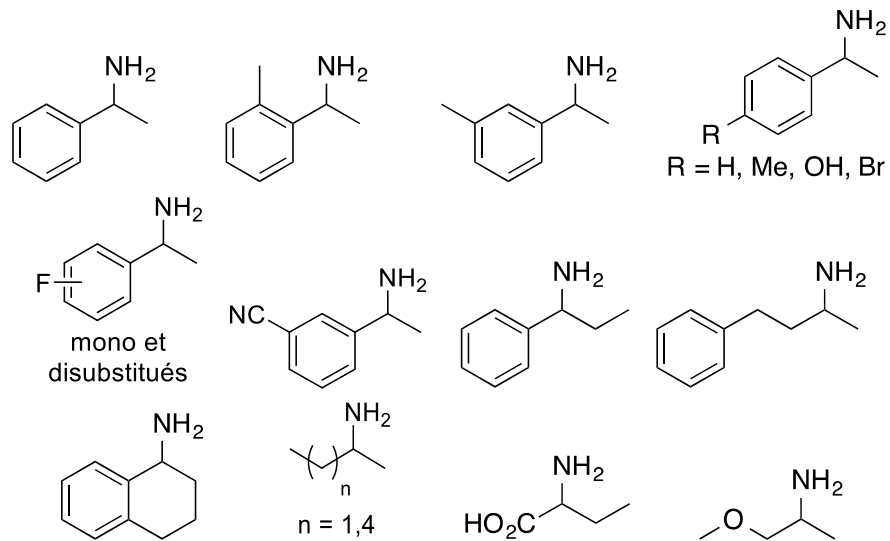
Diverses amines TA ont fait l'objet de nombreuses études visant à caractériser leur spectre de substrat et définir ainsi leurs potentialités en synthèse organique. Elles ont donné lieu à de très nombreuses applications pour la préparation de synthons chiraux ou bien de molécules plus complexes à visée thérapeutique comme la rivastigmine ou la sitagliptine que nous avons déjà évoquées.

Le Tableau 7 dresse une liste non exhaustive des amines chirales préparées en utilisant des amine-TA.<sup>6,37,139</sup>

Tableau 7 : Exemples d'amines chirales synthétisées à l'aide d'amine-TA.

<b>Amine-TA</b> <b>Organisme</b> Ref. Biblio <i>Stéréosélectivité</i>	Amine produite		
<b><i>Vibrio fluvialis</i></b> <b>sauvage et mutée</b> 6,140-142 <i>S/R</i>			

	<p> <chem>NCC(O)c1ccccc1</chem>    <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12</chem>    <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12O</chem>    <chem>Nc1ccc(C)cc1</chem>  <chem>RN1CCNC1</chem>    <chem>CCCCC(N)C</chem>    <chem>CC(C)CC(N)C</chem>  R = H, Bn, Boc, Z </p>
<b><i>Chromobacterium violaceum</i> DSM 30191</b> 6,143 <i>S</i>	<p> <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12</chem>    <chem>Nc1ccc(OC)c(O)c1</chem>    <chem>Nc1ccc(C)cc1</chem>    <chem>Nc1ccc(C)cc1</chem>  <chem>Nc1ccc(C)cc1</chem>    <chem>Nc1ccc(C)cc1</chem>    <chem>Nc1ccc(C)cc1</chem>    <chem>Nc1ccc(C)cc1</chem>  n = 2,3 </p>
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> 6 <i>S</i>	<p> <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12</chem>    <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12</chem>    <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12</chem>    <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12</chem> </p>
<b><i>Bacillus Megaterium</i> SC 6394</b> 6 <i>S</i>	<p> <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12</chem>    <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12</chem>    <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12</chem>    <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12</chem>  n = 1, 2, 5 </p>
<b><i>Alcaligenes denitrificans</i> Y2k-2</b> 6 <i>S</i>	<p> <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12</chem>    <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12</chem>    <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12</chem>    <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12</chem> </p>
<b><i>Arthrobacter citreus</i></b> 6 <i>S</i>	<p> <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12</chem>    <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12</chem>    <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12</chem>    <chem>Nc1c[nH]c2ccccc12</chem>  R = H, Br  R = H, OMe  n = 1, 2, 5 </p>

<p><i>Caulobacter crescentus</i> 6 S</p>	
<p><i>Mesorhizobium</i> sp. LUK 6 S</p>	
<p><i>Rhodobacter spaeroides</i> 6 S</p>	
<p><i>Arthrobacter</i> sp. KNK 168 6 R</p>	
<p>ATA-025 (Codexis) 143 R</p>	
<p>ATA-117 modifiée (Codexis) 5,140 R</p>	 <p style="text-align: right;">Sitagliptine</p>
<p><i>Mycobacterium vanbaalenii</i> 144 R</p>	 <p style="text-align: center;">mono et disubstitués</p>

À ce jour, le nombre d'amine-TA bien étudiées et utilisées en synthèse demeure relativement restreint. Comme cela apparaît dans le Tableau 7, le spectre de substrats des enzymes sauvages est souvent limité à des amines portant en position  $\alpha$  un substituant peu encombrant comme c'est le cas de la phényléthylamine (PEA) qui constitue un substrat de référence pour la plupart des amine-TA. Le développement d'un procédé de synthèse pour la sitagliptine qui présente deux substituants volumineux de part et d'autre de l'amine a ainsi nécessité un travail important d'ingénierie pour adapter l'enzyme à son substrat.

## 2.4 Limites des transaminases

Comme nous venons de le voir les TA permettent d'accéder à une grande variété d'acides aminés et d'amines chirales à partir des dérivés carbonyles correspondants. Les TA présentent donc un fort potentiel pour le développement de procédés industriels. Afin de pouvoir les utiliser, il faut cependant résoudre divers problèmes qui sont détaillés dans ce chapitre.

### 2.4.1 Problèmes d'inhibition

Le mécanisme multi-étapes des TA, l'existence de plusieurs intermédiaires réactionnels, et de plusieurs substrats et produits exposent les TA à divers types d'inhibition spécifiques de cette classe d'enzyme.<sup>37,145</sup> L'inhibition peut résulter de la formation d'un complexe covalent. C'est le cas lorsqu'un substrat accepteur carbonyle (ou un produit) se lie à la lysine responsable de la formation de l'aldimine interne. Bien que fréquente,<sup>146-148</sup> cette inhibition est généralement faible, car l'affinité des TA pour le PLP est presque toujours bien supérieure à celle pour les accepteurs carbonyles. Ce type d'inhibition est principalement observé en présence de dérivés carbonyles très réactifs et de faible poids moléculaire, en particulier avec les aldéhydes (acétaldéhyde, propanal, etc.).<sup>145</sup> Un complexe Enzyme-Inhibiteur covalent peut aussi se former lors de l'utilisation d'un donneur d'amine en mélange racémique. Dans ce cas, la fixation « du mauvais énantiomère » peut conduire à la formation d'un intermédiaire de type aldimine externe stable, qui ne pourra pas subir l'étape suivante de déprotonation à cause de l'orientation inadéquate de la liaison  $C_{\alpha}-H$ .<sup>149</sup> Ainsi, par exemple, la présence de (*R*)-PEA peut entraîner l'inhibition des (*S*)-amine-TA.<sup>145</sup>

L'inhibition des TA peut aussi résulter de la formation de complexes non covalents par la fixation d'un substrat (ou produit) à un stade inopportun du mécanisme réactionnel. Ainsi une inhibition peut être liée à la fixation d'un substrat carbonyle sur le complexe E-PLP (aldimine interne) ou bien d'un substrat aminé sur le complexe E-PMP. Ce type d'inhibition compétitive peut être parfois assez marqué, en particulier pour les enzymes à large spectre de substrat. Le Schéma 28 résume les principaux types d'inhibition des TA par les substrats ou les produits.

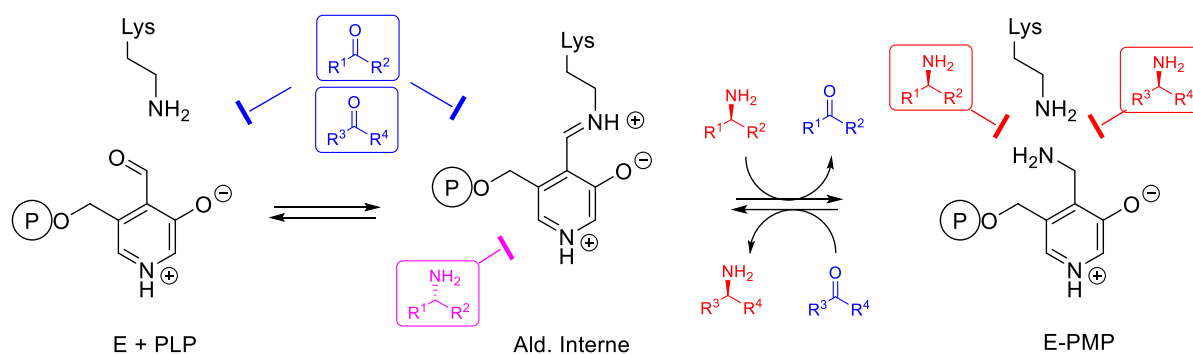


Schéma 28 : Principaux types d'inhibition par les substrats/produits de la réaction de transamination.

Ces différents types d'inhibition sont essentiellement observés à forte concentration et pose donc des problèmes pour le développement de procédés nécessitant des productivités élevées. L'addition progressive des substrats ou bien l'élimination des produits sera ainsi parfois nécessaire pour limiter l'inhibition des TA.

## 2.4.2 Réversibilité de la transamination

Comme nous l'avons évoqué, précédemment la réaction de transamination est réversible et la prise en compte de la constante d'équilibre ( $K_{eq}$ ) est indispensable lors du développement d'un procédé de synthèse. Bien qu'il existe des approches théoriques pour l'évaluation des  $K_{eq}$ <sup>150,151</sup> ces dernières sont apparues peu adaptées dans le cas des réactions de transaminations qui mettent en jeu des composés ioniques en solution aqueuse. Diverses approches expérimentales ont été mises en œuvre pour estimer de façon fiable la constante d'équilibre de nombreuses réactions catalysées par des TA. Globalement, les  $K_{eq}$  des réactions mettant en jeu les substrats naturels des  $\alpha$ -TA ( $\alpha$ -aminoacides et  $\alpha$ -cétoacides) sont bien renseignées<sup>152-154</sup> et sont souvent proche de 1 en raison de la similitude entre substrats et produits. Des valeurs de  $K_{eq}$  beaucoup plus variables ont été déterminées dans le cas des réactions catalysées par les amine-TA.<sup>155-</sup>

157 Le Tableau 8 regroupe des valeurs de  $K_{eq}$  de plusieurs réactions catalysées par des amines TA.<sup>155</sup>

Tableau 8 : Constantes d'équilibre de réactions catalysées par des amines-TA.

	Réaction de transamination	$K_{eq}$ estimé
1	<chem>CC(N)Cc1ccccc1.CC(=O)C(=O)O&gt;&gt;CC(=O)c1ccccc1.CC(N)C(=O)O</chem>	24800
2	<chem>CC(N)Cc1ccccc1.CC(=O)C&gt;&gt;CC(=O)c1ccccc1.CC(N)C</chem>	30
3	<chem>CC(N)CCc1ccccc1.CC(=O)C(=O)O&gt;&gt;CC(=O)CCc1ccccc1.CC(N)C(=O)O</chem>	1647
4	<chem>CC(N)CCc1ccccc1.CC(=O)C&gt;&gt;CC(=O)CCc1ccccc1.CC(N)C</chem>	1,4
5	<chem>CC(N)CCc1ccccc1.C1CCC(CC1)=O&gt;&gt;CC(=O)CCc1ccccc1.NC1CCCCC1</chem>	26,6
6	<chem>CC(N)CCc1ccccc1.CCC=O&gt;&gt;CC(=O)CCc1ccccc1.CCN</chem>	7954

L'analyse des valeurs reportées dans le Tableau 8 permet d'énoncer quelques généralités. Les réactions mettant en jeu le pyruvate possèdent des constantes d'équilibre élevées (entrées 1 et 3) et l'on peut donc qualifier le pyruvate de bon substrat accepteur. Inversement, les réactions mettant en jeu l'Ala sont donc thermodynamiquement peu favorables et on peut donc considérer Ala comme un mauvais substrat donneur pour convertir des cétones en amines chirales. L'analyse des entrées 1 et 2 montre par ailleurs que la PEA est un bon substrat donneur pour convertir des cétones en amines chirales. Ceci est principalement dû à la formation de l'acétophénone, stabilisée par conjugaison. On retrouve des constantes plus proches de l'unité dans des réactions mettant en jeu des dialkyl cétones et  $\alpha$ -dialkylamines (entrées 4 et 5). Enfin, on peut constater que le propanal apparaît comme un bon substrat accepteur, ce qui laisse penser que la propyl-1-amine n'est pas un bon donneur d'amine.



La détermination des  $K_{eq}$  d'un plus grand nombre de réactions est souhaitable car elle devrait permettre à l'avenir de choisir le substrat donneur d'amine de façon plus pertinente et d'optimiser les conditions réactionnelles afin d'assurer un bon rendement en amine chirale. Cependant, dans la plupart des cas, il demeure nécessaire de mettre en place une stratégie de déplacement d'équilibre pour mener à bien la synthèse d'une amine chirale par transamination.

## **2.5 Stratégies de déplacement d'équilibre des réactions de transamination**

Le déplacement d'équilibre d'une réaction de transamination peut être obtenu en utilisant un excès d'un des 2 substrats ou bien en éliminant au moins un produit du milieu réactionnel par des procédés physico-chimiques. Alternativement, le co-produit formé à partir du donneur d'amine peut être transformé de façon spontanée ou via des réactions auxiliaires.

### **2.5.1 Utilisation d'un excès de substrat donneur ou élimination d'un produit**

Une première possibilité pour déplacer l'équilibre consiste à utiliser un excès de substrat donneur. Cette technique est communément utilisée. Cependant, elle n'est pas intéressante du point de vue de « l'économie d'atomes ». Elle peut en plus poser des problèmes d'inhibition liée à l'excès de substrat ainsi qu'au niveau de la purification du produit aminé qui peut avoir des propriétés physico-chimiques semblables à celles du substrat donneur. Cette approche n'est pour finir réellement efficace que pour des réactions dont le  $K_{eq}$  est proche de 1. En effet, si l'on examine l'excès de substrat donneur nécessaire pour atteindre 90 % de conversion en fonction du  $K_{eq}$  (Figure 15), on constate que pour une valeur de  $K_{eq}$  très inférieure à 1, l'excès de substrat nécessaire devient inapplicable.<sup>158</sup> Ainsi, avec  $K_{eq} = 1$ , ce qui est souvent le cas avec les  $\alpha$ -TA, un excès de 10 fois en substrat donneur est suffisant. Par contre, dans le cas où  $K_{eq} = 10^{-3}$ , un excès de 10000 fois est nécessaire pour l'obtention du même taux de conversion de 90 %.

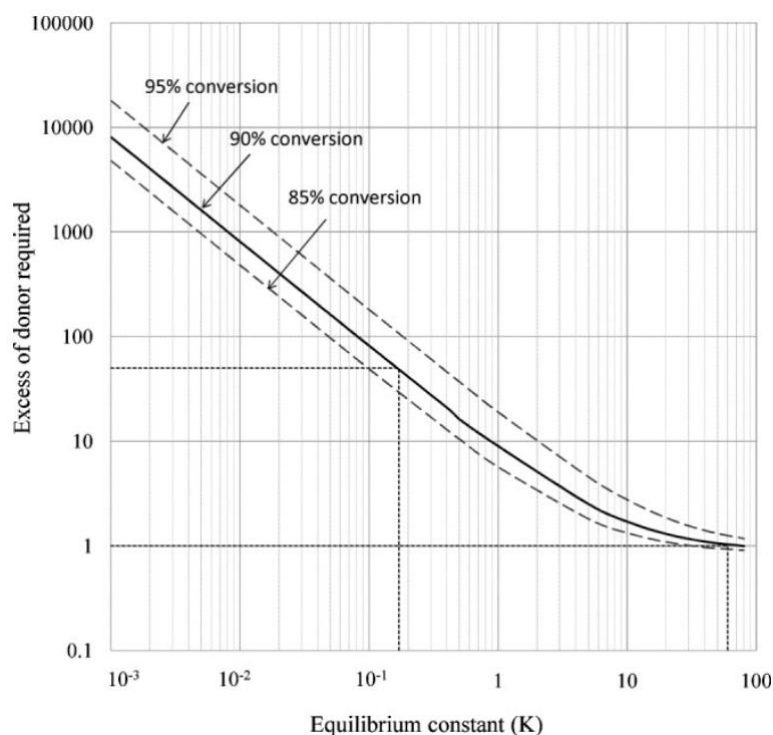


Figure 15 : Relation entre la valeur de  $K_{eq}$  et l'excès de donneur requis pour atteindre 90 % de conversion.<sup>158</sup>

L'élimination continue d'un (ou des deux) produit du milieu réactionnel constitue une alternative pour déplacer l'équilibre. Cette approche présente l'avantage de limiter les phénomènes d'inhibition par les produits. Cette élimination « physique » peut se faire par évaporation dans le cas d'un produit volatil ou par précipitation ou extraction dans le cas d'un produit hydrophobe. L'applicabilité de cette approche est bien sûr liée aux propriétés physico-chimiques des produits de la transamination.<sup>159</sup> Une précipitation sélective peut être observée dans le cas d'acides aminés hydrophobes : alors que le caractère anionique du cétoacide substrat, lui assure une certaine solubilité en phase aqueuse, l'acide aminé produit est zwitterionique, moins soluble et peut donc précipiter à faible concentration. C'est par exemple le cas de l'homophénylalanine (HPhe) qui a une solubilité < 2 mM à pH neutre. Sa précipitation participe donc au déplacement d'équilibre de la réaction de transamination.<sup>105</sup> L'extraction sélective en milieu biphasique d'un produit de la réaction de transamination a aussi pu être menée à bien dans plusieurs cas. Ainsi, la PEA formée à partir de l'acétophénone a pu être sélectivement adsorbée sur une résine échangeuse de cation en présence d'Ala utilisée comme donneur d'amine. L'Ala est zwitterionique à pH neutre et ne s'adsorbe donc pas sur la résine. Ainsi, en utilisant un rapport de 4:1 massique entre la résine et le substrat

(50 g/L), l'inhibition provoquée par la PEA a été diminuée de moitié. L'utilisation de cette approche couplée à l'élimination simultanée du pyruvate formé à partir de l'Ala a permis d'obtenir un rendement supérieur à 90 %.<sup>160</sup> Par ailleurs, l'utilisation de solvants organiques ou de résines hydrophobes peuvent permettre d'extraire sélectivement des dérivés carbonylés hydrophobes formés à partir d'amines dans des réactions de dédoublement cinétique. Ainsi l'extraction de l'acétophénone lors du dédoublement de la PEA (0,5 M) réalisée avec du pyruvate comme accepteur a permis de limiter les phénomènes d'inhibition et d'isoler l'énantiomère de configuration *R* avec un ee > 95 %.<sup>161</sup> L'utilisation d'un réacteur à membrane séparant les deux phases et l'utilisation de cellules encapsulées a par ailleurs permis d'améliorer le procédé.<sup>162</sup>

Il est enfin possible d'éliminer des coproduits volatils formés à partir de substrats donneurs de faible poids moléculaire. Ainsi l'utilisation d'isopropylamine (IPA) comme donneur permet d'obtenir un déplacement d'équilibre via l'élimination sous pression réduite de l'acétone formée par transamination. C'est cette approche qui a notamment été utilisée dans le procédé de synthèse de la sitagliptine que nous avons déjà évoqué en introduction. (Schéma 29).<sup>5</sup>

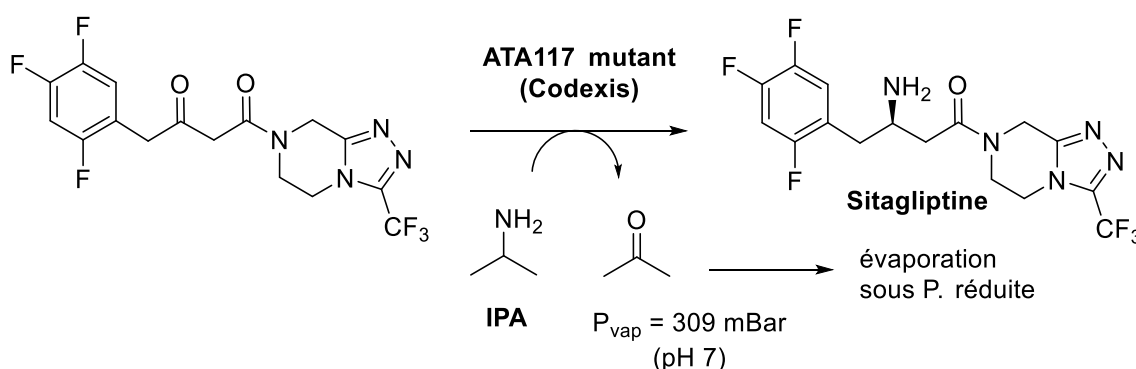


Schéma 29 : Synthèse de la sitagliptine utilisant l'isopropylamine comme donneur d'amine.

Dans ce cas, la TA (ATA-117 de Codexis) a été optimisée par évolution dirigée pour accepter en plus de la prositagliptine, des concentrations élevées en IPA. Bien que cette approche soit très intéressante, peu d'amine-TA acceptant l'IPA comme donneur ont été décrites à ce jour.

## 2.5.2 Transformation du co-produit carbonyle

Le déplacement d'équilibre de la réaction de transamination peut être obtenu via une réaction auxiliaire transformant un des produits de la réaction. Cette transformation peut être spontanée dans le cas d'un produit instable, ou bien elle peut être catalysée, par une ou plusieurs enzymes dans des procédés de type cascades.

### 2.5.2.1 Transformation spontanée d'un co-produit instable

Dans la plupart des cas, le produit transformé est le co-produit carbonyle formé à partir du substrat donneur d'amine. Dans le cadre des applications des  $\alpha$ -TA, plusieurs aminoacides utilisés comme donneur donnent lieu à la formation d'un cétoacide instable.

Le plus utilisé est sans doute l'Asp qui est converti par transamination en oxaloacétate (OA). Ce dernier est un  $\beta$ -cétoacide, qui peut donc se décarboxyler spontanément en produisant du pyruvate (Pyr) (Schéma 30). Cette décarboxylation est lente à pH neutre, mais elle peut-être catalysée par des cations métalliques ( $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ )<sup>163</sup> ou par des enzymes possédant une activité OA-décarboxylase.<sup>132</sup> Ainsi, si le Pyr n'est pas substrat de la TA, la décarboxylation de l'OA permet de convertir de façon quantitative un cétoacide accepteur en L-aminoacide. Cette stratégie de déplacement d'équilibre a permis de préparer plusieurs aminoacides aromatiques (Phe, Tyr, HPhe), avec l'AspTA ou l'AroTA d'*E.coli*, ou encore des L-aminoacides non naturels analogues de HPhe (Schéma 30).<sup>164</sup>

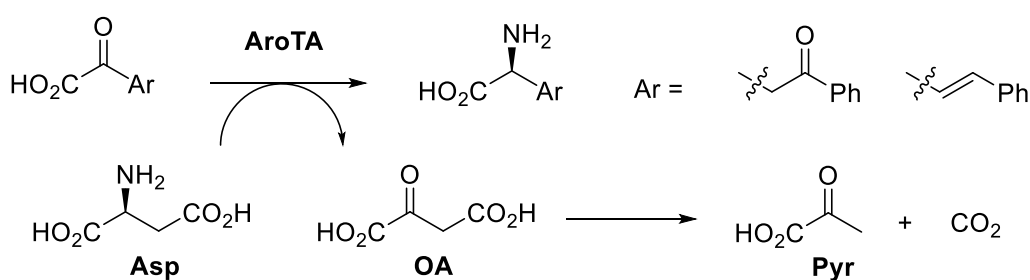


Schéma 30 : Exemple de synthèse de L-aminoacides en utilisant l'Asp comme donneur.<sup>164</sup>

Dans le cas où le Pyr est substrat de la TA, il est possible de le transformer en utilisant diverses enzymes dans des procédés de type cascade que nous évoquerons dans le prochain chapitre. Une variante de cette stratégie de déplacement d'équilibre est basée sur l'utilisation de l'acide cystéine sulfinique (ACS) comme substrat donneur

d'amine. Ce produit d'oxydation de la cystéine est transformé lors de la transamination en un acide  $\beta$ -céto-sulfonique très instable qui se décompose instantanément en milieu aqueux en produisant du Pyr et du  $\text{SO}_2$ , lui-même rapidement hydraté en sulfites. Ce procédé a été largement utilisé au laboratoire pour la synthèse d'un grand nombre d'analogues du Glu avec l'AspTA de cœur de porc ou d'*E. coli*. De nombreux dérivés substitués en position 4 et de configuration *L-syn* ont notamment été préparés et étudiés pour leur action sélective vis-à-vis des récepteurs et transporteurs du système glutamatergique (Schéma 31).<sup>107,110-112,118</sup> Dans ce cas, la TA a permis d'accéder aux aminoacides de série L via la désymétrisation de la fonction cétone, mais aussi d'obtenir le dédoublement cinétique du cétoacide accepteur préparé sous sa forme racémique.

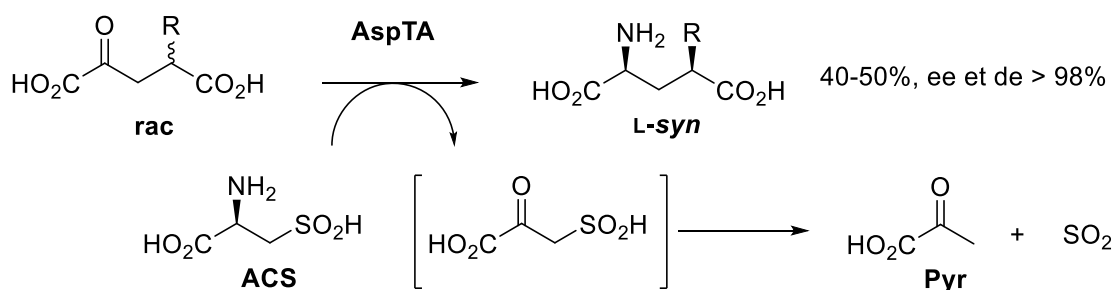


Schéma 31 : Synthèse d'analogues du Glu avec l'AspTA d'*E. coli* et l'ACS comme donneur.

Parmi les autres aminoacides donneurs permettant de déplacer l'équilibre, on trouve aussi la lysine (Lys). Dans ce cas, le cétoacide formé par transamination se cyclise pour produire un iminoacide relativement stable. Cette stratégie a été mise en œuvre pour la synthèse de la L-HPhe avec une AspTA d'*E. coli* modifiée par mutagenèse pour accepter l'acide 4-phényl-2-oxobutanoïque (OPBA) et la Lys (Schéma 32).<sup>105</sup> Cette cyclisation et la précipitation de la L-HPhe ont ainsi permis d'obtenir un excellent rendement.

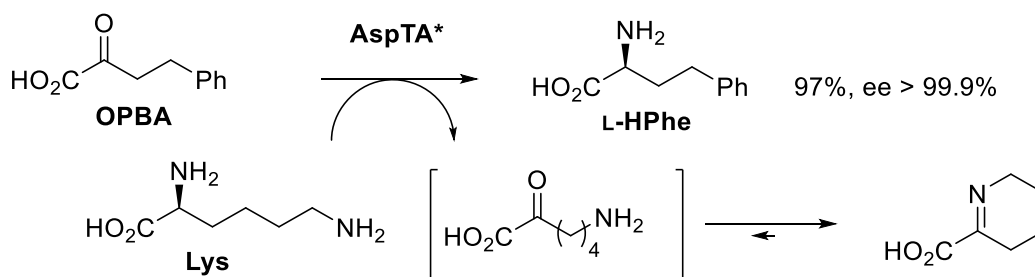


Schéma 32 : Synthèse de la L-HPhe avec une AspTA modifiée et la Lys comme donneur.

Comme nous en verrons un exemple par la suite, le même type de cyclisation peut être obtenu lorsque la Lys ou l'ornithine (Orn) est utilisée comme donneur avec une  $\omega$ -TA (Schéma 33).

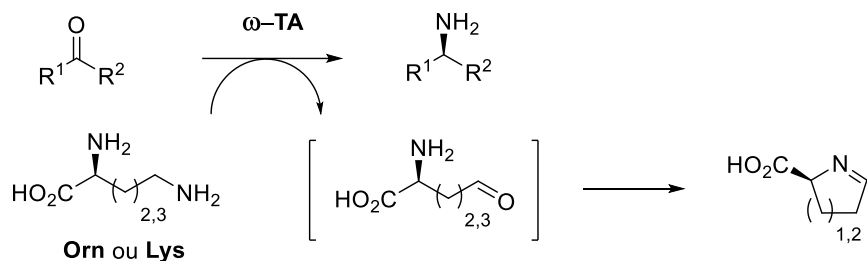


Schéma 33 : Utilisation de l'Orn ou de la Lys comme donneur avec une  $\omega$ -TA.

Plusieurs « donneurs irréversibles » qui ne sont pas des aminoacides ont également été développés pour déplacer l'équilibre de transaminations catalysées par des amine-TA. Il a été ainsi montré que la 1,2-phénylènediméthanamine (PDMA) était un substrat pour plusieurs de ces enzymes et conduisait à un intermédiaire bicyclique qui polymérise.<sup>165</sup> L'utilisation de PDMA comme donneur a ainsi permis la préparation de plusieurs amines chirales avec d'excellents rendements et ee (> 99 %), comme par exemple la (*S*)-1-(4-fluorophényl)propan-2-amine (Schéma 34).

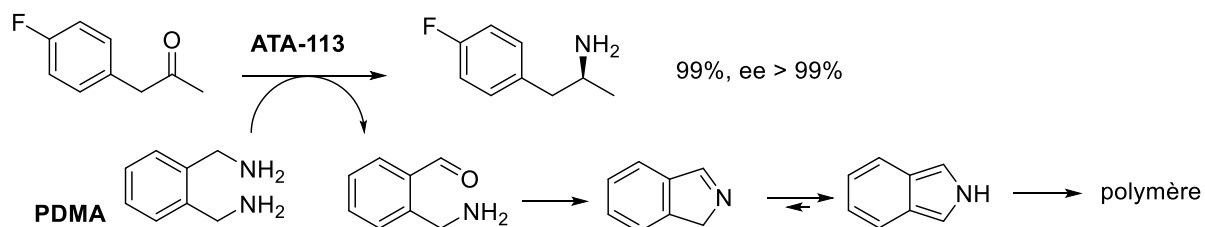


Schéma 34 : Exemple de synthèse d'une amine chirale avec l'ATA-113 (codexis) et la PDMA.

L'utilisation d'un amino-cyclohexadiène a par ailleurs permis d'obtenir un déplacement d'équilibre via la formation très favorable d'un phénol au cours de la transamination catalysée par une amine-TA (Schéma 35).<sup>166</sup> Plusieurs analogues de la PEA ont ainsi été préparés avec plusieurs amine-TA et avec des rendements supérieurs à 99 % dans la majorité des cas.

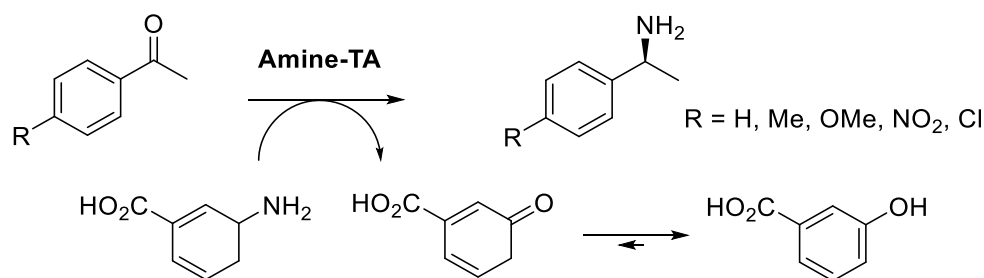


Schéma 35 : Utilisation d'un aminocyclohexadiène comme donneur irréversible.

Enfin, dans quelques cas, le déplacement d'équilibre repose sur une transformation spontanée du produit aminé de la réaction de transamination. Ainsi, l'ainoester formé à partir de l'acide 5-oxocaproïque se lactamise spontanément à l'issue de la réaction de transamination. Cette cyclisation, combinée à l'utilisation d'IPA comme donneur d'amine a permis de préparer la (*R*)- ou (*S*)-6-méthyl-2-pipéridone avec des rendements et des ee > 99 % (Schéma 36).<sup>160</sup>

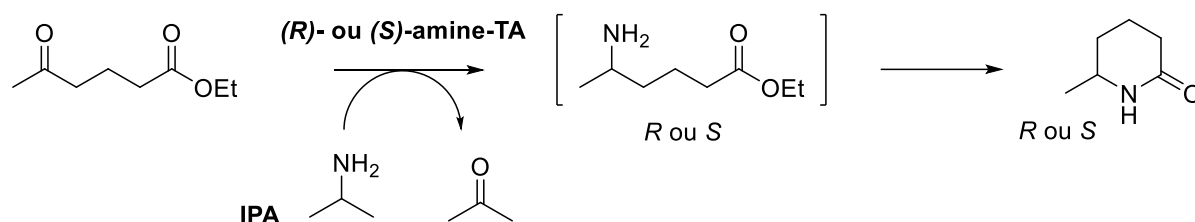


Schéma 36 : Exemple de déplacement d'équilibre par lactamisation du produit aminé.

Des réactions de transamination régiosélective mettant en jeu des  $\delta$ -dicétones conduisent également à des imines cycliques dont la réduction diastéréosélective à ensuite permis d'accéder à divers stéréoisomères de plusieurs pipéridines 2,6-disubstituées. (Schéma 37).<sup>167,168</sup>

Malgré leur intérêt, ces différentes approches ne sont applicables qu'avec un nombre limité de TA qui acceptent ces substrats particuliers conduisant à des produits instables. C'est pourquoi de nombreux travaux ont par ailleurs porté sur l'utilisation d'enzymes auxiliaires pour catalyser la transformation de produits carbonylés formés à partir de donneurs plus classiques des TA, en particulier le Glu et l'Ala.

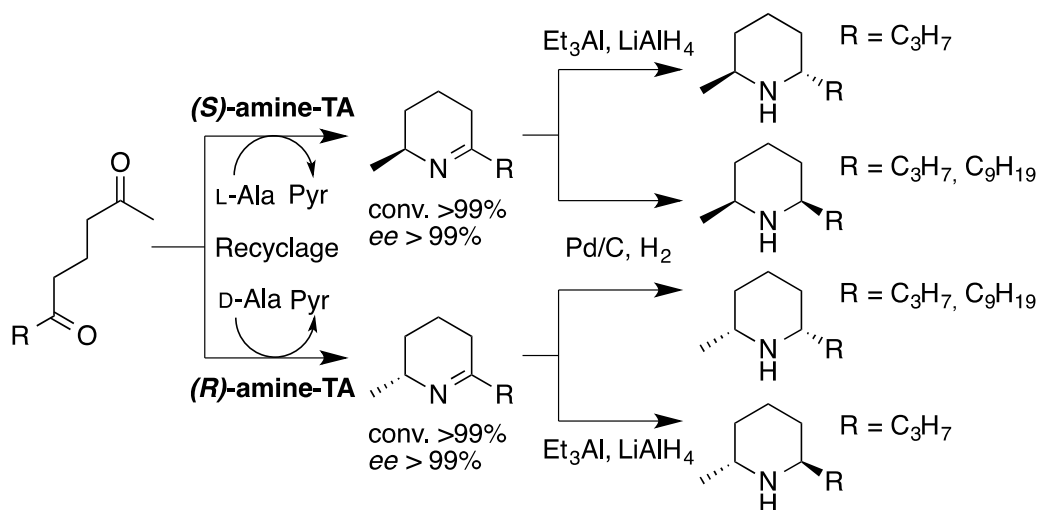


Schéma 37 : Déplacement d'équilibre par cyclisation de produits de type  $\delta$ -aminocétone.

### 2.5.2.2 Mise en place de cascades enzymatiques

Deux types de cascades peuvent être mises en place pour déplacer l'équilibre des réactions de transamination. Dans des cascades orthogonales, le co-produit carbonyle peut être transformé en un nouveau produit par réduction, décarboxylation, ou encore via une transamination auxiliaire. Par ailleurs des cascades parallèles permettent de régénérer le donneur d'amine via des réactions auxiliaires d'amination réductrice ou de transamination (Schéma 38).

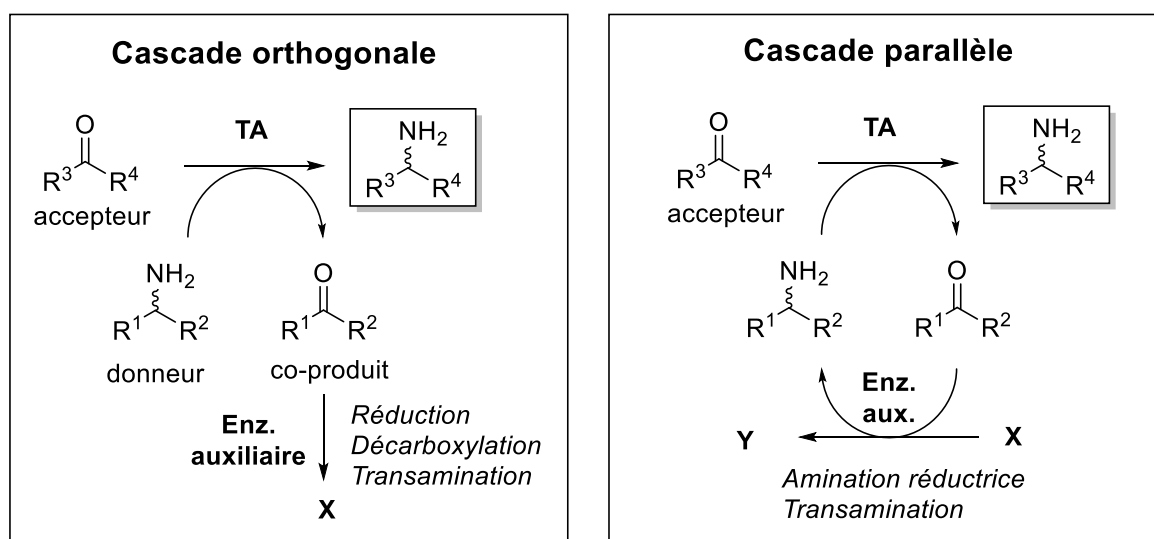


Schéma 38 : Cascades enzymatiques pour le déplacement d'équilibre des transaminations.



### 2.5.2.2.1 Exemples de cascades orthogonales

Dans la plupart des cas, il s'agit de la transformation du Pyr formé directement à partir de l'Ala utilisé comme donneur avec des  $\alpha$ - ou des amines-TA ou bien formé par décarboxylation de l'OA lorsque l'Asp est utilisé comme donneur avec des  $\alpha$ -TA.

La réduction du Pyr en acide lactique catalysée par la lactate déshydrogénase (LDH) constitue une première approche. Ainsi la combinaison de la LDH avec des cellules entières de *Vibrio fluvialis* exprimant une amine-TA a permis de préparer la (S)-PEA avec un rendement supérieur à 90 %, en dépit d'une  $K_{eq}$  très défavorable (Schéma 39).<sup>169</sup>

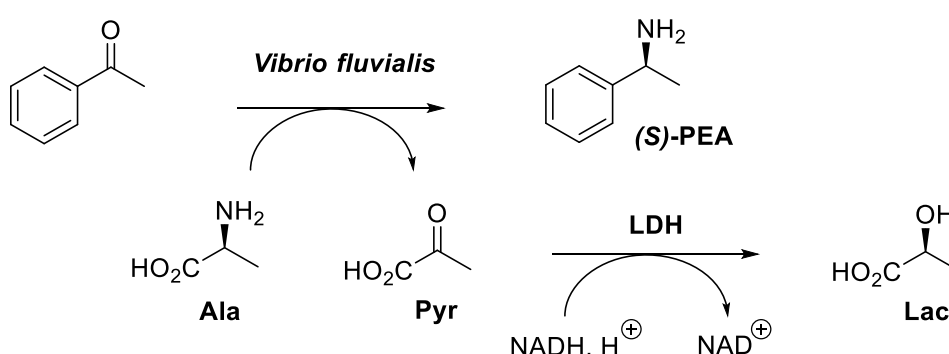


Schéma 39 : Utilisation de la LDH pour déplacer l'équilibre d'une transamination.

Dans cette réaction, réalisée à petite échelle, le NADH nécessaire pour la réduction était issu des cellules et régénéré via des réactions d'oxydation mettant en jeu des enzymes et des substrats présents dans les cellules. Plus généralement, la mise en place de système de régénération des cofacteurs d'oxydoréduction s'avère nécessaire. La régénération du NADH est communément obtenue en utilisant la formate déshydrogénase (FDH) ou bien la glucose déshydrogénase (GDH) qui catalysent des réactions d'oxydation avec le NAD<sup>+</sup> qui sont fortement déplacées vers les produits (Schéma 40). L'acide formique est ainsi oxydé en CO<sub>2</sub> et le glucose en gluconolactone. L'hydrolyse spontanée de cette dernière en acide gluconique assure l'irréversibilité du processus.

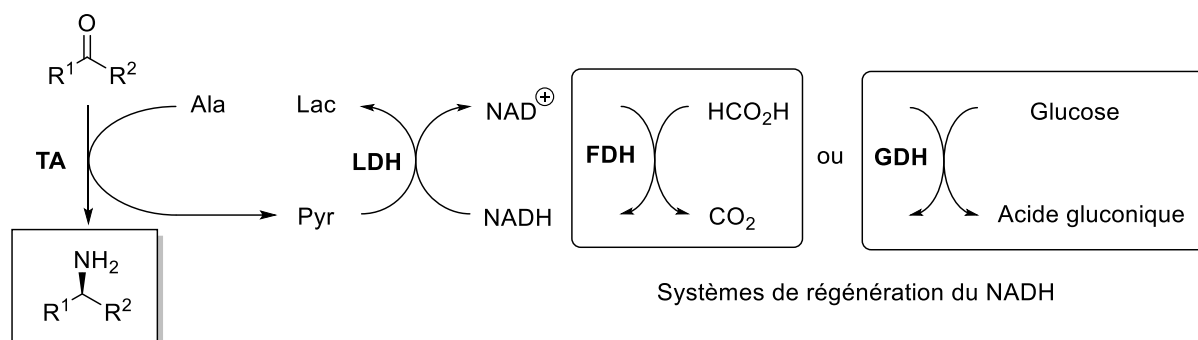


Schéma 40 : Utilisation de la FDH ou GDH pour régénérer le NADH.

L'utilisation de ces cascades tri-enzymatiques avec différentes amine-TA a ainsi permis de préparer avec d'excellents rendements diverses amines chirales dont quelques exemples sont présentés dans la Figure 16.<sup>170-174</sup>

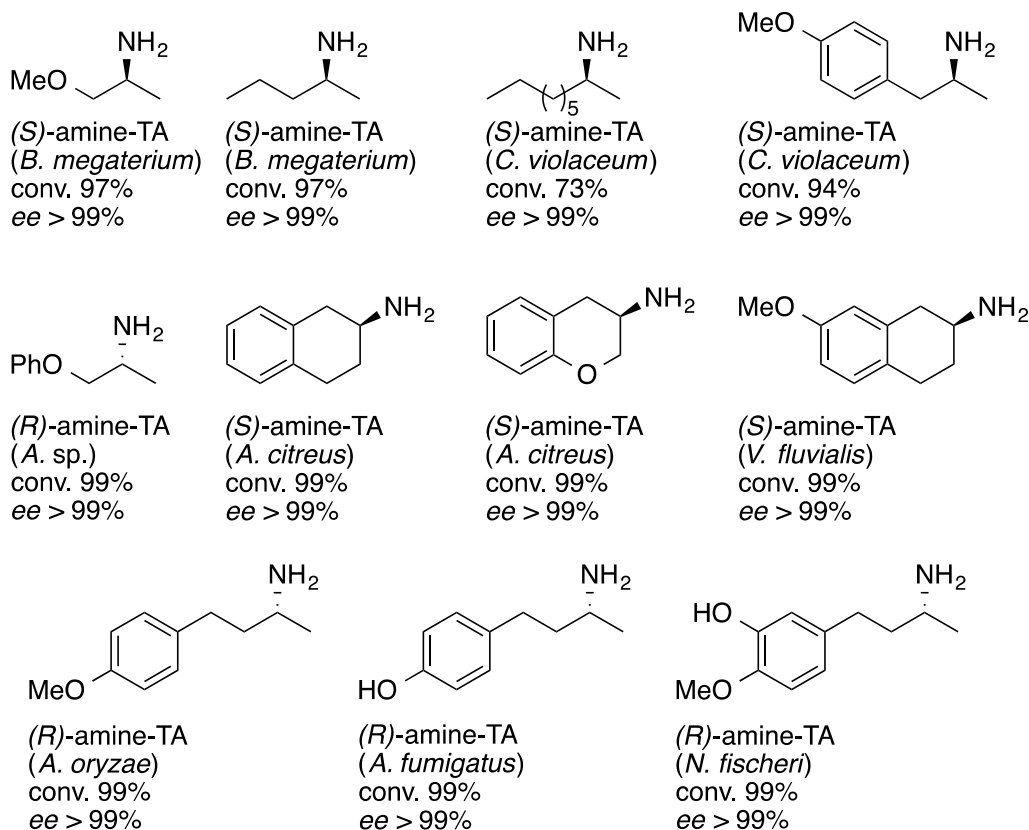


Figure 16 : Amines préparées en utilisant l'Ala, la LDH et un système de régénération du NADH.

L'action d'une pyruvate décarboxylase (PDC) peut également assurer le déplacement d'équilibre.<sup>175</sup> Cette enzyme catalyse la conversion quasi irréversible du pyruvate en acétaldéhyde et CO<sub>2</sub>, tous-deux facilement éliminables du milieu réactionnel

(Schéma 41). N'utilisant pas de co-substrat, la PDC ne nécessite pas la mise en place d'un système de régénération. L'acétaldéhyde peut cependant inhiber certaines TA ou bien jouer le rôle d'accepteur et conduire à la formation d'éthylamine comme produit secondaire. Cette stratégie a permis la synthèse de plusieurs amines chirales, en offrant des rendements proches de ceux obtenus avec la LDH.

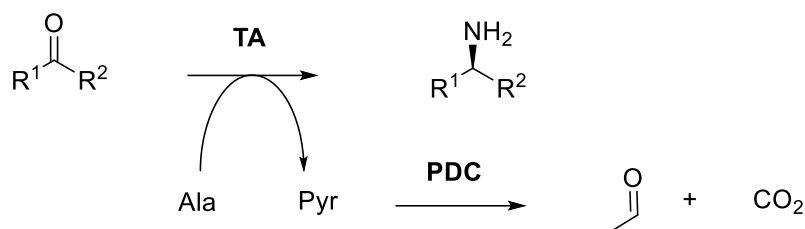


Schéma 41 : Déplacement d'équilibre avec la pyruvate décarboxylase (PDC).

L'acétolactate synthase (ALS) a également été utilisée pour transformer le Pyr. C'est une enzyme à thiamine diphosphate (ThDP) catalysant l'autocondensation du Pyr qui s'accompagne d'une décarboxylation. L'acétolactate produit peut ensuite subir une nouvelle décarboxylation conduisant à l'acétoïne. Cette enzyme a notamment été utilisée dans un procédé de synthèse de l'Haloalanine (Hala, ou acide 2-aminobutyrique). Les deux énantiomères de l'Hala ont été préparés en utilisant la TyrTA d'*E. coli* ou la D-aaTA de *Bacillus sphaericus* avec l'Asp comme donneur (Schéma 42). D'autres enzymes ont été mises en œuvre dans ce procédé : une thréonine-désaminase permettant de générer simplement l'acide 2-oxobutyrique à partir de la Thr et une racémase permettant d'obtenir le D-Asp à partir du L-Asp pour la synthèse de la D-Hala.<sup>128,176</sup>

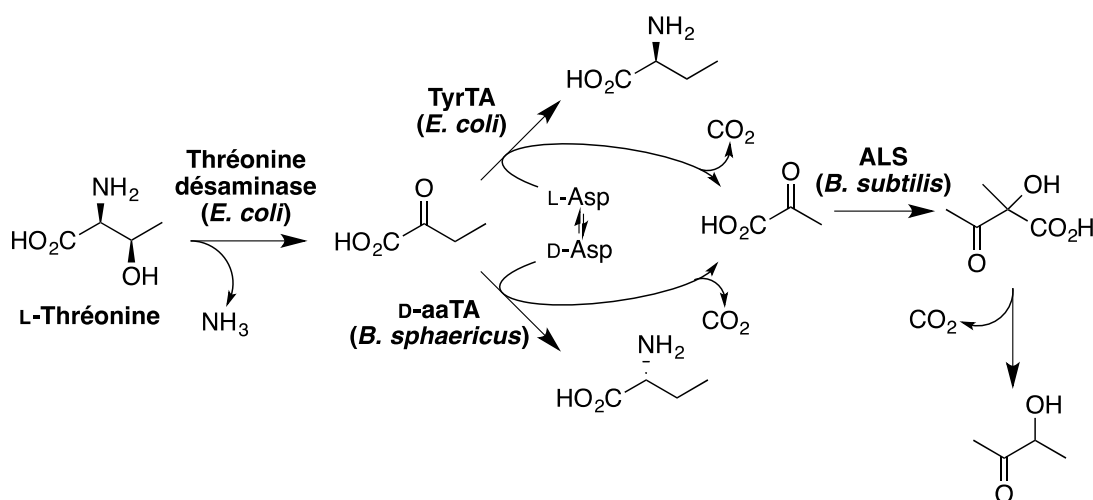


Schéma 42 : Procédés multienzymatiques de synthèse de l'Hala utilisant l'ALS.

Plus récemment, la noréphédrine (NE) et nor-pseudoéphédrine (NPE) ont été préparées dans un procédé couplant une carboligase à ThDP (CL) et une amine-TA (Schéma 43).<sup>177,178</sup> La carboligase catalyse la synthèse du cétoacide accepteur par condensation du pyruvate sur le benzaldéhyde. De plus, elle catalyse aussi, comme l'ALS, l'autocondensation du Pyr permettant ainsi de déplacer l'équilibre de la réaction catalysée par la TA. Il est intéressant de noter que le Pyr produit par la transamination est aussi le substrat de la carboligase et que cette cascade peut être considérée comme cyclique. Cependant la formation d'acétolactate et la décarboxylation de ce dernier en acétoïne empêchent un recyclage efficace du Pyr.

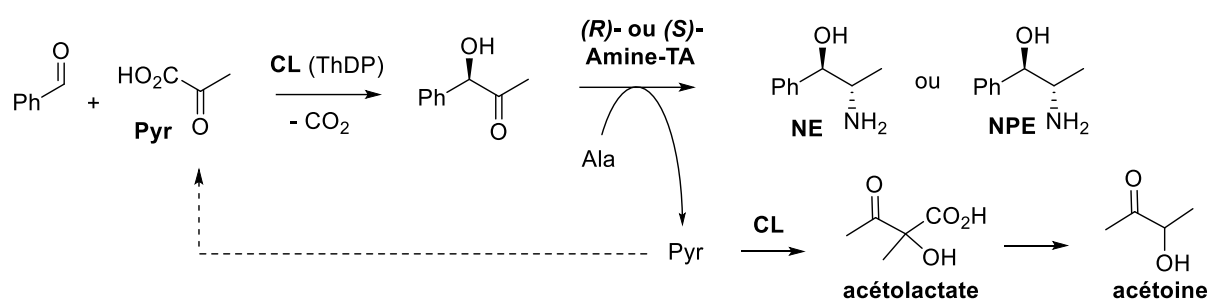


Schéma 43 : Couplage d'une carboligase et d'amine-TA pour la préparation d'aminoolcools.

Enfin, le pyruvate peut également être transformé via une réaction auxiliaire de transamination. Ainsi une AroTA utilisant l'Asp comme donneur a été couplée avec une amine TA utilisant le Pyr comme accepteur pour préparer une série d'acides aminés aromatiques (Schéma 44).<sup>179</sup> Dans ce cas, la transamination thermodynamiquement favorable entre le Pyr et la PEA permet donc de déplacer l'équilibre de la transamination catalysée par l'AroTA. L'utilisation de PEA racémique permet de plus d'effectuer le dédoublement cinétique de ce substrat.

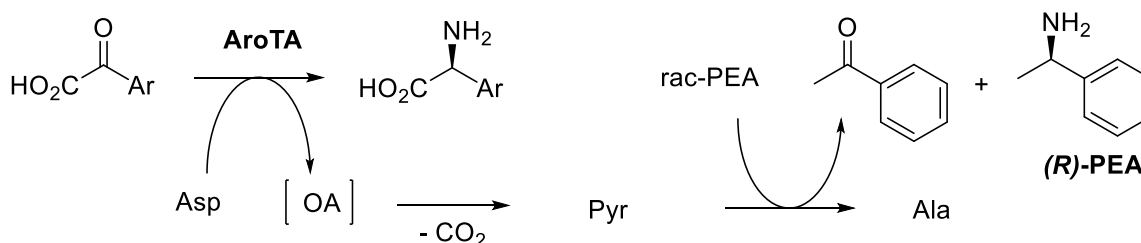


Schéma 44 : Exemple de couplage d'une amine-TA et d'une  $\alpha$ -TA.

D'autres cascades orthogonales ont aussi été mises en place pour transformer des co-produits différents du Pyr. On peut citer l'exemple de la réduction par une alcool déshydrogénase de levure (YADH) de l'acétone formée à partir de l'isopropylamine utilisée comme donneur.<sup>180,181</sup> On peut également citer la phénylpyruvate décarboxylase (PPDC) qui, couplée à une AroTA et à une réductase au sein d'une souche recombinante d'*E. coli*, a permis de synthétiser en parallèle la L-HPhe et le 2-phényléthanol utilisé dans l'industrie cosmétique pour ses propriétés olfactives (Schéma 45).<sup>182</sup>

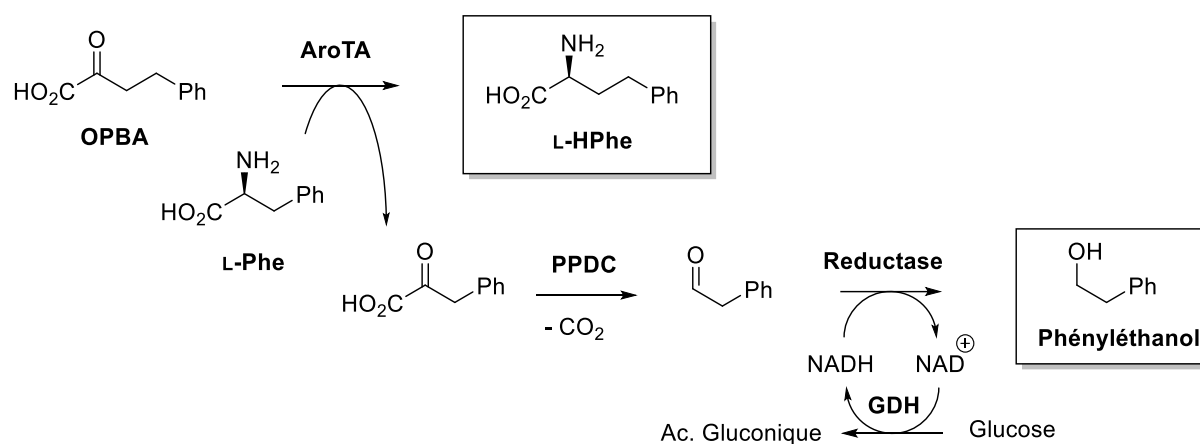


Schéma 45 : Exemple de couplage entre une AroTA et une phénylpyruvate-décarboxylase (PPDC).

Pour finir, il est aussi possible de décarboxyler les cétoacides produits par transamination en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette approche qui ne requiert pas d'enzyme auxiliaire n'est, bien sûr, pas applicable pour la synthèse d'acides aminés dont les précurseurs sont aussi des  $\alpha$ -cétoacides.<sup>183</sup> L'utilisation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut par ailleurs poser des problèmes d'inhibition ou de réactions secondaires d'oxydation.

#### 2.5.2.2.2 Exemples de cascades parallèles

Les cascades parallèles présentent l'intérêt de régénérer le donneur d'amine qui peut donc être utilisé en quantité catalytique.

Une première approche consiste à coupler deux TA possédant un couple de substrat donneur/accepteur en commun. Une transamination thermodynamiquement favorable peut alors permettre de déplacer une autre réaction moins favorable. Les transaminations « irréversibles » évoquées dans les chapitres précédents ont ainsi été couplées avec des transaminations présentant des valeurs de  $K_{eq}$  proches ou inférieures

à 1. Cette approche a notamment été développée au laboratoire pour la synthèse d'analogues du Glu substitués en position 3 ou 4 en utilisant la BCAT d'*E. coli* (Schéma 46).<sup>110</sup>

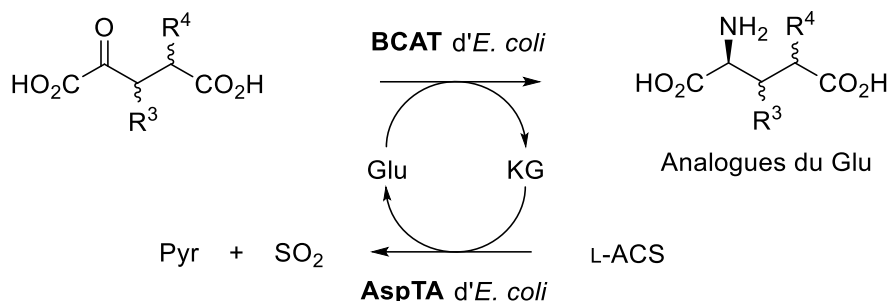


Schéma 46 : Synthèse d'analogues du Glu en couplant la BCAT et l'ASpTA d'*E. coli*.

Un autre exemple concerne la synthèse de la *L-tert*-leucine avec la BCAT ou la TyrTA d'*E. coli*, couplée à une OrnTA utilisant l'ornithine comme « donneur d'amine irréversible » (Schéma 47).<sup>184</sup>

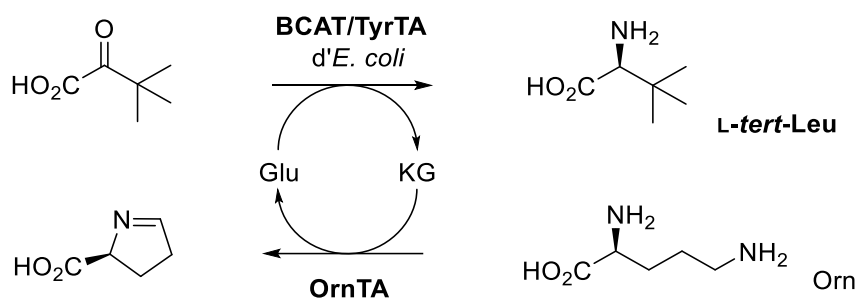


Schéma 47 : Synthèse de la *L-tert*-leucine en couplant la BCAT (ou TyrTA) d'*E. coli* avec une OrnTA.

Des aminoacides déshydrogénases (aaDH) ont également été utilisées pour régénérer l'Ala ou le Glu via une réaction d'amination réductrice. Dans ce type de procédés, le donneur d'amine ultime est donc l'ammoniac. Comme évoqué précédemment la mise en œuvre de cette approche requiert la régénération des cofacteurs d'oxydoréduction. Parmi les aaDH qui ont été utilisées, on trouve l'AlaDH<sup>177,178,189</sup>, la GluDH<sup>186</sup> ou encore la LeuDH<sup>110</sup> qui permettent de régénérer des *L*-aminoacides à partir des cétoacides correspondants. Dans le cas de TA actives avec des *D*-aminoacides, une racémase peut être intégrée dans le processus (Schéma 48).

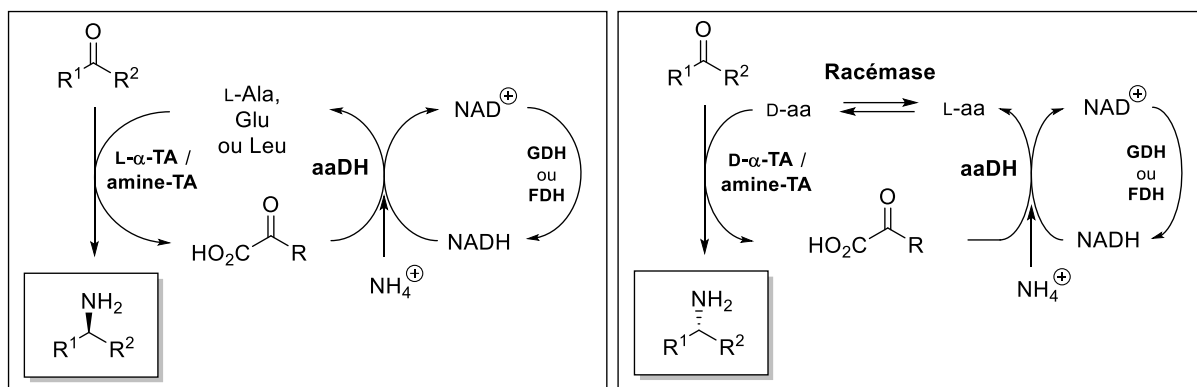


Schéma 48 : Régénération des donneurs d'amine en utilisant des aaDH.

Enfin, même s'il ne s'agit pas de synthèse d'amines chirales, on peut citer pour conclure un exemple d'un procédé mettant en jeu une alcool déshydrogénase (ADH), une AlaDH et une amine-TA dans une alternance de réactions d'oxydoréduction et de transamination. Ce procédé a permis la synthèse de diamines, à partir des diols correspondants et d'ammoniac (Schéma 49).<sup>187</sup>

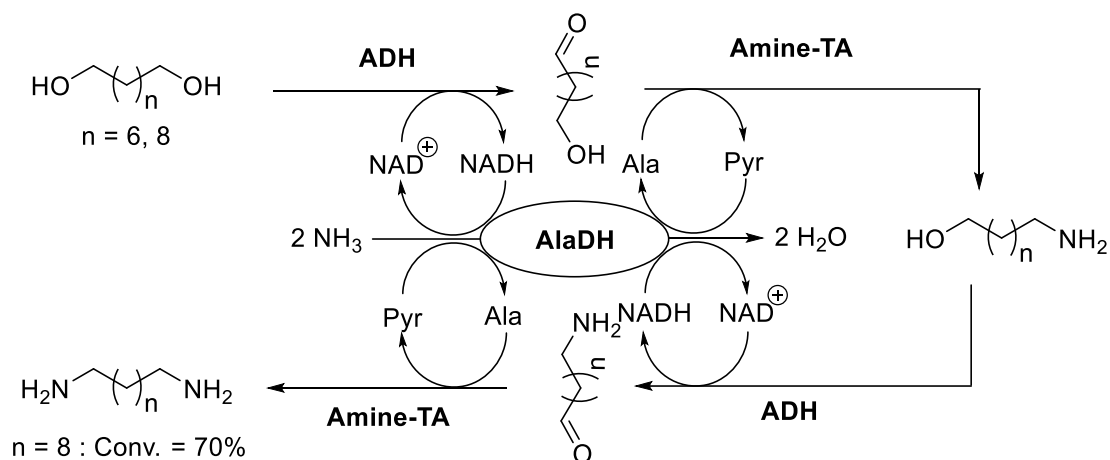


Schéma 49 : Synthèse de diamines à partir de diols via une cascade trienzymatique.

L'ensemble des exemples exposés ci-dessus illustre la diversité des approches qui ont été développées et l'intérêt que suscite la mise au point de procédés de transamination enzymatiques. Plusieurs stratégies de déplacement d'équilibres, présentées dans ce chapitre, ont aussi été mises à profit pour développer des tests d'activité et de criblage qui font l'objet du chapitre suivant.

## 2.6 Tests de criblage pour la recherche de nouvelles transaminases

La disponibilité de tests d'activité simples, rapides et sensibles est un élément clé pour la recherche de nouveaux biocatalyseurs par criblage de collections d'enzymes issues de la biodiversité ou bien de banques de mutants préparées par ingénierie protéique en vue d'optimiser une enzyme pour une application spécifique. Ces tests de criblage reposent sur la détection d'un des produits de la réaction ou plus rarement sur la disparition d'un substrat. Cette détection peut faire appel à la RMN, la spectrométrie de masse ou à l'HPLC couplée à une méthode de détection adéquate. Ces approches présentent l'avantage d'être *à priori* applicables dans tous les cas. Cependant, elles procèdent via des mesures ponctuelles sur des échantillons de milieu réactionnel prélevés à un temps donné. La détermination de paramètres cinétiques implique donc plusieurs mesures et se révèle par conséquent très coûteuse en temps d'analyse. Alternativement, des tests permettant une mesure continue de la variation de concentration d'un produit ou d'un substrat s'avèrent généralement plus performants pour le criblage de collections d'enzymes et la détermination de paramètres cinétiques. Ces tests continus font principalement appel à la spectrophotométrie et profitent des propriétés spécifiques d'une molécule présente dans le milieu réactionnel. Une variété de tests de ce type a ainsi été développée pour cribler de façon plus ou moins spécifique des collections d'enzymes appartenant aux diverses classes de TA.

### 2.6.1 Détection du co-produit carbonylé

Les techniques basées sur la détection du produit carbonylé fixent le choix du donneur d'amine, mais laissent toute liberté au niveau du substrat accepteur et donc de l'amine chirale formée. Ces tests sont donc parfaitement adaptés pour évaluer le potentiel synthétique d'une enzyme en étudiant son spectre de substrats accepteurs. Nombre de ces tests sont par ailleurs basés sur les techniques de déplacement d'équilibre que nous avons évoquées dans les chapitres précédents. Ainsi le co-produit carbonylé peut être directement détectable ou bien donner lieu à la formation d'un produit détectable après transformation spontanée, en présence d'un réactif spécifique ou via une réaction biocatalysée.



### 2.6.1.1 Détection directe du co-produit carbonylé

Les premiers tests développés dans ce cadre se sont basés sur la détection de co-produits énoles (Schéma 50).<sup>188-191</sup> L'absorbance de l'énolate formé en milieu basique permet en effet sa détection par spectrophotométrie aux alentours de  $\lambda = 300$  nm. C'est par exemple le cas de l'OA ou du phénylpyruvate formés à partir d'Asp ou de Phe qui, en milieu basique, absorbent à 280 et 322 nm respectivement. Malgré sa simplicité, cette méthode présente plusieurs inconvénients. Le premier est que le coefficient d'extinction molaire de ces espèces est assez faible ( $\epsilon_{OA, 280nm} = 550 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), ce qui rend leur détection difficile, en particulier dans des lysats cellulaires au sein desquels d'autres composés peuvent aussi absorber à la même longueur d'onde. Par ailleurs, la formation de l'énolate n'est observable qu'en milieu fortement basique, incompatible avec l'activité enzymatique. Ces tests ne permettent donc pas des mesures en continu.

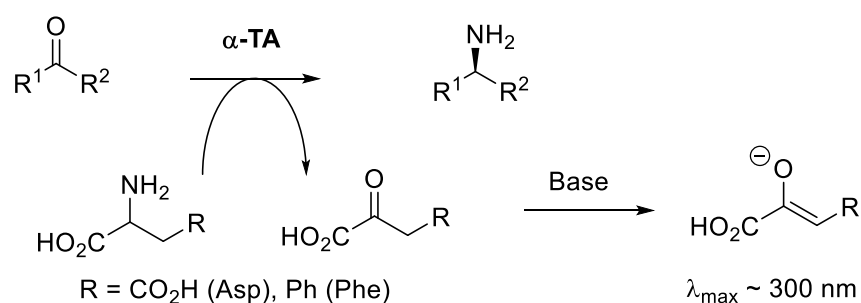


Schéma 50 : Test de criblage basé sur la production d'un énolate conjugué.

La formation de produits carbonylés conjugués permet, de façon plus intéressante, une détection directe sans nécessiter l'addition de base. C'est par exemple le cas de l'acétophénone formée à partir de la PEA qui a permis d'établir le spectre de substrats d'une  $\omega$ -TA de *Rhodobacter sphaeroides*, par spectrophotométrie à 245 nm ( $\epsilon = 12000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).<sup>192</sup> La détection, d'autres cétones conjuguées par fluorimétrie a permis d'améliorer la sensibilité de ce type de tests. Ainsi, la (6-méthoxynapht-2-yl)éthylamine s'est révélée être un substrat pour diverses amine-TA et conduit à une acétonaphtone facilement détectée à 450 nm (Schéma 51).<sup>193</sup>

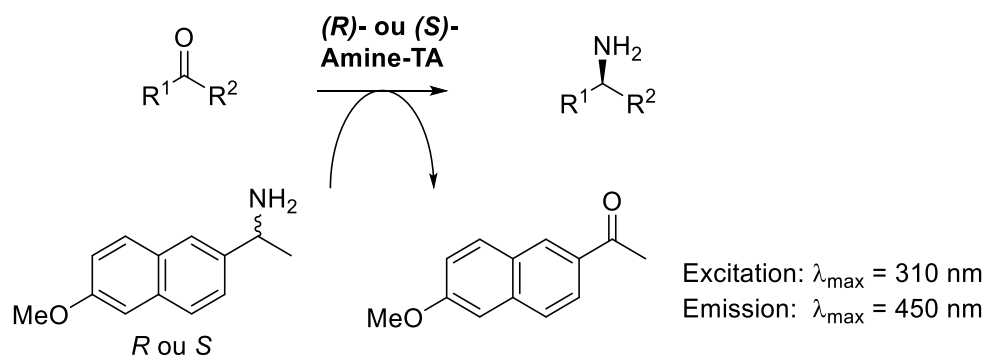


Schéma 51 : Détection par fluorimétrie d'une acétonaphtone.

Nous pouvons aussi citer dans ce cadre l'utilisation de l'ortho-xylylènediamine évoquée précédemment (Schéma 34), qui conduit à un produit dont la polymérisation génère un précipité facilement détectable par spectrophotométrie.<sup>165</sup>

### 2.6.1.2 Détection du co-produit carbonylé avec un réactif spécifique

Divers réactifs ont été utilisés pour réagir de façon plus ou moins spécifique avec les  $\alpha$ -cétoacides produits par transamination et permettre la formation d'un dérivé facilement détectable par spectrophotométrie. Ainsi, la 2,4-dinitrophénylhydrazine produit par exemple une hydrazone colorée par réaction avec les cétoacides.<sup>194,195</sup> Dans le cas des  $\alpha$ -TA, cette approche nécessite l'extraction préalable du cétoacide produit et elle est donc inapplicable pour des mesures en continu. D'autres méthodes, plus spécifiques ont été décrites, en utilisant par exemple l'Asp comme donneur. Dans ce cas, il est possible d'utiliser un sel de diazonium, le « Fast Violet B Salt » (Figure 17), qui réagit spécifiquement avec l'OA pour former une hydrazone conjuguée qui absorbe à 520 nm.<sup>196,197</sup> L'emploi de phénazine méthosulfate permet par ailleurs de détecter la présence de dérivés arylpyruvate en produisant une molécule qui absorbe à 380 et 675 nm à pH neutre (Figure 17).<sup>198</sup> Enfin, le réactif de Salkowski ( $\text{FeCl}_3$  dissous dans des acides concentrés) permet, de détecter les dérivés indoliques et en particulier l'acide indolacétique formé à partir du tryptophane.<sup>199</sup> Dans le domaine des amine-TA, l'emploi de ninhydrine a permis de détecter l'acide pyrroline-5-carboxylique issu de l'Orn via la formation d'un produit coloré ( $\epsilon_{510\text{nm}} = 16500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).<sup>200</sup> Tous ces réactifs sont cependant inutilisables en continu, car ils donnent lieu à des réactions relativement lentes qui nécessitent une incubation en présence du milieu réactionnel, dans des conditions parfois drastiques.

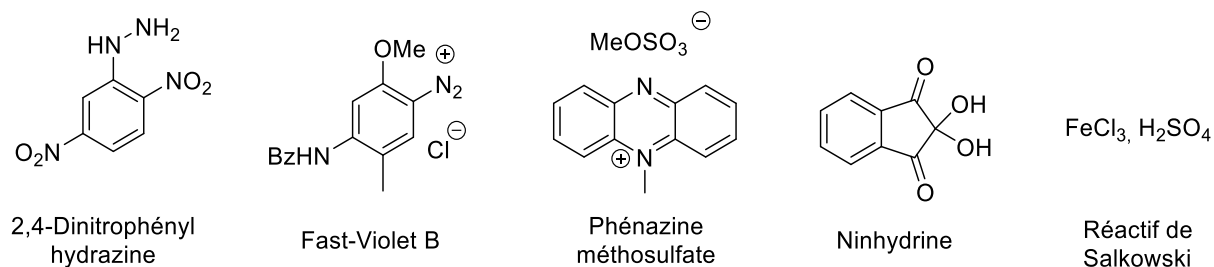


Figure 17 : Réactifs utilisés pour la révélation spécifique des co-produits carbonylés.

En conclusion, on peut noter qu'à ce jour aucun test continu, basé sur la transformation d'un coproduit carbonylé en présence d'un réactif spécifique, n'a encore été développé.

### 2.6.1.3 Utilisation de cascades enzymatiques

#### 2.6.1.3.1 Réduction du co-produit carbonylé

La plupart des tests d'activité basés sur le suivi de la formation du produit carbonylé avec une cascade enzymatique, font intervenir une déshydrogénase (DH) comme enzyme auxiliaire pour catalyser soit la réduction du carbonyle en alcool, soit son amination réductrice en présence d'ions ammonium. Dans les deux cas, l'activité peut être mesurée de façon continue par le suivi spectrophotométrique de la consommation du NAD(P)H à 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADH}, 340\text{nm}} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (Schéma 52).

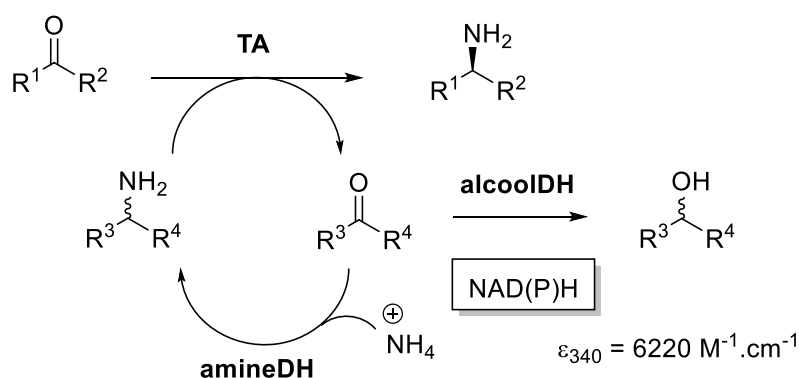


Schéma 52 : Détection en continu de l'activité enzymatique d'une TA à l'aide d'une déshydrogénase.

Le Tableau 9 regroupe les différentes DH qui ont été utilisées comme enzymes auxiliaires dans des tests d'activité pour les TA.

Tableau 9 : Déshydrogénases utilisées dans des tests d'activités de TA.

Enzymes		Abréviation	Donneur d'amine	Produit carbonylé réduit	Réf.
<b>AlcoolDH</b>	Lactate déshydrogénase	LDH	Ala	Pyr	196,201-203
	Malate déshydrogénase	MDH	Asp	OA	188,204
	Hydroxyisocaproate déshydrogénase	HICDH	Leu	MOPA	205,206
	Hydroxypyruvate-réductase	HPA-Red	Ser	HPA	207
	Hydroxyglutarate déshydrogénase	HGDH	Glu	KG	208,209
<b>AmineDH</b>	Glutamate déshydrogénase	GluDH	Glu	KG	210-213
	Alanine déshydrogénase	AlaDH	Ala	Pyr	203
	Leucine déshydrogénase	LeuDh	Leu	MOPA	214
	Pyrroline-5-carboxylate-réductase	PYCR1	Orn	Pyrroline-5-carboxylate	202,207,215

Parmi les DH qui réduisent le co-produit carbonylé en alcool, on retrouve la LDH qui catalyse la réduction en lactate du Pyr formé à partir de L- ou D-Ala.<sup>196,201,203</sup> Ce test est donc applicable pour une grande variété d'enzymes : des L- ou D- $\alpha$ -TA mais aussi des amine-TA qui, pour la plupart d'entre-elles, acceptent l'Ala comme donneur. Parmi les autres alcoolDH utilisées dans des tests d'activités de TA, on trouve la malate déshydrogénase (MDH) qui permet d'utiliser l'Asp comme donneur d'amine,<sup>188,204</sup> l'hydroxyisocaproate déshydrogénase (HICDH) qui permet d'utiliser la Leu,<sup>205,206</sup> ou encore l'hydroxypyruvate réductase (HPA-Red) qui permet de mesurer l'activité des SerTA.<sup>207</sup> L'utilisation d'une hydroxycétoglutarate déshydrogénase (HGDH) qui catalyse la réduction du KG permet quant-à-elle d'utiliser le Glu comme donneur et de disposer ainsi d'un test au caractère générique pour les  $\alpha$ -TA compte tenu du fait que le Glu est un substrat communément accepté par cette classe de TA.<sup>208,209</sup>

Parmi les amineDH, on trouve la GluDH<sup>210-213</sup> qui permet, comme la HGDH, de disposer d'un test générique pour les L- $\alpha$ -TA en assurant la régénération du Glu utilisé comme donneur. L'emploi d'une AlaDH a aussi été rapporté pour régénérer l'Ala. Comme la LDH, cette dernière enzyme auxiliaire permet donc de disposer d'un test applicable à la fois pour des  $\alpha$ -TA et des amine-TA.<sup>203</sup> On peut aussi citer la LeuDh qui

régénère la leucine à partir du MOPA et qui a permis de mettre au point un test de criblage pour les BCAT.<sup>214</sup> En plus du déplacement d'équilibre, les aminoacideDH (aaDH) permettent de régénérer le substrat donneur de la réaction et donc de maintenir sa concentration stationnaire, condition idéale pour la détermination de paramètres cinétiques. Cependant, la présence nécessaire d'ions ammonium à relativement forte concentration peut perturber l'activité de la TA étudiée. On peut enfin également citer l'utilisation d'une pyrroline-5-carboxylate réductase (PYCR1) qui catalyse la formation de proline à partir de la forme cyclisée du Glu-semialdéhyde et qui a permis de mettre au point un test d'activité pour les ornithine-TA.<sup>219</sup>

En complément des tests que nous venons d'évoquer, il est possible, afin de limiter les coûts ou bien de changer la nature du signal détecté, de procéder au recyclage du cofacteur de l'oxydoréductase. Une première méthode a été mise au point en utilisant la GDH qui régénère le NADH en oxydant le glucose en gluconolactone (Schéma 53).<sup>170,203</sup> L'hydrolyse de cette dernière en acide gluconique, induit une acidification qui peut être aisément mise en évidence par pH-métrie, par dosage à l'aide d'une base permettant de stabiliser le pH ou encore avec un indicateur coloré comme le Phénol Red. Ce procédé a notamment déjà été utilisé pour le criblage d'amine-TA.<sup>170,203</sup>

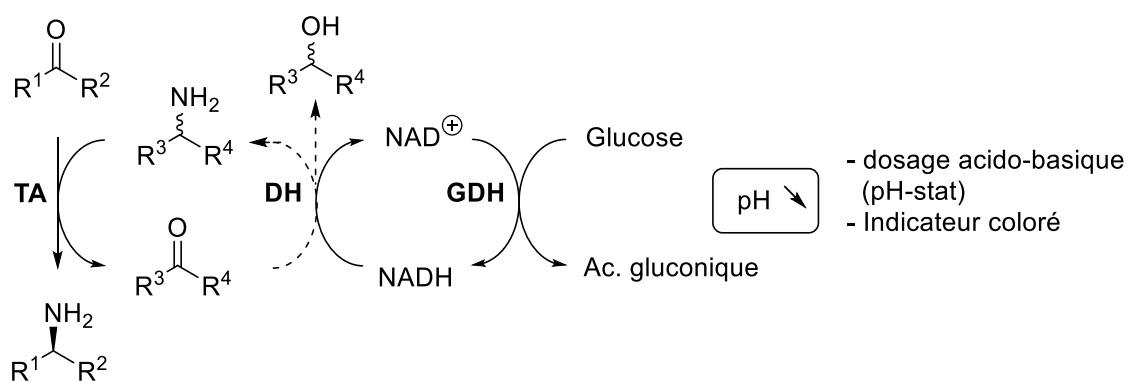


Schéma 53 : Test pH-métrique utilisant une DH et la GDH.

### 2.6.1.3.2 Oxydation enzymatique du co-produit carbonyle

Certains tests sont basés sur la production de NAD(P)H par une réaction d'oxydation du produit carbonyle de la transamination. Ainsi la succinate-semialdéhyde déshydrogénase (SSDH) catalyse l'oxydation du succinate semialdéhyde produit à partir du GaBa. Ce test, est donc très utile pour l'étude des GaBaTA (Schéma 54).<sup>216-218</sup>

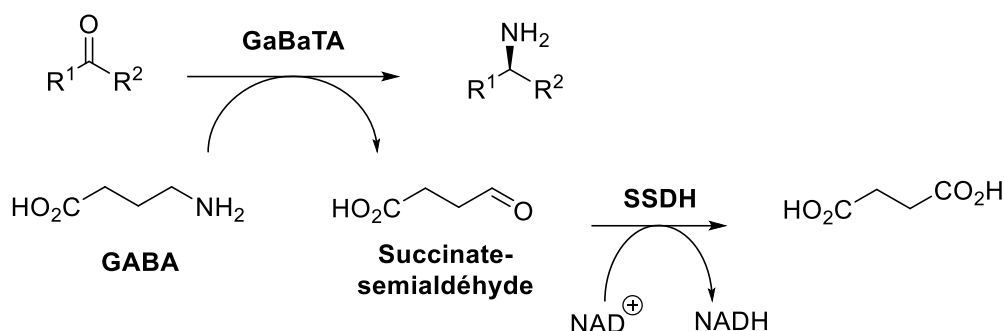


Schéma 54 : Test continu pour les GaBaTA utilisant la succinate-semialdéhydeDH (SSDH).

Ici aussi, la régénération du cofacteur sous sa forme oxydée a été appliquée dans différents tests pour changer la nature du signal et éventuellement permettre un déplacement d'équilibre. Le premier catalyseur qui a été utilisé pour ce type de régénération est la diaphorase. Elle permet de réduire différents composés chromogéniques parmi lesquels le premier fut le chlorure de 2-(*p*-iodophényl)-3-(*p*-nitrophényl)-5-phenyltétrazolium (INT) (Schéma 55) qui produit un composé absorbant à 500 nm.<sup>219</sup> Par la suite, d'autres sels de tétrazolium, plus performants en termes de solubilité et de stabilité, ont été utilisés. On peut citer le 2-(2-méthoxy-4-nitrophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfo-phényl)-2H-tétrazolium (WST-8), ou le disodium 2,3-bis-(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfo-phényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide (XTT) qui produisent tous deux des composés de type formazan, absorbant fortement vers 480 nm.<sup>217,220</sup> La diaphorase a par ailleurs été remplacée par le 1-méthoxy-5-méthyl-phénaziniumméthylsulfate (1-méthoxy-PMS), en tant que médiateur rédox car il présente une plus grande stabilité en milieu tamponné. Il existe enfin une dernière variante qui associe la diaphorase avec la résazurine et qui conduit à la formation de résorufine, un composé fluorescent ( $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ ). Cette alternative permet d'augmenter de manière très importante la sensibilité du test en remplaçant la détection colorimétrique par une détection fluorimétrique.

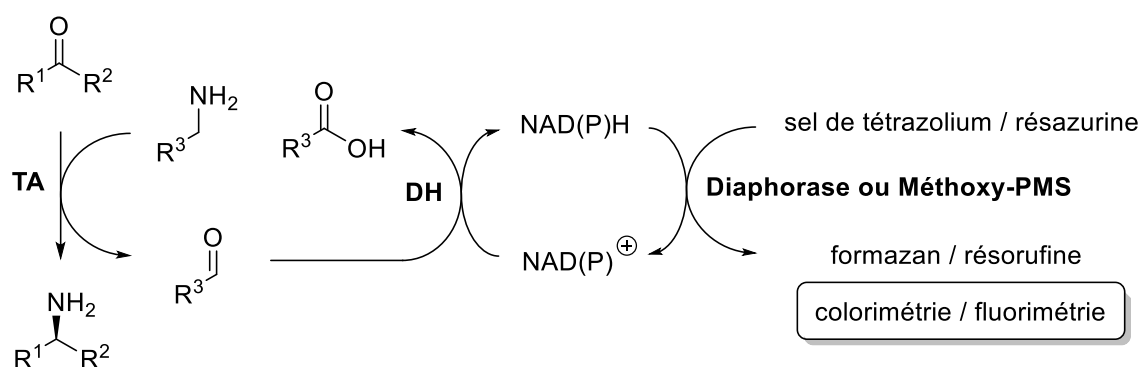


Schéma 55 : Tests colorimétriques ou fluorimétriques mettant en jeu la régénération du NAD<sup>+</sup>.

Cette approche a été mise en œuvre dans différents tests comme par exemple un test trienzymatique adapté aux L- $\alpha$ -TA utilisant le Glu comme donneur primaire, une  $\omega$ -TA thermophile (OAT) permettant de régénérer le Glu en présence d'acide 5-aminopentanoïque et d'une aldéhyde déshydrogénase (ALDH) oxydant le glutarate-semialdéhyde en acide glutarique en présence de NADP<sup>+</sup>, lui-même régénéré en présence de 1-méthoxy-PMS et de WST-8 (Schéma 56).<sup>217</sup>

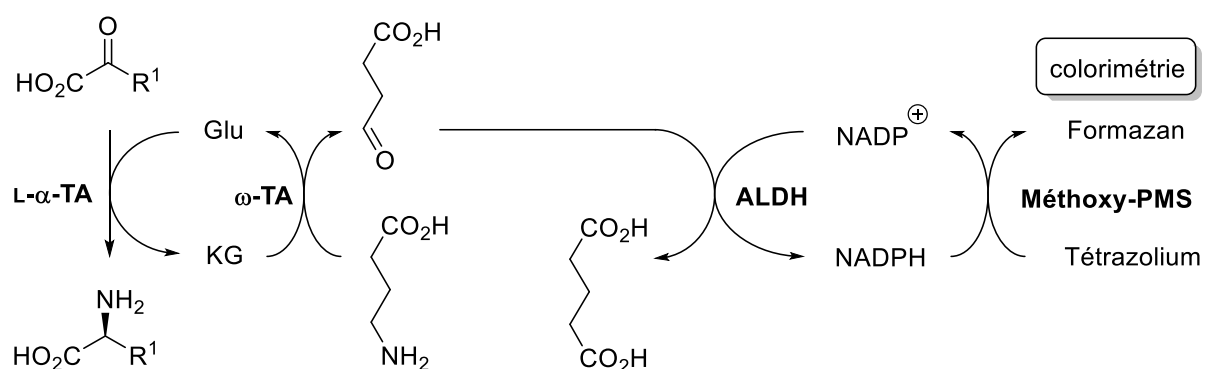


Schéma 56 : Test pour les L- $\alpha$ -TA en jeu la régénération de NADP<sup>+</sup> et la production de formazan.

### 2.6.1.3.3 Détection du co-produit carbonylé via d'autres réactions enzymatiques

Quelques tests n'utilisant pas des DH et le NAD(P)H comme vecteur du signal ont été décrits. C'est le cas du test à la citrate synthase (CS), qui a permis de mesurer l'activité de l'AspTA via la quantification de la production d'OA réalisée à l'aide de l'acétyl-CoA et du réactif d'Ellman (DTNB) permettant de quantifier le CoA-SH par colorimétrie (Schéma 57).<sup>221</sup>

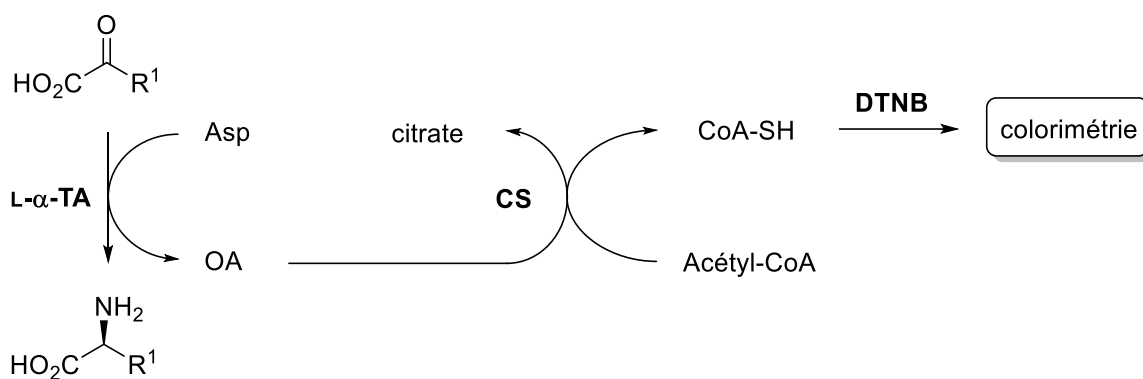


Schéma 57 : Test pour l' Asp-TA utilisant la citrate synthase (CS) et le DTNB.

On peut également citer un test mettant en jeu la pyruvate oxydase (PyrOx). Il repose sur la décarboxylation/phosphorylation du pyruvate en acétylphosphate en présence de phosphate inorganique et de dioxygène.<sup>222</sup> Cette réaction produit du peroxyde d'hydrogène qui est facilement détecté en présence de 4-aminoantipyrine et de *m*-tolyl-diéthanolamine qui conduisent à la formation d'un composé rose via une réaction d'oxydation catalysée par la peroxydase de raifort (horseradish-peroxydase : HRP) (Schéma 58).

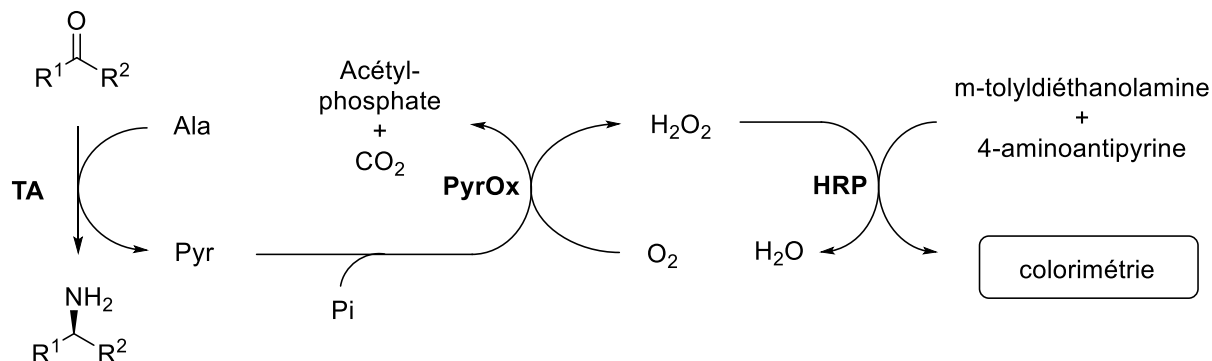


Schéma 58 : Test colorimétrique pour les TA utilisant la PyrOx et l'HRP.

Ce test développé pour le dosage sanguin de l'Ala-TA présente l'avantage d'être basé sur l'emploi d'Ala comme donneur, ce qui le rend potentiellement applicable, à l'étude des amine-TA et des D-α-TA.

#### 2.6.1.4 Tests basés sur la détection du produit aminé

Les tests présentés dans le chapitre précédent, qui sont basés sur la détection du produit carbonylé permettent de mesurer l'activité d'une TA vis-à-vis d'une variété de



substrats accepteurs. Par contre, ceux basés sur la détection du produit aminé fixent le choix du substrat accepteur et sont donc adaptés à l'étude du spectre de substrats donneurs d'amine. Les tests de ce type sont nettement moins nombreux que les précédents.

La détection du produit aminé peut se faire directement à l'aide d'un réactif chromogénique sélectif. Ainsi, par exemple, l'utilisation de l'orthophtaldéhyde, qui réagit sélectivement avec les diamines vicinales en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol, permet de détecter l'acide 7,8-diaminopélagronique, offrant alors la possibilité de mesurer l'activité des DaPaTA et Lys/DaPaTA via la formation d'un composé tetracyclique fluorescent ( $\lambda_{ex} = 410 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 470 \text{ nm}$ ).<sup>223</sup> Un test plus général a été mis au point en utilisant du  $\text{CuSO}_4$  en présence de méthanol pour détecter les aminoacides via la formation d'un complexe bleu ( $\lambda_{max} = 595 \text{ nm}$ ). Ce test est donc adapté aux amine-TA car il permet de détecter la formation d'Ala à partir du Pyr utilisé comme accepteur en présence d'une variété d'amines (Schéma 59).<sup>224</sup> Il ne s'agit cependant pas d'un test permettant une mesure continue de l'activité.

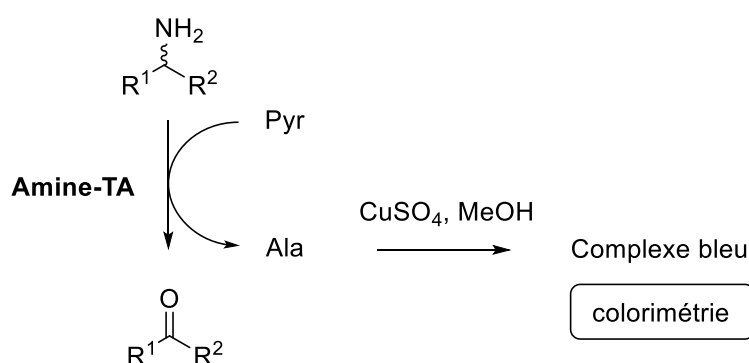


Schéma 59 : Test pour les amine-TA utilisant le  $\text{CuSO}_4$ .

Des cascades enzymatiques ont également été développées pour la détection des produits aminés. La famille d'enzyme la plus couramment utilisée dans ce cas est celle des aminoacide oxydases (AAO) qui permettent la formation d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , facilement détectable. Ainsi l'utilisation de la glutamate oxydase (GluOx) a permis la mise au point d'un test général pour les L- $\alpha$ -TA.<sup>215,225,226</sup> Cette enzyme catalyse en effet la régénération du KG à partir du Glu, en produisant  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ce composé peut alors être facilement détecté selon diverses méthodes comme l'oxydation de l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS) ou du pyrogallol red catalysée par la HRP



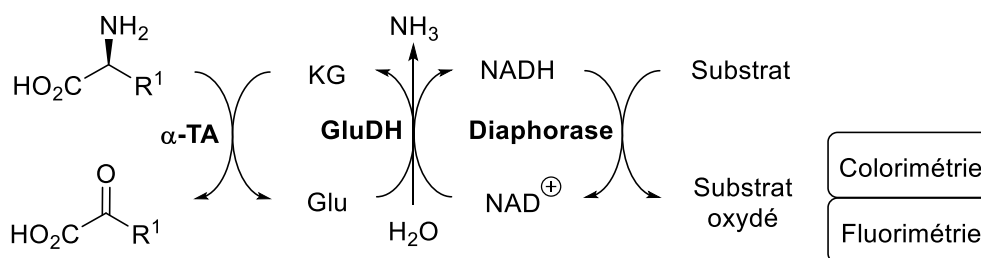


Schéma 62 : Test pour les  $\alpha$ -TA utilisant la GluDH et la diaphorase.

### 2.6.1.5 Autres tests

Si la détection des produits de la transamination est la méthode la plus classique, quelques tests d'activité sont cependant basés sur la consommation d'un substrat. Ces tests, discontinus par essence peuvent cependant présenter un intérêt dans des cas particuliers. L'utilisation du chlorure de 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC) en milieu basique, a ainsi permis de quantifier des  $\alpha$ -hydroxycétones via la formation de triphényl-formazan (TPF) absorbant à 510 nm. Ce test a permis de cribler des amine-TA pour trouver des enzymes applicables à la synthèse de  $\beta$ -aminoalcools chiraux (Schéma 63).<sup>232</sup>

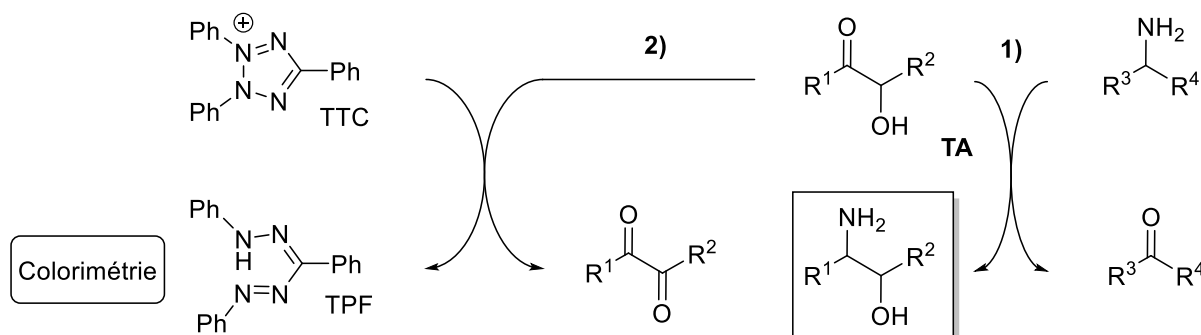


Schéma 63 : Test au TTC pour les amine-TA permettant de détecter les  $\beta$ -hydroxycétones.

On peut enfin citer un test conductimétrique adapté aux amine-TA basé sur les différences de propriétés globales entre substrats et produits (Schéma 64).

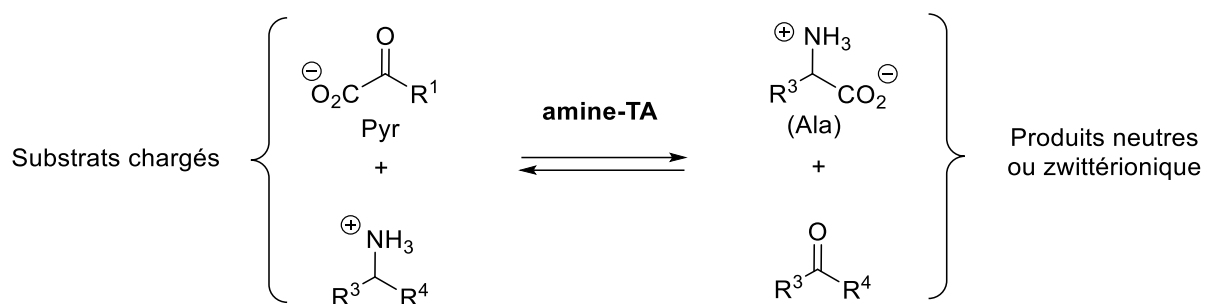


Schéma 64 : Test conductimétrique pour les amine-TA.

Ce test repose sur les variations de conductance au cours des réactions de transamination mettant en jeu des substrats chargés (amine et cétoacides) et produisant des produits neutres ou zwitterioniques (cétone et aminoacides). Ce test a permis de caractériser efficacement le spectre de substrat d'une amine-TA.<sup>233</sup>

En conclusion de ce chapitre consacré aux tests d'activité et de criblage développés pour les TA, on peut constater que ce domaine a donné lieu à de nombreux travaux de recherche et continue de susciter un grand intérêt en biocatalyse. Plusieurs tests de criblages présentés ci-dessus ont ainsi été décrits au cours des 3 dernières années, en parallèle de ce travail de thèse. Malgré la diversité des méthodes décrites, rares sont les tests permettant de mesurer l'activité d'une grande diversité de TA (L- ou D- $\alpha$ -TA, amine-TA) avec une variété de substrats (donneurs ou accepteurs) de façon simple, continue, rapide, peu coûteuse et avec une grande sensibilité permettant de mener aussi bien des études cinétiques et le criblage de larges banques d'enzymes. Une part importante de ce travail de thèse a donc consisté à développer des tests originaux répondant à ce cahier des charges.



## **Résultats et discussions**



## Résultats et discussions

Ce travail de thèse a eu pour objet la recherche de nouvelles TA par exploration de la biodiversité, en vue de disposer d'une collection de biocatalyseurs performants, une boîte à outils, pour accéder à une large gamme d'amines chirales à partir des dérivés carbonylés correspondants. Ce travail a comporté différentes tâches qui sont résumées dans la Figure 18.

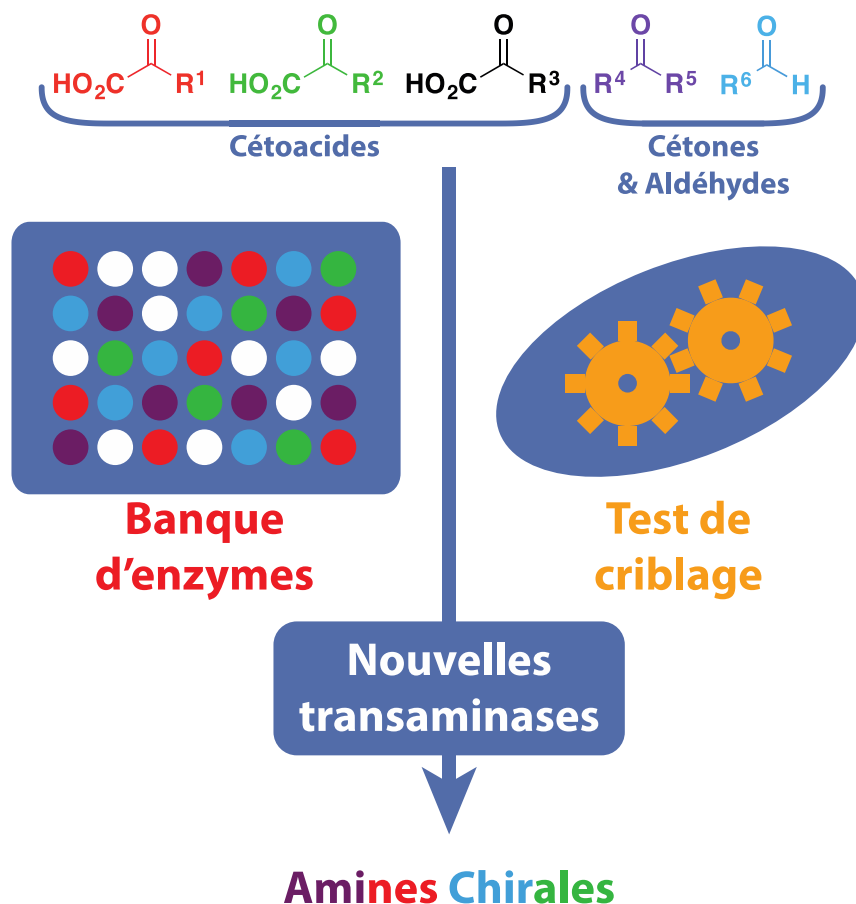


Figure 18 : Schéma général du projet.

Ainsi, des collections de TA ont été construites par exploration des bases de données génomiques, en collaboration avec l'équipe du Dr Véronique de Bérardinis du Génoscope d'Evry. Parallèlement, de nouveaux tests analytiques ont été mis au point pour détecter et quantifier diverses activités de transamination. Ces tests ont ensuite été mis en œuvre pour cribler les collections de TA avec une large série de substrats donneurs et accepteurs. Enfin une série de TA correspondant aux meilleures enzymes détectées (« hits ») a été étudiée et a déjà donné lieu à plusieurs applications



prometteuses. Une partie de ce travail de thèse a par ailleurs été consacrée à l'étude d'une autre classe d'enzymes : les monoamine oxydases humaines A et B dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Lennart Bunch de l'Université de Copenhague. Bien que ce travail ne soit pas décrit en détail dans ce manuscrit, il a donné lieu à une publication présentée en annexe.

## 1 Mise au point des tests enzymatiques

### 1.1 Tests basés sur la détection d'ions sulfites avec le DTNB

En nous appuyant sur l'expérience accumulée au laboratoire lors de la synthèse des analogues du Glu avec l'acide cystéine sulfinique (ACS), nous avons mis au point une nouvelle méthode pour la mesure de l'activité des TA basée sur l'utilisation d'acides  $\beta$ -aminosulfiniques ( $\beta$ AS). Ces composés, comme l'ACS, conduisent par transamination, à la formation d'un acide  $\beta$ -cétosulfinique qui se décompose spontanément dans le milieu en produisant un dérivé carbonylé et du  $\text{SO}_2$  (Schéma 65).

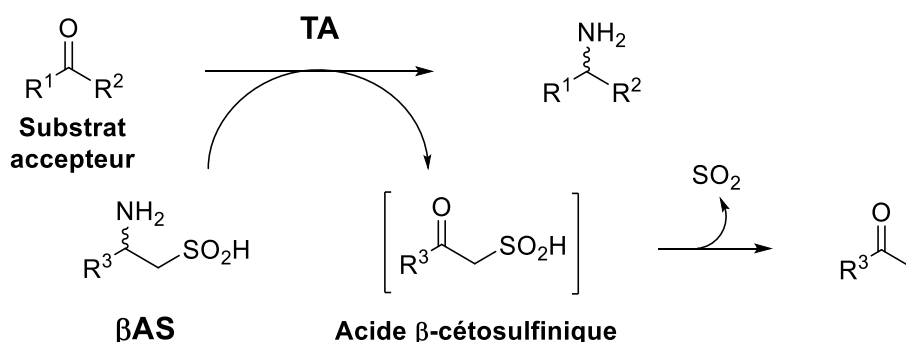


Schéma 65 : Utilisation d'un  $\beta$ AS comme donneur pour les réactions de transamination.

L'hydratation rapide du  $\text{SO}_2$  conduit à des ions sulfite qui peuvent être facilement, dosés à l'aide de plusieurs réactifs chimiques comme le réactif d'Ellman (Acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque), DTNB). Comme nous l'avons évoqué précédemment le DTNB a déjà été utilisé dans un autre test d'activité des TA, lui aussi basé sur la libération d'un composé soufré, le CoaSH.<sup>221</sup> Ainsi, la réaction du DTNB avec les nucléophiles soufrés produit un thiolate qui absorbe à 412 nm et dont l'apparition peut-être suivie par spectrophotométrie (Schéma 66). L'utilisation conjointe d'un  $\beta$ AS comme donneur, et du DTNB comme réactif chromogénique, permet donc de mesurer l'activité d'une TA de façon continue.

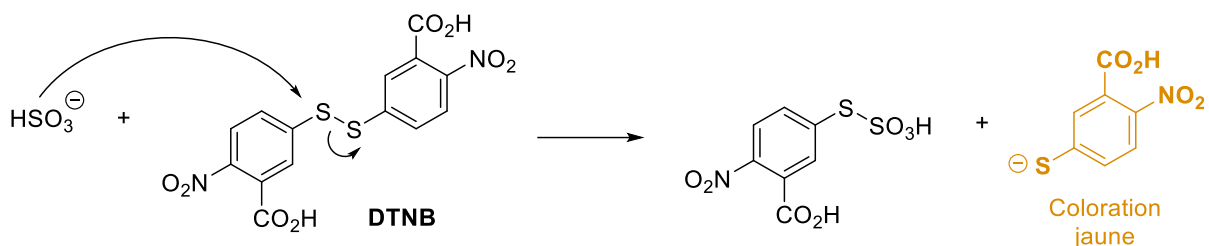


Schéma 66 : Réaction du DTNB avec les ions sulfites.

En plus du déplacement d'équilibre et du suivi colorimétrique lié à l'utilisation du  $\beta$ AS, ce test, qualifié de « direct », offre une totale liberté concernant le choix du substrat accepteur. Il est donc possible de tester une variété de cétones, d'aldéhydes ou de cétoacides et par conséquent d'étudier des  $\alpha$ -TA ou des amine-TA. Ce test direct est en revanche limité aux TA acceptant un  $\beta$ AS comme substrat donneur d'amine, enzymes que nous dénommerons des  $\beta$ ASTA (Schéma 67).

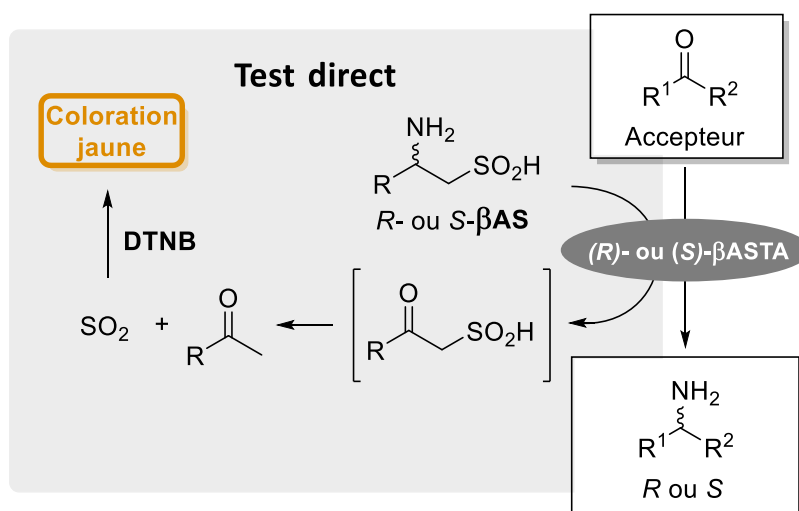


Schéma 67 : Test direct permettant la mesure de l'activité des  $\beta$ ASTA.

Pour rendre notre méthode applicable à d'autres TA, nous avons développé un second test, dénommé « test couplé », qui utilise un donneur d'amine primaire communément accepté par les  $\alpha$ -TA ou les amine-TA (Schéma 68). Ce donneur est régénéré via une réaction auxiliaire de transamination utilisant un  $\beta$ AS comme donneur et une  $\beta$ ASTA, comme enzyme auxiliaire. Ce couplage permet ainsi le suivi de la réaction principale avec le DTNB. Ce test permet donc l'étude des TA n'acceptant pas le  $\beta$ AS comme donneur et il est donc tout à fait complémentaire par rapport au test direct. Enfin, en choisissant des donneurs de configuration inverse pour ces deux tests, il est

possible de les utiliser avec des enzymes présentant des stéréosélectivités différentes, ce qui rend notre nouvelle méthode applicable à l'ensemble des TA.

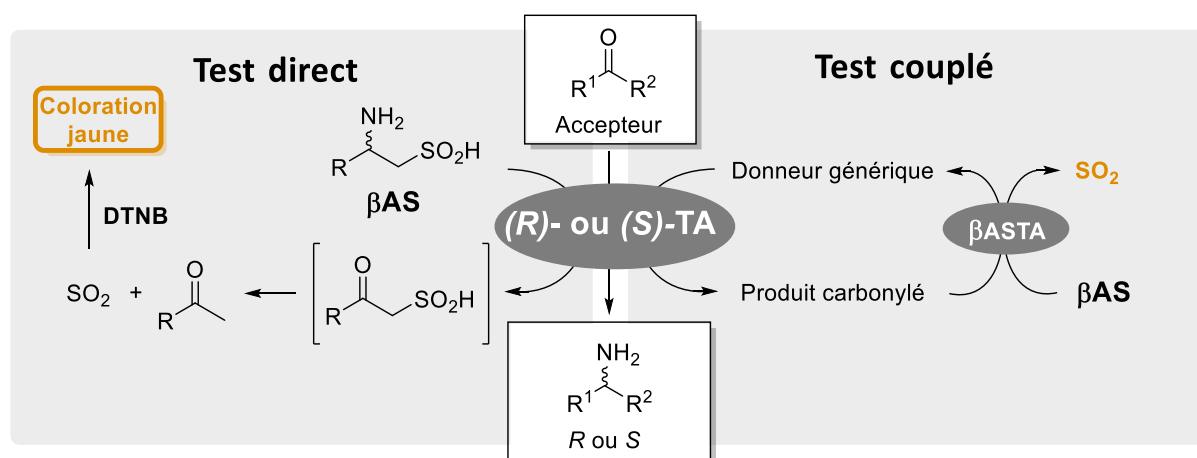


Schéma 68 : Complémentarité des tests direct et couplé applicables à toutes les classes de TA.

### 1.1.1 Tests d'activité pour les $\alpha$ -TA

Nous avons tout d'abord orienté nos efforts vers des tests d'activité applicables aux  $\alpha$ -TA. Pour cela, nous avons choisi, comme  $\beta$ AS, l'ACS qui est un  $\alpha$ -aminoacide. Pour le test couplé, nous avons choisi, comme donneur primaire, le Glu qui constitue un donneur commun pour les  $\alpha$ -TA (Schéma 69). Le test direct devrait donc nous permettre d'identifier des  $\beta$ ASTA. Si ces enzymes n'acceptent pas le Pyr, elles permettront alors, comme nous l'avons vu pour l'AspTA, des déplacements d'équilibre en utilisant l'ACS (et sans doute l'Asp) comme donneur.

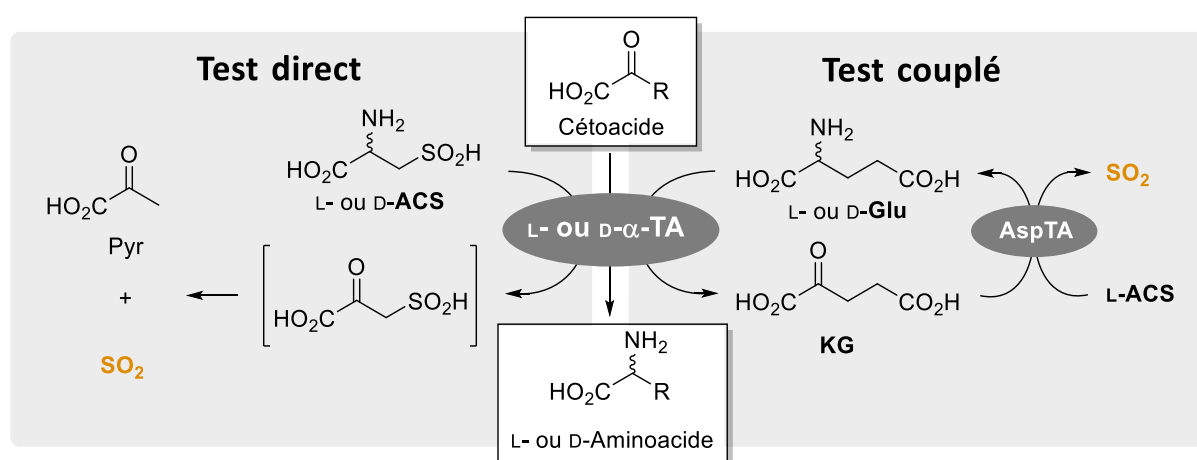


Schéma 69 : Tests développés pour la mesure de l'activité des  $\alpha$ -TA.

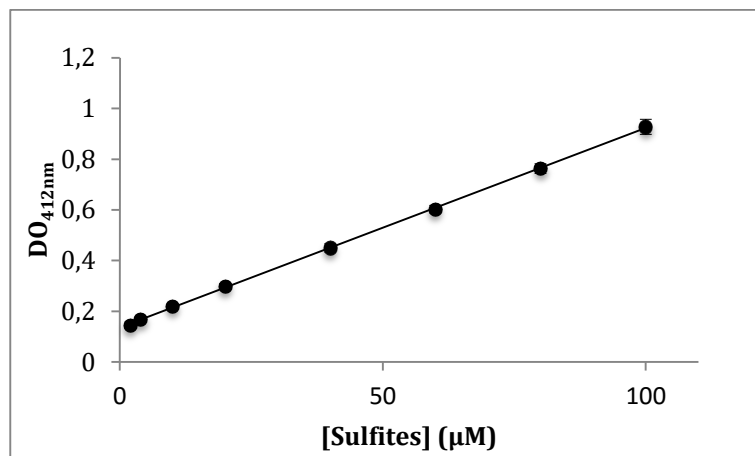
Dans le test couplé, le cétoacide généré à l'issue de la transamination principale étant le KG, nous avons choisi l'AspTA d'*E. coli* comme  $\beta$ ASTA auxiliaire pour la production de SO<sub>2</sub>. Cette enzyme présente l'avantage d'avoir un spectre de substrats très restreint, essentiellement limité aux aminoacides présentant une fonction acide en position  $\beta$  ou  $\gamma$  (Asp, Glu et analogues) ce qui permet de tester un large panel d'accepteurs, avec un risque mineur qu'ils soient substrats de l'AspTA. Il conviendra bien sûr de vérifier ce point avant d'effectuer un criblage avec le test couplé.

#### **1.1.1.1 Études préliminaires à l'utilisation du DTNB**

Avant de procéder à la mise au point des tests à proprement parler, nous avons évalué tout d'abord les performances du DTNB pour le dosage du SO<sub>2</sub> formé à partir de l'ACS en présence d'une TA. Si ce réactif semble en effet être un bon candidat pour le suivi des réactions de transamination dans le cadre de criblages à haut débit grâce à son faible coût, il convient tout de même de vérifier que son utilisation respecte bien les trois points suivants :

- La réaction entre les ions sulfite et le DTNB doit être quantitative et suffisamment rapide pour permettre un dosage en continu.
- La réaction de décomposition du  $\beta$ -cétoacide doit aussi être totale afin d'éviter toute perte de signal, et non limitante pour permettre le suivi en continu de la transamination.
- Aucune réaction ne doit avoir lieu directement entre le DTNB et l'ACS pour limiter le bruit de fond.

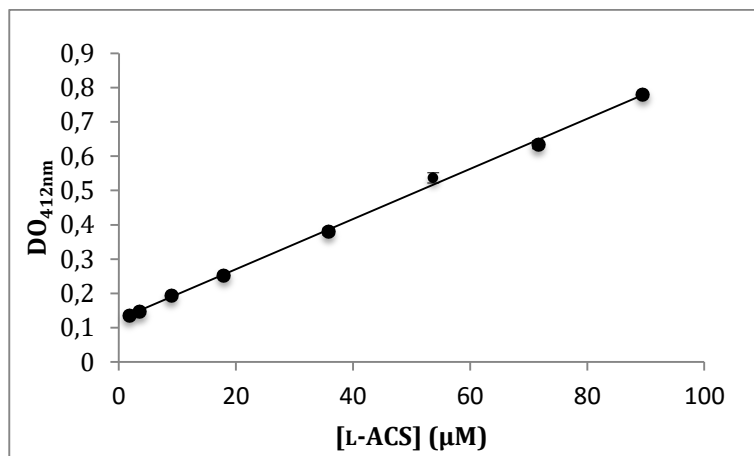
Afin de vérifier le premier des trois points nous avons réalisé un dosage direct de sulfites avec le réactif DTNB dans les conditions du test, c'est-à-dire en présence des différents composants à l'exception de l'ACS (2 mM KG, 0,05 mM PLP, 0,2 UI AspTA, 1 mM DTNB, 50 mM KPi, pH 7,5). Pour cela nous avons mesuré la variation de DO à 412 nm pendant 10 min après addition de NaHSO<sub>3</sub> (1 à 100  $\mu$ M final). Le Graphique 1 représente la DO mesurée pour chaque concentration en sulfite.



Graphique 1 : Densité optique mesurée à 412 nm en fonction de [NaHSO<sub>3</sub>].

La droite de calibration ainsi obtenue nous a permis de corrélérer la quantité de sulfites à l'intensité de la réponse spectrophotométrique. On notera que la DO mesurée à 412 nm est stable au cours du temps ce qui indique à la fois un dosage rapide des sulfites par le DTNB et également que l'ion thiolate responsable de la coloration est stable. Nous avons aussi observé une parfaite linéarité dans cette gamme de concentration qui nous a permis de mesurer, dans nos conditions, un coefficient d'extinction molaire de  $13322 \pm 136 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , proche de la valeur décrite dans la littérature ( $14150 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) pour l'anion thiolate formé à partir du DTNB. Cette expérience nous a aussi permis de calculer une limite de détection (LOD) des sulfites de  $1,7 \mu\text{M}$  ( $0,34 \text{ nmol}$ ) en appliquant la définition IUPAC ( $\text{LOD} = (3,3 \times \text{écart-type de l'ordonnée à l'origine}) / \text{pente}$ ). Les sulfites sont donc dosés de façon rapide, fiable et sensible dans les conditions de notre test.

Nous avons ensuite établi une droite de calibration de l'ACS ( $1\text{-}100 \mu\text{M}$ ) dans les conditions du test, en présence de l'AspTA d'*E. coli*, de KG et de DTNB. Comme précédemment, Nous avons mesuré la DO à 412 nm, stabilisée après 10 min (Graphique 2).



Graphique 2 : Densité optique mesurée à 412 nm en fonction de [L-ACS].

Ce graphique démontre, l'efficacité du dosage avec le DTNB pour le suivi de la réaction de transamination. Une excellente linéarité a en effet été observée entre 1 et 100 µM de L-ACS, et une LOD de 2,8 µM (0,56 nmol) a pu être mesurée. Un coefficient d'extinction molaire de  $12525 \pm 536 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  a été déterminé dans ce cas pour l'anion thiolate. La proximité avec les valeurs obtenues précédemment lors du dosage direct des sulfites démontre une conversion quantitative de l'ACS en SO<sub>2</sub>. En revanche, ces résultats ne prouvent pas le caractère non limitant des étapes consécutives à la transamination (élimination de SO<sub>2</sub>, hydratation de ce dernier et réaction des sulfites avec le DTNB). Ce point sera abordé, dans le chapitre suivant concernant la validation du test avec des réactions de transamination modèles.

Enfin, pour vérifier que le signal ne correspond pas à une réaction directe du DTNB avec l'ACS, nous avons réalisé un témoin négatif en absence d'AspTA. Cette expérience a été répétée 48 fois afin d'obtenir des résultats statistiquement représentatifs. Des variations de DO inférieures ou égales à 0,02 DO/min ont été mesurées dans tous les cas. Ce résultat confirme l'absence de réaction entre le DTNB et l'ACS et montre aussi qu'il n'y a pas de production de SO<sub>2</sub> en absence de TA.

### 1.1.1.2 Réactions de transamination modèles

Nous avons par la suite validé nos tests et évalué leurs performances en utilisant des réactions modèles de transamination. Afin d'obtenir une précision maximale pour les différents paramètres (LOD des TA, bruits de fond...), nous avons choisi de travailler avec des enzymes purifiées.

### 1.1.1.2.1 Modélisation du test direct avec l'AspTA

Pour mettre en œuvre le test direct, nous avons utilisé l'AspTA d'*E. coli* qui est produite et purifiée au laboratoire à partir d'une souche recombinante. Cette enzyme est en fait la seule TA décrite à ce jour comme acceptant le L-ACS comme substrat donneur (Schéma 70).

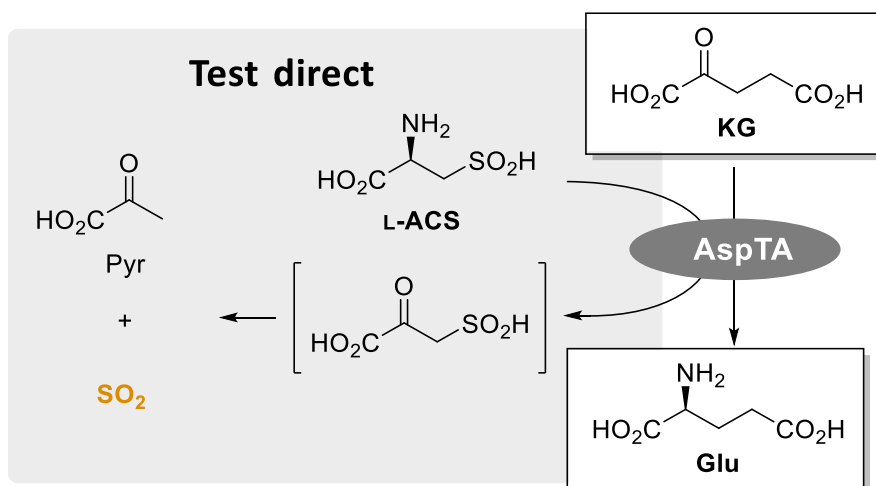
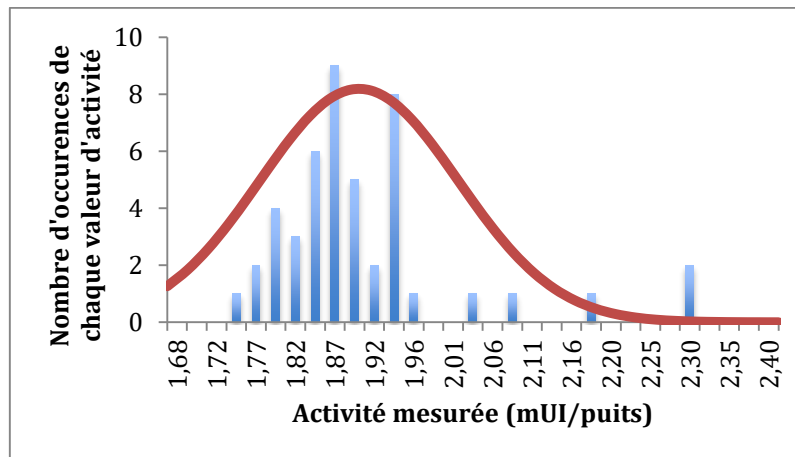


Schéma 70 : Réaction modèle pour le test direct des  $\alpha$ -TA.

Nous avons dans un premier temps réalisé un témoin positif. Pour cela, l'activité d'un lot d'AspTA a été mesurée avec un test classique au NADH (Asp utilisé comme donneur et couple MDH/NADH pour réduire l'OA formé à partir d'Asp) et une quantité fixe d'AspTA (2 mUI) a été introduite dans 48 essais de mesure d'activité avec le test direct au DTNB. Le Graphique 3 représente le nombre d'occurrences obtenu pour chaque valeur d'activité d'AspTA mesurée (après conversion de la DO mesurée en activité enzymatique), ainsi que la distribution de ces valeurs selon une loi normale.

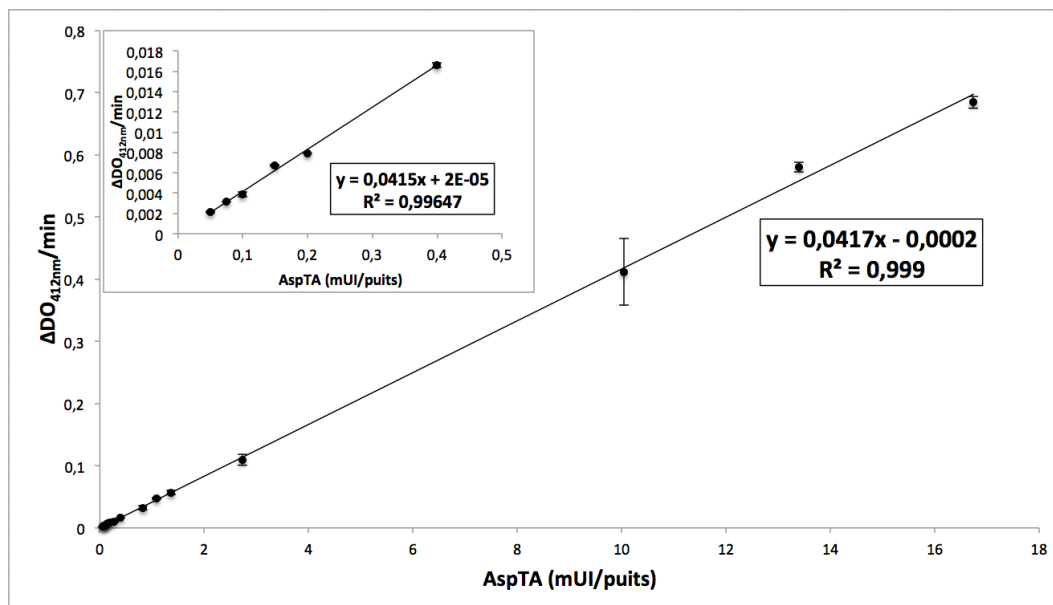
Nous avons donc mesuré avec le test direct une activité en AspTA de  $1,9 \pm 0,1$  mUI, ce qui, compte tenu de l'imprécision de la mesure,<sup>1</sup> démontre que ce test est équivalent au test classique utilisant le NADH.

<sup>1</sup> L'imprécision de la mesure a été estimée comme étant égale à 5%, à l'aide de la répétition de 96 dosages de sulfites avec le DTNB.



Graphique 3 : Activités mesurées avec le test direct dans les 48 essais du témoin positif.

Nous avons ensuite déterminé la LOD de l'AspTA avec le test direct. Pour cela, nous avons mesuré les variations de DO pour une gamme de 0,05 à 16 mUI d'AspTA (Graphique 4).



Graphique 4 : ΔDO/min à 412 nm en fonction de la quantité d'AspTA avec le test direct.

La valeur maximale de 16 mUI/puits d'AspTA utilisée dans cette expérience correspond à la DO maximale mesurable par le spectrophotomètre dans le minimum de temps requis pour effectuer le premier point de mesure dans les conditions expérimentales que nous avons choisies, soit une DO égale à 4 en 5 minutes. La LOD calculée à partir de ces résultats est de 0,01 mUI/puits. La gamme dynamique du test direct est donc excellente puisqu'elle couvre un rapport en activités mesurables de 1 à



1600. Ces résultats démontrent aussi que les réactions mises en jeu dans le test direct (élimination de SO<sub>2</sub>, hydratation et réaction des sulfites avec le DTNB), ne sont pas limitantes dans les conditions expérimentales que nous avons choisies.

Afin de confirmer les performances de ce test, nous avons ensuite comparé ces valeurs avec celles calculées pour un test plus conventionnel, basé sur la réduction du Pyr formé à partir de l'ACS avec le couple LDH/NADH (Schéma 71).

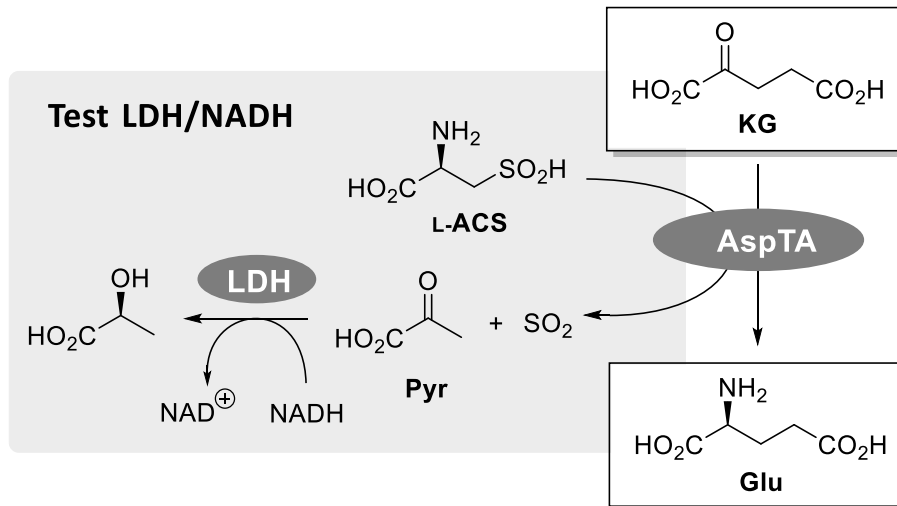
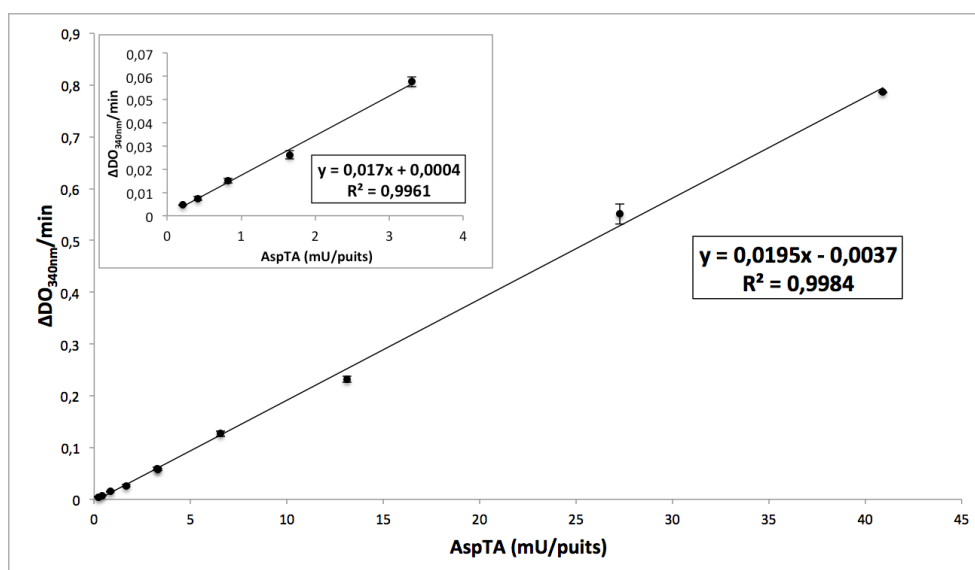


Schéma 71 : Test d'activité de l'AspTA basé sur l'utilisation de la LDH et du NADH.

Les résultats de ce test sur une gamme d'AspTA allant de 0,2 à 40 mUI/puits sont présentés dans le Graphique 5.



Graphique 5 : ΔDO/min à 340 nm en fonction de la quantité d'AspTA avec le test LDH/NADH.

Le coefficient d'extinction molaire du NADH étant plus faible que celui du thiolate formé à partir du DTNB ( $6220 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  contre  $14150 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) la valeur d'activité maximale mesurable est supérieure à celle du test direct. Par contre, la sensibilité est inférieure à celle mesurée précédemment, avec une LOD de 0,14 mUI/puits. Ainsi, la gamme dynamique s'échelonne de 1 à 257 et est donc 6 fois inférieure à celle calculée pour le test direct.

Afin de confirmer l'intérêt du test direct, nous l'avons enfin mis en œuvre pour la détermination des paramètres cinétiques de la réaction catalysée par l'AspTA. Les  $K_m$  et  $V_m$  de l'AspTA pour le L-ACS et le KG ont été mesurés selon la technique des  $K_m$  croisés qui consiste à mesurer la vitesse initiale de la réaction en faisant varier la concentration des 2 substrats, donneurs et accepteurs. Nous avons ainsi mesuré des  $K_m$  respectifs de  $1,0 \pm 0,1 \text{ mM}$  et  $10,2 \pm 0,4 \text{ mM}$  pour le KG et l'ACS et une valeur de  $k_{cat}$  de  $13742 \pm 653 \text{ min}^{-1}$ . En parallèle le test LDH/NADH a permis de mesurer des valeurs très proches ( $K_{mKG} = 0,6 \pm 0,1 \text{ mM}$ ,  $K_{mACS} = 6,5 \pm 1,5 \text{ mM}$  et  $k_{cat} = 11373 \pm 225 \text{ min}^{-1}$ ). Ces résultats démontrent donc clairement que l'AspTA n'est pas affectée par la présence du DTNB et confirme l'intérêt du test direct pour la détermination des paramètres cinétiques des  $\beta$ ASTA.

#### **1.1.1.2.2 Modélisation du test couplé avec la BCAT et l'AspTA**

Notre technique de dosage étant validée avec le test direct, nous avons ensuite évalué les performances du test couplé applicable pour l'étude d'une plus grande variété d' $\alpha$ -TA. Pour cela, nous avons choisi comme réaction modèle, la transamination entre le Glu et l'acide 4-méthyl-2-oxopentanoïque (MOPA) catalysée par la BCAT d'*E. coli*. (Schéma 72). La BCAT n'accepte pas l'ACS comme donneur et le MOPA ne constitue pas un substrat de l'AspTA utilisé comme enzyme auxiliaire.

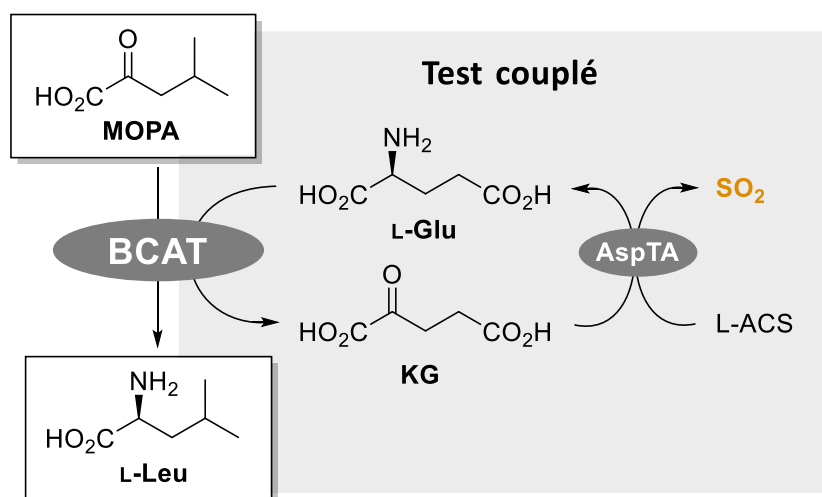
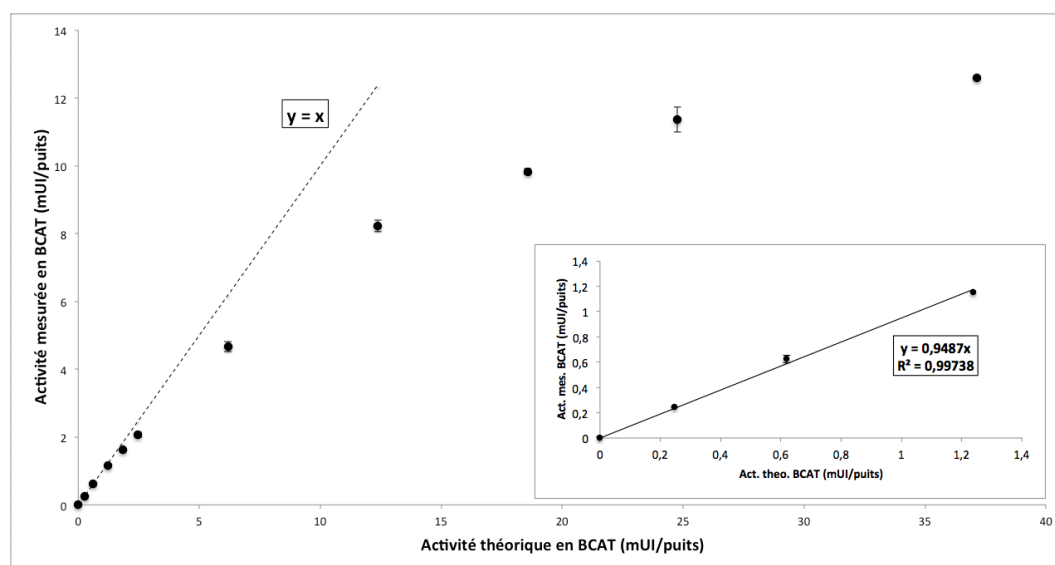


Schéma 72 : Réaction modèle pour le test couplé des  $\alpha$ -TA.

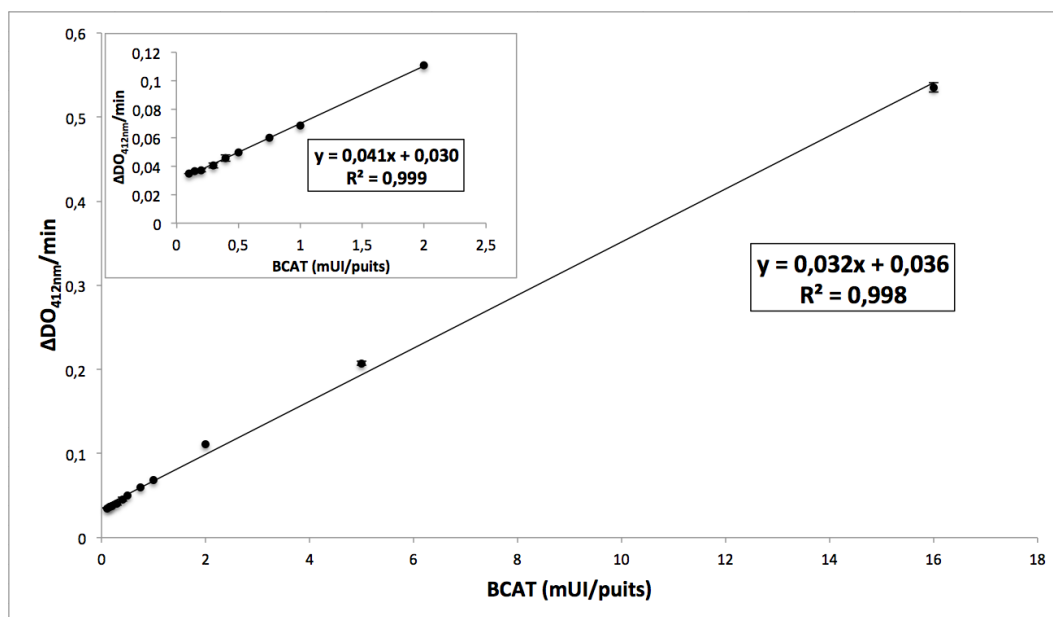
Nous avons tout d'abord déterminé la quantité d'AspTA nécessaire pour avoir une réaction auxiliaire non limitante par rapport à la réaction catalysée par la BCAT. Pour cela, l'activité d'un lot de BCAT a été déterminée avec un test classique (Glu utilisé comme donneur et couple GluDH/NADH utilisé pour la régénération du Glu en présence d'ions ammonium), puis les variations de DO à 412 nm ont été mesurées en utilisant une gamme de 0,25 à 37 mUI de BCAT par puits, et une quantité fixe de 20 mUI/puits d'AspTA. Le Graphique 6 présente la courbe de corrélation entre l'activité réelle (mesurée avec le test GluDH/NADH) et l'activité mesurée avec le test couplé dans ces conditions expérimentales.



Graphique 6 : Corrélation entre activité réelle et activité mesurée de la BCAT dans les conditions du test couplé (20 mUI d'AspTA).

Cette courbe reste proportionnelle jusqu'à 1 mUI/puits au moins, ce qui suggère qu'un excès de 20 fois en enzyme auxiliaire est suffisant pour pouvoir mesurer précisément l'activité de l'enzyme principale dans ces conditions.

Nous avons ensuite calculé la LOD et la gamme dynamique du test couplé. Pour cela, la variation de DO à 412 nm a été mesurée pour une gamme de 0,1 à 16 mUI/puits de BCAT en présence d'une quantité non limitante de 2 UI d'AspTA (Graphique 7).



Graphique 7 : ΔDO/min à 412 nm en fonction de la quantité de BCAT avec le test couplé.

Pour les raisons déjà citées lors de la mise au point du test direct, l'activité maximale mesurable est ici encore de 16 mUI/puits. La valeur de LOD calculée pour ce test couplé étant de 0,05 mUI/puits, nous avons pu déterminer une gamme dynamique correspondant à un rapport en activités mesurables de 1 à 320. Nous avons ensuite, comme pour le test direct, comparé ces valeurs avec celles mesurées avec le test GluDH/NADH (Schéma 73).

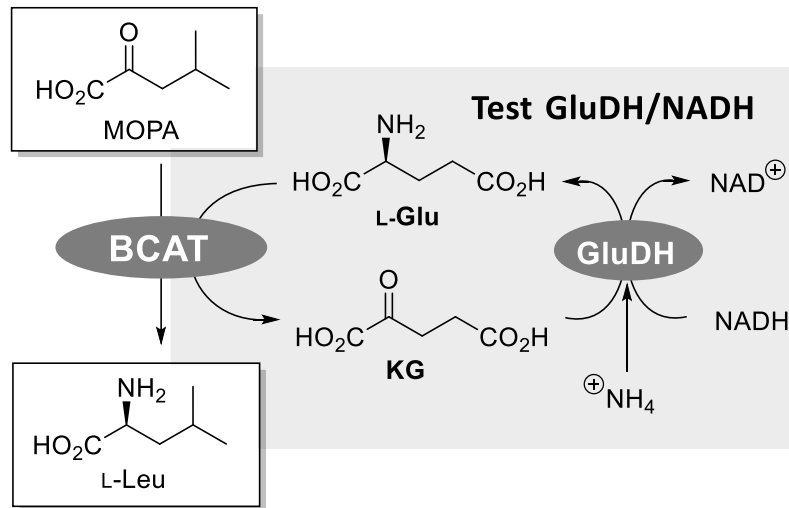
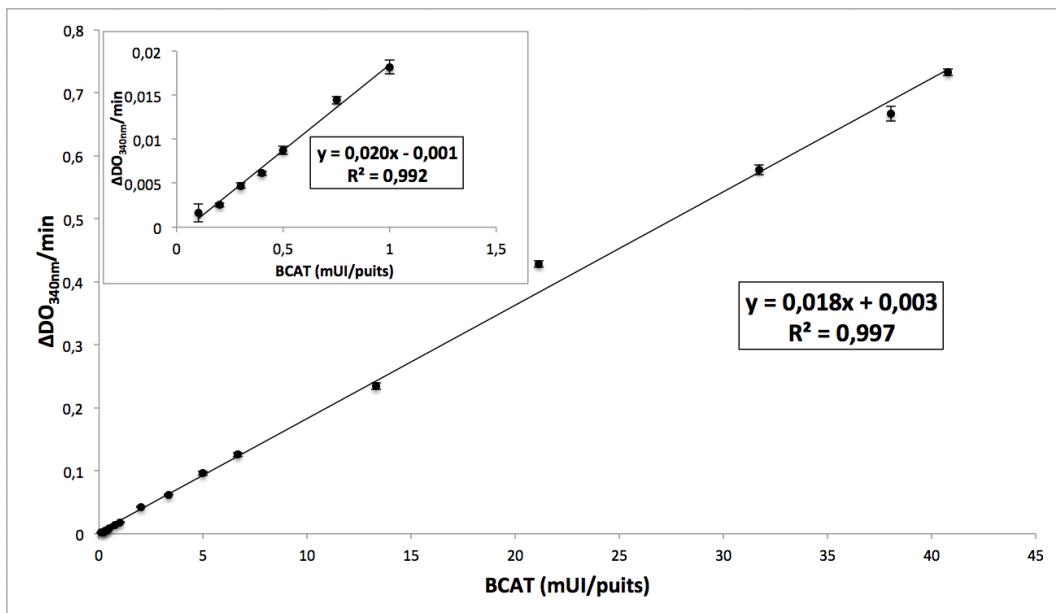


Schéma 73 : Test d'activité de la BCAT basé sur l'utilisation de la GluDH et du NADH.

En mesurant la variation de DO à 340 nm pour une gamme de BCAT de 0,1 à 40 mUI/puits (Graphique 8), nous avons pu déterminer une LOD de 0,08 mUI/puits pour ce test. Cette valeur est supérieure à celle mesurée avec le test couplé qui s'avère donc plus sensible. Cependant le test GluDH/NADH permet de mesurer des activités supérieures et présente donc une gamme dynamique correspondant à un rapport de 1 à 500 qui est donc du même ordre qu'avec le test couplé.



Graphique 8 : ΔDO/min mesuré à 340 nm en fonction de la quantité de BCAT avec le test GluDH/NADH.

Enfin, nous avons montré que le test couplé est applicable pour la détermination de paramètres cinétiques. Un  $K_{m_{app}}$  de  $0,33 \pm 0,02$  mM a été mesuré pour le MOPA en présence de Glu 50 mM associé à un  $k_{cat}$  de  $268 \pm 5$  min<sup>-1</sup>. Ici encore des valeurs proches ( $K_{m_{app}} = 0,14 \pm 0,01$  mM et  $k_{cat} = 365 \pm 11$  min<sup>-1</sup>) ont été mesurées avec le test GluDH/NADH. L'ensemble des résultats obtenus pour la mise au point des tests directs et couplés est compilé dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Paramètres calculés lors de la mise au point des nouveaux tests de criblage pour les  $\alpha$ -TA.

Tests	LOD (mUI/puits)	$K_{m_{accepteur}}$ (mM)	$K_{m_{donneur}}$ (mM)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )
$\begin{array}{c} \text{KG} + \text{L-CSA} \xrightarrow{\text{AspAT}} \text{L-Glu} + \text{Pyr} + \text{SO}_2 \\ \text{accepteur} \quad \text{donneur} \end{array}$				
Test direct au DTNB	0.01	$1.0 \pm 0.1$	$10.2 \pm 0.4$	$13742 \pm 653$
Test LDH/NADH	0.14	$0.6 \pm 0.1$	$6.5 \pm 1.5$	$11373 \pm 225$
$\begin{array}{c} \text{MOPA} + \text{L-Glu} \xrightarrow{\text{BCAT}} \text{L-Leu} + \text{KG} \\ \text{accepteur} \quad \text{donneur} \end{array}$				
Test couplé au DTNB	0.05	$0.33 \pm 0.02$	Nd <sup>a</sup>	$268 \pm 5$
Test GluDH/NADH	0.08	$0.14 \pm 0.01$	Nd <sup>a</sup>	$365 \pm 11$

<sup>a</sup> Non déterminé

Ces différentes expériences nous ont permis de démontrer que les 2 tests directs et couplés utilisant l'ACS sont très performants pour l'étude d'une grande variété d' $\alpha$ -TA. De très nombreux substrats accepteurs peuvent être testés, sous réserve qu'ils ne soient pas substrats de l'AspTA utilisé comme enzyme auxiliaire dans le test couplé. De plus l'utilisation de D-ACS et de D-Glu permettra d'étudier des enzymes appartenant à la classe des D- $\alpha$ -TA.

### 1.1.2 Tests d'activité pour les amine-TA

Afin de rendre cette nouvelle approche applicable à l'étude des amine-TA, nous avons pensé substituer l'ACS par un autre  $\beta$ AS qui soit un substrat donneur potentiel des amine-TA. Nous avons ainsi choisi l'hypotaurine (HPT) et la méthylhypotaurine (MHPT) (Figure 19).



Figure 19 : Structures de l'hypotaaurine (HPT) et de la méthylhypotaaurine (MHPT).

En utilisant ces composés comme donneurs d'amine primaires dans un test direct (Schéma 74a), il est possible de détecter l'activité d'un nouveau type de  $\beta$ ASTA: des amine-TA actives avec des  $\beta$ -aminoacides. L'HPT étant achirale, nous devrions détecter indifféremment des (*R*)- ou (*S*)-amine-TA. Par contre, l'utilisation de (*R*)- ou (*S*)-MHPT comme  $\beta$ AS devrait permettre de détecter des TA présentant des stéréosélectivités complémentaires. Ces nouvelles amine- $\beta$ ASTA devraient permettre un déplacement aisé de l'équilibre réactionnel en utilisant un  $\beta$ AS ou alternativement, un acide carboxylique  $\beta$ -aminé.

Dans le but de disposer d'un test plus général pour l'ensemble des amine-TA, nous avons aussi élaboré un test couplé, qui utilise cette fois l'Ala comme donneur d'amine primaire (Schéma 74b). Concernant le choix de la réaction auxiliaire, deux possibilités ont été envisagées. La première, qui constitue le pendant du test couplé pour les  $\alpha$ -TA, est basée sur l'utilisation d'une amine-TA utilisant l'HPT comme donneur (HypoTA) pour régénérer l'Ala. La seconde consiste à utiliser une  $\beta$ ASTA de type  $\alpha$ -TA. Dans ce cas, l'utilisation de l'ACS comme  $\beta$ AS est alors possible si la  $\beta$ ASTA possède une activité pyruvate-ACS-transaminase (PyrASTA).

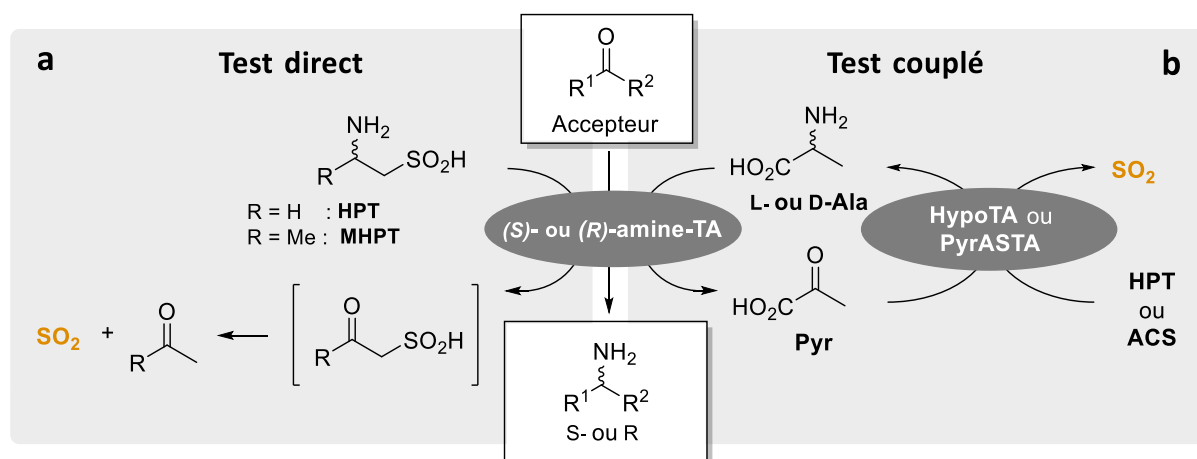


Schéma 74 : Tests direct (a) et couplés (b) permettant l'étude des amine-TA.

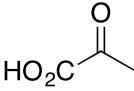
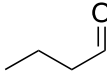

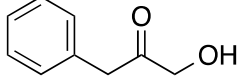
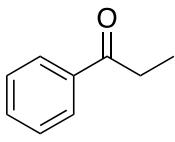
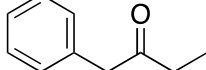
Les avantages et les inconvénients de chacune de ces deux méthodes seront présentés par la suite lors de leur mise au point.

### 1.1.2.1 Tests direct pour les amine-TA

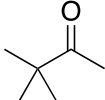
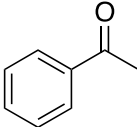
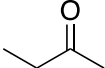
Pour la mise au point du test direct permettant l'étude des amine-TA, nous avons considéré que l'élimination de SO<sub>2</sub> à partir du β-cétoacide formé à partir de l'HPT était rapide et quantitative, comme pour l'ACS. Nous avons donc choisi une réaction modèle pour déterminer les performances du test (LOD et gamme dynamique).

Notre choix s'est porté sur une amine-TA de *Caulobacter crescentus* (Q9A3Q9 dans la base UniProt) décrite dans la littérature comme acceptant l'homoalanine, l'analogue carboxylique de l'HPT.<sup>234</sup> Cette enzyme a alors été clonée et surexprimée dans les laboratoires du Génoscope avec addition d'un Tag-6-His pour faciliter sa purification. Nous avons alors pu vérifier son activité pour l'HPT et étudier son spectre de substrats accepteurs avec le test direct utilisant l'HPT et le DTNB. Les résultats obtenus avec divers substrats carbonylés sont présentés dans le Tableau 11 sous la forme d'activités relatives par rapport à l'activité maximale mesurée avec le Pyr.

Tableau 11 : Activités relatives de Q9A3Q9 avec l'HPT et divers accepteurs carbonylés.

Accepteur	Structure	% d'activité
Pyruvate		100%
Butanal		25%
Acétaldéhyde		2%
1-Hydroxy-3-phénylpropan-2-one		1%
1-Phénylpropan-1-one		1%
1-Phényl-2-butanone		<1%



3,3-Diméthyl-2-butanone		<1%
Acétophénone		<1%
Butanone		<1%

Parmi les substrats testés, seuls le Pyr et le butanal sont de bons substrats pour cette enzyme. Nous avons donc choisi la transamination entre l'HPT et le Pyr comme réaction modèle (Schéma 75).

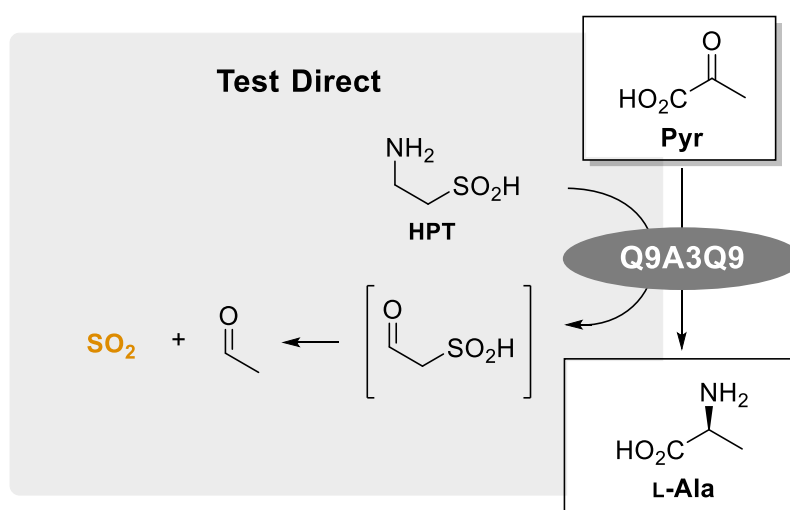
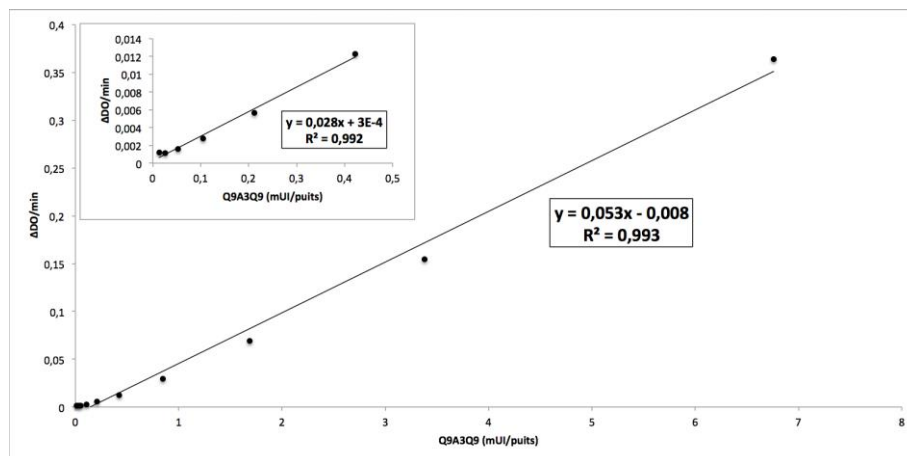


Schéma 75 : Réaction modèle pour le test direct des amine-TA avec l'enzyme Q9A3Q9.

La LOD de cette activité a alors été calculée en mesurant les variations de DO à 412 nm en présence de HPT, de Pyr, de DTNB et d'une gamme de concentration de Q9A3Q9 de 0,02 à 7 mUI (Graphique 9).



Graphique 9 :  $\Delta DO/min$  à 412 nm en fonction de la quantité de Q9A3Q9 avec le test direct.

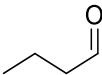


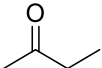
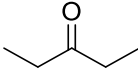
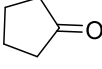
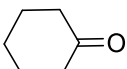
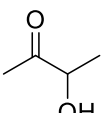
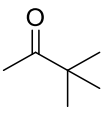

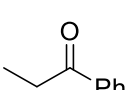
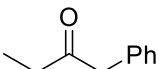
Nous avons ainsi obtenu une valeur de LOD de 0,02 mUI/puits. L'activité maximale mesurable étant toujours de 16 mUI/puits, la gamme dynamique s'échelonne donc dans un rapport d'activité de 1 à 800. Ces résultats sont donc très proches de ceux obtenus pour le test direct des  $\alpha$ -TA et ils confirment que l'HPT se comporte comme l'ACS en produisant un cétoacide instable rapidement décomposé en acétaldéhyde et  $SO_2$ .

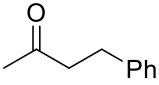
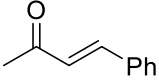
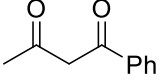
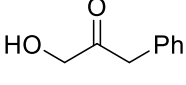
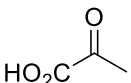
### 1.1.2.2 Test couplé pour les amine-TA utilisant l'Hypotaourine

Comme nous l'avons évoqué précédemment, il est important que la TA utilisée comme auxiliaire présente un spectre de substrat étroit afin de ne pas interférer avec la réaction de transamination principale qui doit permettre de tester une variété d'accepteurs. Ainsi la Q9A3Q9 nous est apparue comme un bon candidat pour développer le test couplé des amine-TA. D'autant plus qu'elle ne présente qu'une faible activité pour l'acétaldéhyde issu de la transamination de l'HPT, et qu'elle permet donc de déplacer l'équilibre de la même manière que l'AspTA avec l'ACS lors du test couplé pour les  $\alpha$ -TA. Concernant la réaction principale, nous avons dans un premier temps choisi comme TA modèle, l'amine-TA de *Chromobacterium violaceum* (Q7NWX4, UniProt). Celle-ci a en effet été décrite à de maintes reprises comme acceptant la L-Ala et un large spectre d'accepteurs. Elle est par ailleurs dépourvue d'activité pour l'HomoAla et donc vraisemblablement pour l'HPT. Cette enzyme a donc été clonée, taguée et surexprimée au Génoscope. Afin de choisir un bon substrat accepteur pour notre réaction modèle, nous avons commencé par mesurer l'activité de Q7NWX4 en présence de L-Ala et de 16 accepteurs différents en utilisant le test LDH/NADH. Les mêmes substrats ont aussi été évalués avec la Q9A3Q9 et le test direct utilisant l'HPT, afin

d'identifier un substrat transformé de façon sélective par la Q7NWG4. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 12 sous la forme d'activités relatives par rapport à l'activité mesurée avec le butanal.

Tableau 12 : Activités relatives de Q7NWG4 et Q9A3Q9 avec différents accepteurs<sup>a</sup>

Accepteur	Structure	Activité relative de Q7NWG4 (%)	Activité relative de Q9A3Q9 (%)
Butanal		<b>100</b>	<b>100</b>
Acétaldéhyde		<b>1</b>	<b>11</b>
Acétone		<b>1</b>	<1
Butanone		<1	<1
3-pentanone		<1	<1
Cyclopentanone		<b>1</b>	<1
Cyclohexanone		<b>2</b>	<1
3-hydroxy-2-butanone		<1	<b>1</b>
diméthylbutanone		<1	<1
Acétophénone		<1	<1
Propiophénone		<1	<1
1-phénylbutan-2-one		<b>1</b>	<1

4-phénylbutan-2-one		<1	<1
4-Phényl-3-butèn-2-one		<1	<1
1-phénylbutane-1,3-dione		<1	<1
1-hydroxy-3-phénylpropan-2-one		<1	<b>2</b>
Acide pyruvique		-	<b>372</b>

<sup>a</sup> Les accepteurs ont tous été testés à 2 mM ; L'Ala (20 mM) a été utilisée dans le test LDH/NADH avec la Q7NWX4, l'HPT (20 mM) a été utilisée comme donneur avec la Q9A3Q9.

L'analyse de ces résultats montre qu'aucun substrat testé n'est un bon candidat pour la réaction modèle. En effet, seule la cyclohexanone est transformée sélectivement en présence de Q7NWX4 mais cette dernière présente une activité très faible ne permettant pas l'évaluation des performances du test couplé dans de bonnes conditions.

Pour pallier ce problème, nous avons finalement décidé d'utiliser comme réaction modèle la transamination entre le KG et l'Ala catalysée par une  $\alpha$ -TA (Schéma 76). Après avoir vérifié que le KG n'est pas substrat de l'enzyme auxiliaire Q9A3Q9, nous avons choisi comme TA principale une enzyme issue de nos premiers criblages (qui seront présentés plus loin dans ce rapport) et dénommé A4A10 (en fonction de sa position (A10) sur la plaque 4 de la collection A). Cette enzyme catalyse en effet de façon efficace la réaction de transamination modèle, entre le KG et l'Ala et est, par ailleurs, dénuée d'activité vis-à-vis de l'HPT.

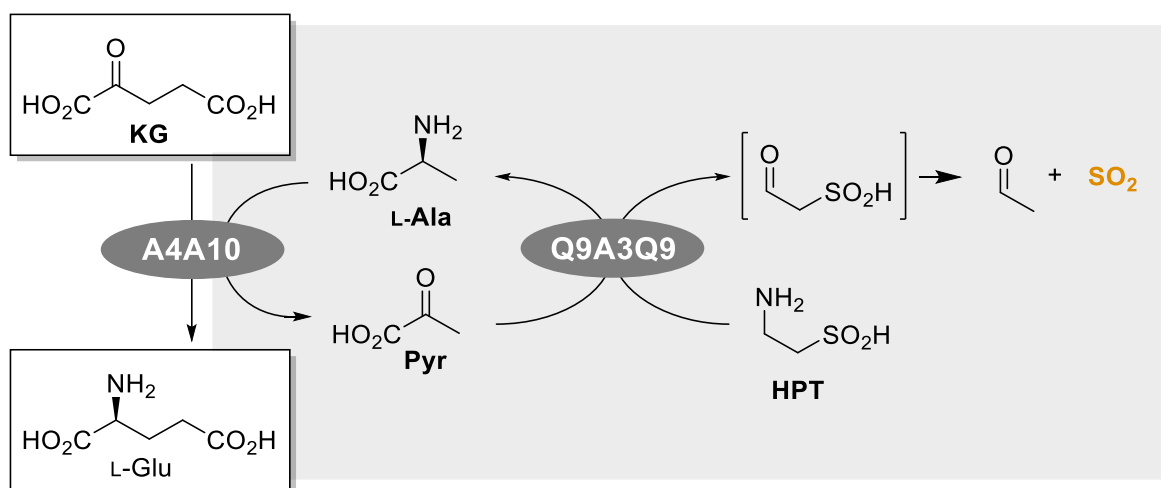
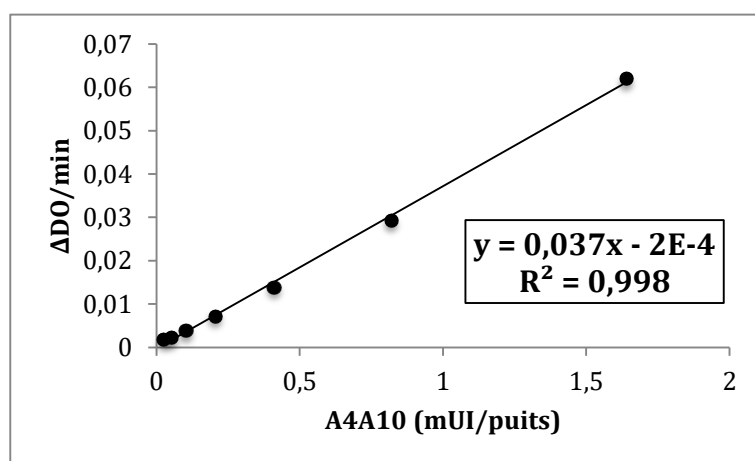


Schéma 76 : Réaction modèle pour le test couplé des amine-TA utilisant l'HPT.

La TA A4A10 a donc été clonée avec addition d'un Tag-6-His, surexprimée et purifiée pour l'étude des performances du test couplé utilisant l'HPT. Nous avons tout d'abord vérifié que la réaction auxiliaire était non limitante avec une activité en enzyme auxiliaire 20 fois supérieure à celle de l'enzyme principale, puis nous avons réalisé une droite de calibration en mesurant la variation de DO à 412 nm en présence de KG, d'Ala, de Q9A3Q9, d'HPT, de DTNB, et d'une quantité variable de A4A10 (Graphique 10).



Graphique 10 :  $\Delta\text{DO}/\text{min}$  à 412 nm en fonction de la quantité de A4A10 dans le test couplé avec HPT.

Nous avons calculé une LOD de 0,06 mUI/puits, et avons ainsi confirmé que ce test couplé présente des performances similaires à celui développé pour les  $\alpha$ -TA, avec une gamme dynamique permettant la mesure d'un rapport d'activité allant de 1 à environ 300. Cependant, lors de la mise au point de ce test, nous avons noté une instabilité de

l'enzyme auxiliaire Q9A3Q9, ce qui la rend difficilement utilisable pour un criblage à grande échelle d'amine-TA. Pour pallier ce problème, il sera donc intéressant de trouver une nouvelle HypoTA plus stable qui puisse être utilisée comme enzyme auxiliaire. La recherche de cette enzyme se fera à l'aide du test direct en utilisant l'HPT comme donneur.

### 1.1.2.3 Test couplé pour les amine-TA utilisant l'ACS

Nous avons exploré une seconde approche pour la mise au point d'un test couplé pour les amines-TA. Cette approche repose sur l'utilisation d'une PyrASTA comme enzyme auxiliaire, c'est-à-dire une enzyme catalysant efficacement la réaction de transamination entre le Pyr (généralisé lors de la réaction de transamination principale) et l'ACS. Cette enzyme auxiliaire doit avoir un spectre de substrat le plus étroit possible vis-à-vis des accepteurs afin de ne pas interférer avec la réaction de transamination principale (Schéma 77).

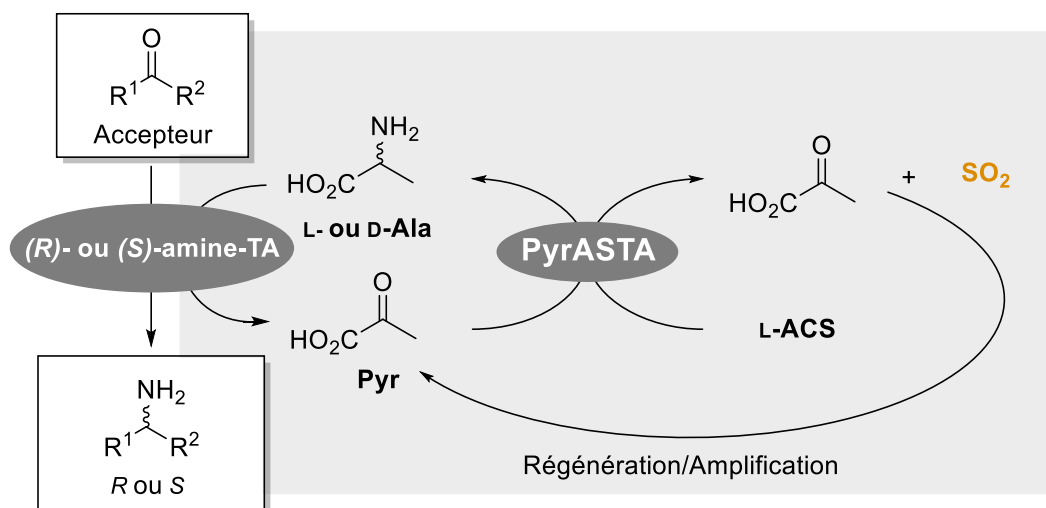


Schéma 77 : Principe du test couplé des amine-TA utilisant l'ACS.

Dans ce test, en plus de la régénération de l'Ala et de la production de  $SO_2$  détectable, la réaction auxiliaire permet aussi de régénérer le Pyr. Cette transamination auxiliaire ne permet donc pas un déplacement d'équilibre. Par contre elle offre la possibilité d'une amplification du signal. En effet, l'accumulation du Pyr va induire l'augmentation de l'activité de la PyrASTA et donc de la production de  $SO_2$ . La variation de DO en fonction du temps ne devrait donc plus être linéaire puisqu'elle dépend à la fois de l'activité de l'enzyme principale qui est, à priori, stable au cours du temps

(conditions de vitesse initiale) mais aussi de celle de l'enzyme auxiliaire (PyrASTA) qui augmente lorsque le Pyr s'accumule dans le milieu réactionnel. On peut donc théoriquement s'attendre à une accélération initiale de la production de  $\text{SO}_2$  suivie d'une phase stationnaire caractérisée par une augmentation linéaire du signal. Cette phase stationnaire peut avoir 2 origines. D'une part, la concentration en Pyr peut atteindre la limite de saturation de l'enzyme auxiliaire qui fonctionne alors à vitesse constante ( $V_{\text{max}}$ ). Cette possibilité est cependant très limitée compte tenu de la limite de saturation du spectrophotomètre correspondant à une concentration maximale de 0,5 mM de Pyr. D'autre part, la transamination principale peut atteindre un état d'équilibre impliquant une concentration fixe de Pyr. Ce dernier cas peut notamment être rencontré dans le cas d'amine-TA catalysant des réactions thermodynamiquement défavorables, pour lesquelles un état d'équilibre sera rapidement atteint pour de faibles concentrations en Pyr. (Figure 20). La pente de la droite devrait alors refléter l'activité de l'enzyme auxiliaire pour la concentration en Pyr atteinte à l'équilibre, ce qui pourrait permettre de quantifier cette concentration et par conséquent d'estimer la constante d'équilibre de la réaction de transamination principale.

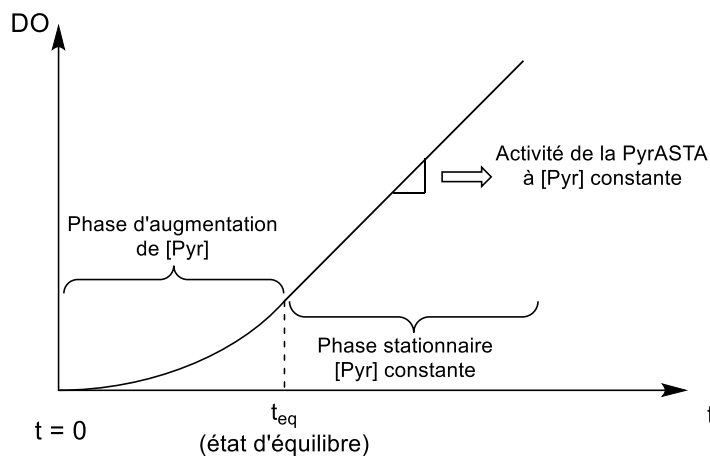


Figure 20 : Principe du test couplé des amine-TA utilisant l'ACS.

Grâce à ce système de régénération du Pyr et d'amplification du signal, ce test couplé pourrait donc permettre de détecter des activités très faibles et éventuellement de quantifier les constantes d'équilibre de réactions thermodynamiquement défavorables.

Afin de pouvoir valider le principe de ce test et évaluer son applicabilité, nous avons mené une série d'expériences décrites ci-après.

### 1.1.2.3.1 Choix d'une réaction modèle

Nous avons tout d'abord fait le choix d'utiliser comme enzyme auxiliaire l'enzyme A4A10 issue du criblage des  $\alpha$ -TA avec le L-ACS. Ce choix a été motivé par plusieurs éléments. Comme nous le verrons par la suite, A4A10 est une enzyme thermostable avec une bonne activité spécifique et qui tolère la présence de solvants organiques (DMSO) souvent nécessaire pour solubiliser des substrats hydrophobes. Le choix d'une  $\alpha$ -TA permet, de plus, d'avoir une orthogonalité entre réaction principale et auxiliaire : la A4A10 n'admet que des cétoacides comme substrats accepteurs et une grande variété de cétones et d'aldéhydes peuvent donc être testés dans la réaction principale sans risque d'interférence avec la réaction auxiliaire. Pour la réaction principale, nous avons choisi la transamination entre le butanal et l'Ala, catalysée par la Q7NWG4 déjà envisagée pour le test couplé utilisant l'HPT (Schéma 78).

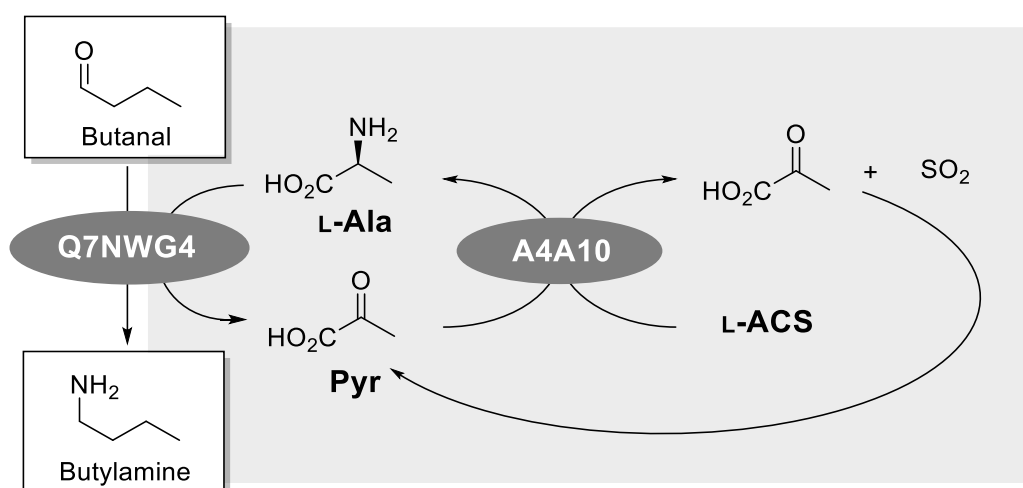


Schéma 78 : Réaction modèle pour le test couplé des amine-TA, utilisant l'ACS.

Nous avons vérifié que l'amine-TA principale n'avait aucune activité en présence d'ACS et que l' $\alpha$ -TA auxiliaire n'acceptait pas le butanal comme substrat accepteur. Au cours des premiers essais nous avons rapidement été confrontés à un problème de bruit de fond important en absence d'accepteur et/ou de l'amine-TA principale. Afin de comprendre l'origine de ce problème, nous avons mené des expériences dont les résultats font l'objet des paragraphes suivants.

### 1.1.2.3.2 Origine du bruit de fond

Plusieurs séries de mesures ont été faites en absence de butanal et d'amine-TA. Nous avons tout d'abord observé que le bruit de fond augmente avec la concentration en



enzyme auxiliaire. Nous avons aussi noté une accélération de la production de SO<sub>2</sub>, vraisemblablement liée à une augmentation de la concentration en Pyr dans le milieu (Figure 20). Par ailleurs, en absence de PLP ajouté, la variation de DO est linéaire et la vitesse d'apparition du SO<sub>2</sub> est très nettement inférieure à la vitesse moyenne mesurée après ajout de PLP. Nous avons alors formulé l'hypothèse que la PyrASTA A4A10 pourrait catalyser une transamination entre l'ACS et le PLP conduisant à la production de Pyr, de SO<sub>2</sub> et de PMP. Le PMP formé à partir du PLP au cours de la réaction de transamination pourrait ainsi être libéré du site actif et remplacé par une molécule de PLP assurant ainsi un cycle catalytique (Schéma 79). Une TA capable de produire du PMP à partir du PLP en présence d'un donneur d'amine a déjà été décrite dans la littérature.<sup>235</sup> Cette réaction se superposerait à la transamination en chaîne entre le Pyr produit à partir de l'ACS et l'ACS lui-même. Cette hypothèse expliquerait donc l'accélération de la production de SO<sub>2</sub> que nous avons observée. La linéarité du signal observée en absence de PLP ajouté proviendrait d'une concentration fixe en Pyr initialement généré à partir du PLP présent dans le site actif de la TA.

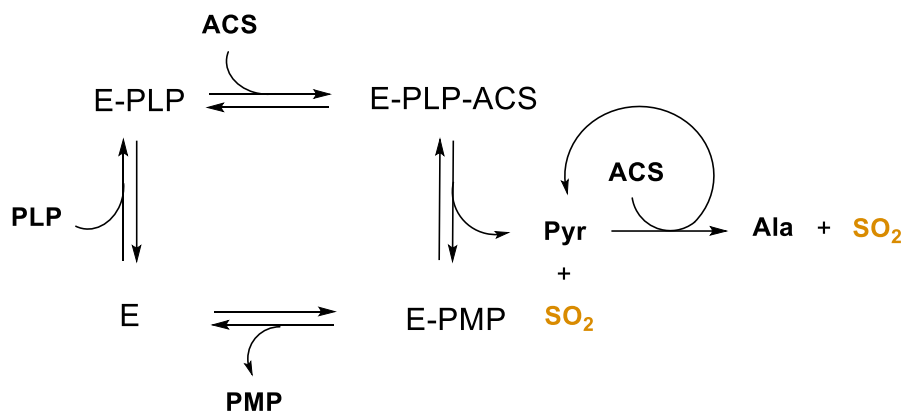
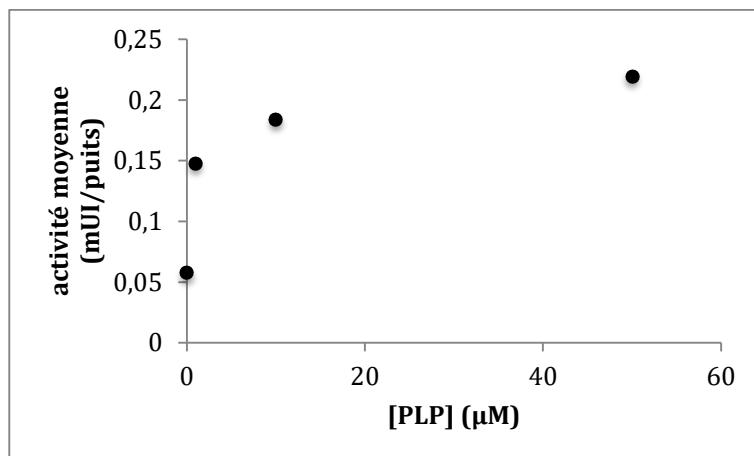


Schéma 79 : Hypothèse expliquant le bruit de fond observé en absence d'accepteur.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons mesuré la vitesse moyenne de production de SO<sub>2</sub> en fonction de la quantité de PLP (Graphique 11). On observe bien une corrélation entre les deux paramètres et un tassement à forte concentration traduisant sans doute un phénomène de saturation. Ces résultats ont été obtenus avec une quantité d'enzyme correspondant à une activité de 0,1 mUI/puits (réaction Pyr + ACS). Cette activité parasite de transamination du PLP correspond donc à 0,2 % de l'activité PyrASTA.



Graphique 11 : Production de SO<sub>2</sub> avec A4A10 en absence d'accepteur et à [PLP] variable.

Par ailleurs, nous avons essayé de supprimer le bruit de fond en éliminant le PLP de la préparation de A4A10. Pour cela, nous avons mis l'enzyme en présence d'Ala, de LDH et de NADH, afin de convertir le PLP présent dans le site actif en PMP (Schéma 80). La TA a ensuite été purifiée par IMAC avant d'être engagée dans de nouveaux essais. Nous avons ainsi observé une diminution d'un facteur 5 du bruit de fond qui n'a cependant pas été complètement éliminé. Il est probable que la réduction du Pyr avec le couple LDH/NADH n'ait pas permis de déplacer de façon complète l'équilibre de la réaction de transamination.

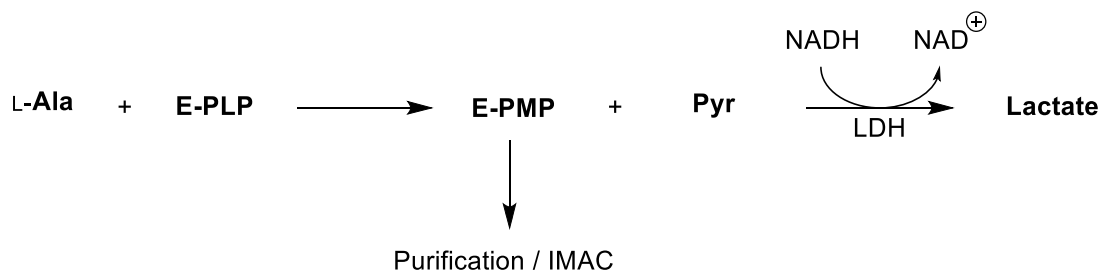


Schéma 80 : Préparation de la TA A4A10 sous forme E-PMP.

L'élimination du PLP n'est cependant pas applicable dans le cadre du criblage car de très nombreuses TA nécessitent un ajout de PLP dans le milieu pour garantir une activité optimale.

### 1.1.2.3.3 Optimisation du test couplé utilisant l'ACS

Nous avons cherché à optimiser les quantités de PLP et de PyrASTA afin de minimiser le bruit fond tout en préservant une réponse maximale et une gamme dynamique la plus large possible.

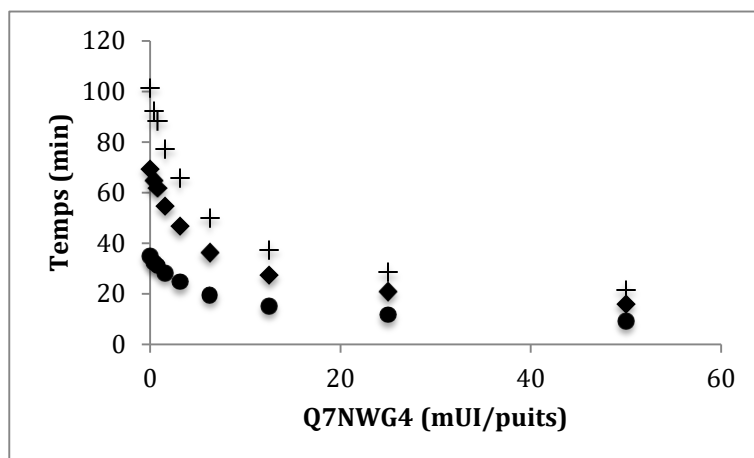
Nous avons tout d'abord quantifié l'apparition de SO<sub>2</sub> pendant 30 min en présence de butanal et d'ACS et en testant plusieurs combinaisons de concentrations pour les 2 TA (Q7NWG4 et A4A10). Les vitesses maximales obtenues, résumées dans le Tableau 13, nous ont permis de conclure qu'une activité de 20 mUI/puits d'enzyme auxiliaire ne permet pas de mesurer une activité de 1mUI/puits d'enzyme principale (entrées 2 et 4). En effet, dans ces conditions, le signal n'est pas distinguable du bruit de fond sans TA auxiliaire. Par contre l'addition de 200 mUI/puits de A4A10 permet bien de mesurer une activité de 1 mUI/puits de Q7NWG4 (entrées 1 et 5). On peut voir aussi que le signal est bien corrélé à la quantité d'enzyme principale (entrées 4/6 et 5/7). Notre objectif lors du criblage étant de mesurer des activités  $\leq 1$  mUI/puits, nous avons donc opté pour une quantité de 0.2 UI/puits d'enzyme auxiliaire.

Tableau 13 : Vitesses maximales sur 30 min. ( $\Delta DO_{\max}/\min \times 10^2$ ) avec différentes quantités de TA.

Entrée	TA principale Q7NWG4 (mUI/puits)	TA auxiliaire A4A10 (mUI/puits)	$\Delta DO_{\max}/\min$ ( $\times 10^2$ )
1	0	200	0,85
2	1	0	0,15
3	10	0	0,15
4	1	20	0,14
5	1	200	1,38
6	10	20	0,85
7	10	200	7,51

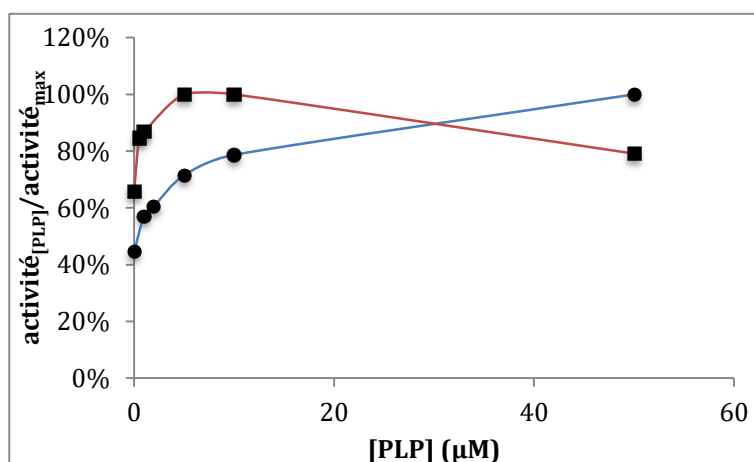
À ce stade, nous avons établi une première courbe de calibration avec 200 mUI/puits de A4A10 et 50  $\mu$ M de PLP afin d'estimer la gamme d'activité mesurable dans ces conditions. Pour cela, nous avons choisi de mesurer le temps nécessaire pour

atteindre une variation de DO ( $\Delta DO$ ) égale à 1, 2 ou 3 avec diverses quantités de Q7NWG4 (0,4 à 50 mUI/puits) (Graphique 12).



Graphique 12 : Temps pour atteindre un  $\Delta DO$  de 1 (●), 2 (◆), et 3 (+) à différentes [Q7NWG4].

On constate tout d'abord que la gamme de temps mesurée est bien plus large si l'on fixe un  $\Delta DO$  de 3. Bien que cela apporte une meilleure résolution, le temps d'analyse nécessaire pour les petites activités est relativement long (environ 90 min). Nous avons donc préféré nous orienter vers des temps d'analyse plus courts en fixant un  $\Delta DO$  aux alentours de 1. On peut constater d'autre part que ce test permet sans doute de mesurer des activités plus grandes que les tests présentés précédemment, qui étaient limités à 16 mUI/puits.



Graphique 13 : Activité des TA Q7NWG4 (●) et A4A10 (■) en fonction de la concentration en PLP.

Nous avons ensuite cherché à optimiser la concentration du PLP. Pour cela nous avons mesuré l'activité des deux TA avec des concentrations variables en PLP. L'activité de la A4A10 a été mesurée en présence de Pyr d'ACS et de DTNB, tandis que celle de la Q7NWG4 a été mesurée en présence de butanal et d'Ala avec le test LDH/NADH (Graphique 13).

Dans le cas de la A4A10, on observe une activité maximale dès l'addition de 5  $\mu\text{M}$  de PLP, puis une légère inhibition à 50  $\mu\text{M}$ . Dans le cas de la Q7NWG4, l'activité croît jusqu'à la valeur maximale testée de 50  $\mu\text{M}$ . La valeur mesurée à 5  $\mu\text{M}$  correspondant à environ 80 % de l'activité maximale mesurée, nous avons décidé de fixer la concentration du PLP dans nos tests à 5  $\mu\text{M}$  afin de minimiser le bruit de fond lié à l'activité parasite de la A4A10.

La Figure 21 présente l'évolution de la DO à 412 nm pendant 1 h en présence d'Ala, de butanal, d'ACS, de A4A10 (200 mUI/puits), de PLP (5  $\mu\text{M}$ ) et de différentes quantités de Q7NWG4. Le Graphique 14 présente quant à lui les temps nécessaires pour atteindre une  $\Delta\text{DO}$  de 0,75 en fonction de la quantité de Q7NWG4. Pour comparaison, des expériences similaires ont été conduites en utilisant le test LDH/NADH : la Figure 22 présente les variations de DO mesurées à 340 nm et le Graphique 15 présente la corrélation entre les quantités de Q7NWG4 et les vitesses déterminées à partir des variations linéaires de DO.

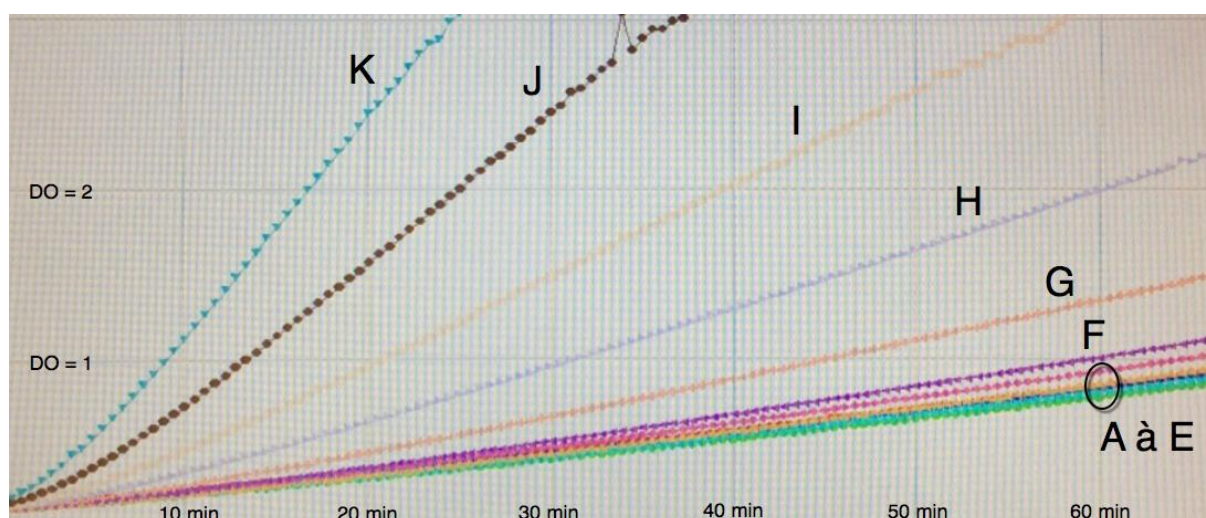
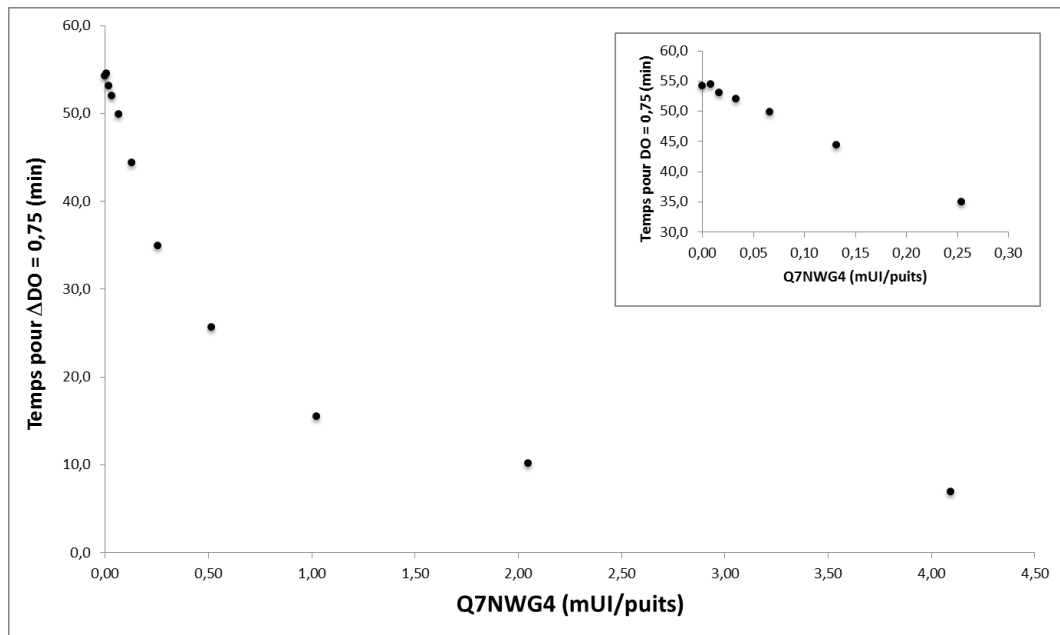


Figure 21 : DO mesurées à 412 nm avec le test couplé utilisant l'ACS et des quantités de Q7NWG4 de 0,01 à 4,1 mUI/puits (courbes A à K).



Graphique 14 : Courbe de calibration pour le test couplé utilisant l'ACS.

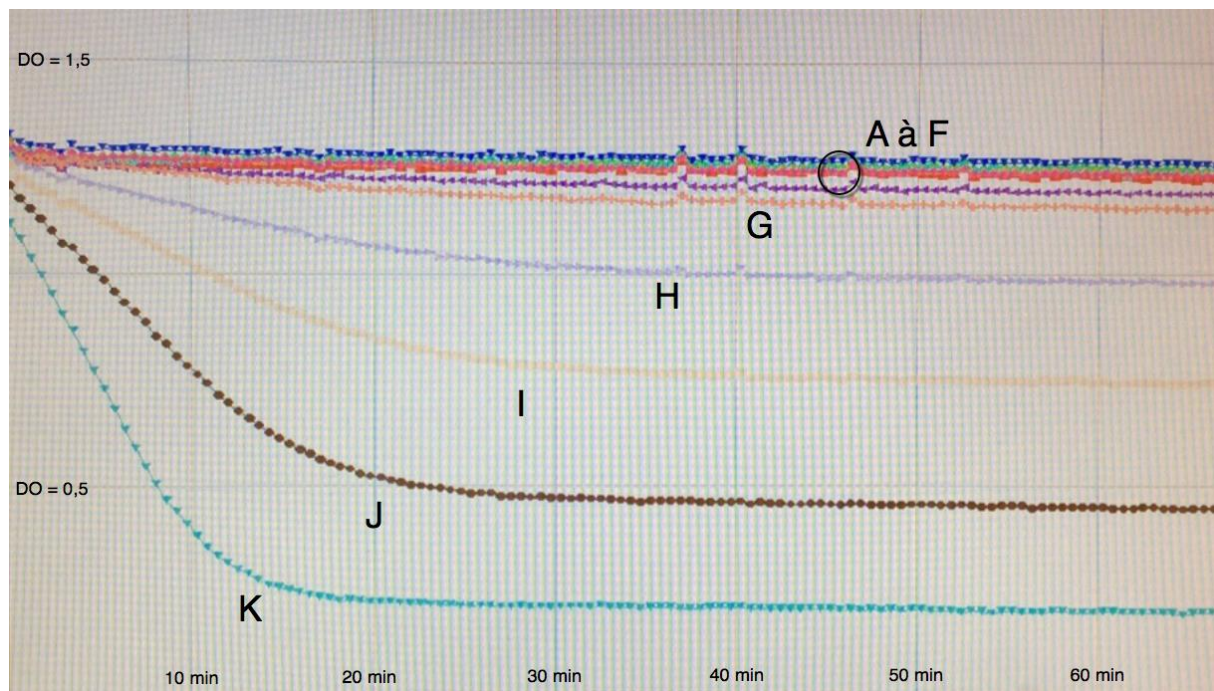
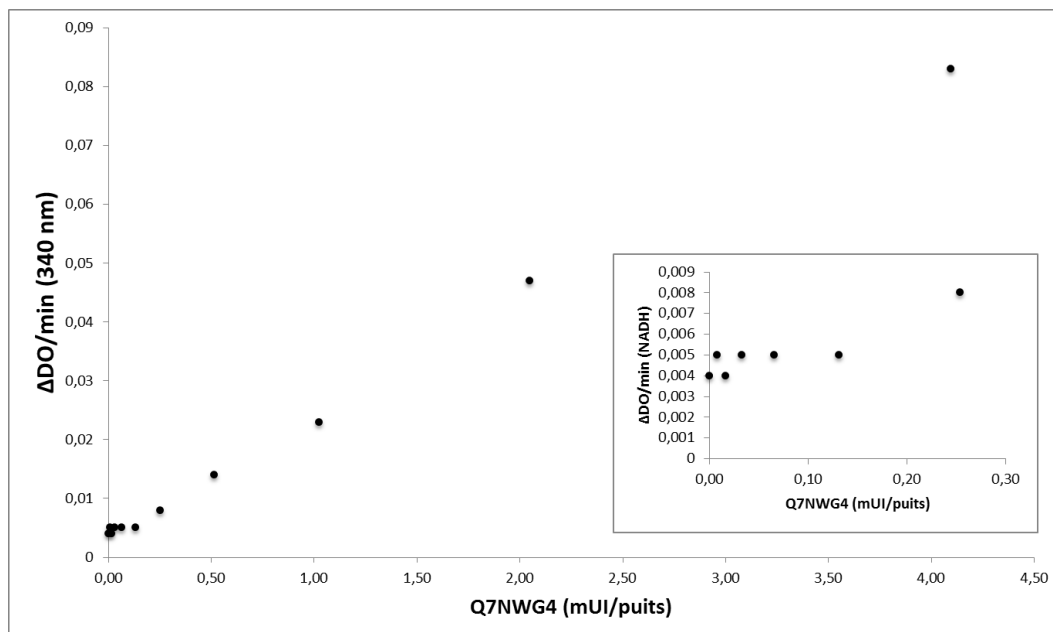


Figure 22 : DO mesurées à 340 nm avec le test LDH/NADH et des quantités de Q7NWG4 de 0,01 à 4,1 mUI/puits (courbes A à K)



Graphique 15 : Courbe de calibration pour le test LDH/NADH.

Bien que nous n'ayons pas déterminé des LOD de façon rigoureuse, ces résultats montrent que le test couplé utilisant l'ACS est apparemment plus sensible que le test LDH/NADH. Il permet de mesurer une activité de 0,02 mUI/puits alors que le test LDH/NADH se limite à environ 0,2 mUI/puits. Concernant la gamme dynamique, nous avons montré que le test permet de mesurer de façon fiable des activités de 4mUI/Puits. Au vu des courbes obtenues, il est vraisemblable que des activités supérieures puissent être mesurées (avec des temps nécessaires pour atteindre une  $\Delta DO$  de 0,75 compris entre 0 et 8 min). Quoi qu'il en soit la gamme dynamique correspond au minimum à des rapports d'activité mesurables de 1 à 200. En conclusion, nous avons donc démontré que ce test couplé présente de bonnes performances et qu'il peut être utilisé pour le criblage de collections d'amine-TA. Cependant, comme il ne permet pas de déplacement d'équilibre il n'est vraisemblablement pas adapté pour la détection de réactions thermodynamiquement très défavorables. Par contre, pour ce type de réactions atteignant rapidement un état d'équilibre, ce test pourrait permettre, comme nous l'avons évoqué ci-dessus, d'estimer la constante d'équilibre. Par manque de temps, nous n'avons pu explorer cette potentialité.

### 1.1.2.4 Test couplé pour les amine-TA utilisant l'HPT et la butylamine comme donneur primaire

Comme perspective à ces travaux de mise au point de tests couplés pour les amine-TA, nous pouvons aussi mentionner un autre test utilisant un donneur d'amine primaire autre que l'Ala. En effet, comme nous l'avons signalé dans la partie bibliographique, l'Ala donne lieu, en présence de cétones ou d'aldéhydes, à des réactions thermodynamiquement défavorables et cet acide aminé est donc considéré comme un mauvais substrat donneur pour les Amine-TA. Les données de la littérature concernant le spectre de substrat d'amine-TA variées, montrent que le couple butanal/butylamine est communément accepté en tant que substrats par cette classe d'enzymes. Au cours de nos travaux, nous avons pu vérifier que le butanal est un très bon substrat pour les différentes TA que nous avons étudiées. La butylamine, pourrait donc être utilisée comme donneur d'amine primaire dans un test couplé utilisant une HypoTA comme enzyme auxiliaire et l'HPT comme source de  $\text{SO}_2$  (Schéma 81). Cette approche permettrait, en plus de s'affranchir de l'Ala, d'étudier des enzymes présentant des stéréosélectivités complémentaires avec un seul et unique donneur achiral.

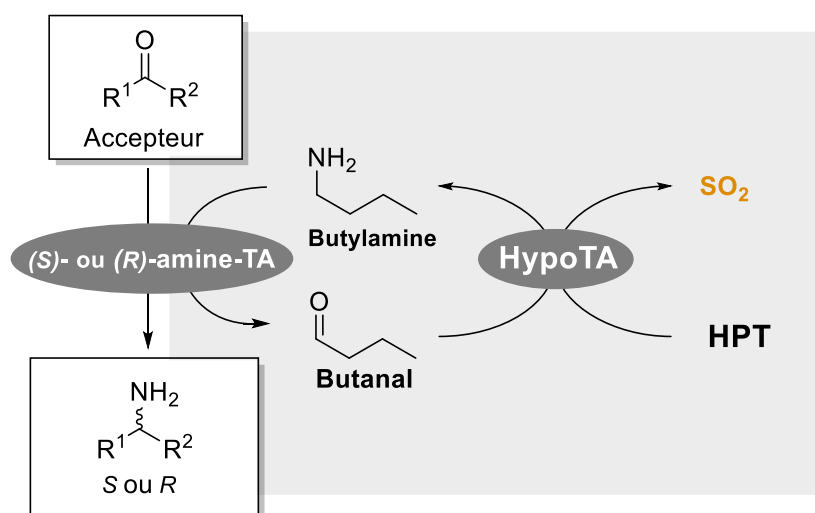


Schéma 81 : Principe d'un test couplé utilisant la butylamine comme donneur d'amine.

La Q9A3Q9 ayant montré une très bonne activité avec le butanal et l'HPT, il nous a paru opportun d'essayer de mettre au point ce nouveau test en utilisant cette TA comme enzyme auxiliaire et la Q7NWG4 comme amine-TA modèle. Cependant, dès nos premiers essais, l'instabilité de la Q9A3Q9 a empêché de poursuivre cette approche. Il sera par



conséquent particulièrement intéressant de reprendre ces expériences lorsqu'une nouvelle HypoTA plus stable sera disponible.

## 1.2 Tests à la résazurine pour étudier le spectre de substrats donneur des $\alpha$ -TA

En parallèle des tests au DTNB qui permettent, comme nous l'avons vu, de tester une gamme quasi illimitée d'accepteurs, nous avons aussi mis au point un test permettant d'étudier le spectre de substrats donneurs des TA. Ce type de test nous permettra par la suite de caractériser rapidement les meilleures enzymes issues de nos criblages. Nous nous sommes tout d'abord focalisés sur les  $\alpha$ -TA. Pour la mise au point de ce test, nous nous sommes basés sur une méthode décrite dans la littérature,<sup>212</sup> pour doser le Glu à l'aide de la GluDH, de la diaphorase et de la résazurine (Schéma 82). La diaphorase permet dans ce cas de régénérer le  $\text{NAD}^+$  consommé pour l'oxydation du Glu, tout en réduisant la résazurine pour produire de la résorufine fluorescente.

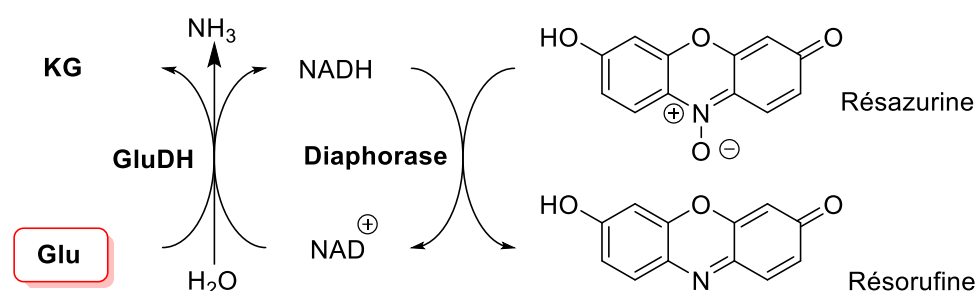


Schéma 82 : Dosage du Glu avec la GluDH, la diaphorase et la résazurine.

En couplant ce dosage du Glu à une réaction de transamination utilisant le KG comme accepteur, il est alors possible d'utiliser n'importe quel donneur d'amine avec n'importe quelle L- $\alpha$ -TA (Schéma 83). Ce test peut également être utilisé avec les (*S*)-amine-TA qui acceptent le KG.

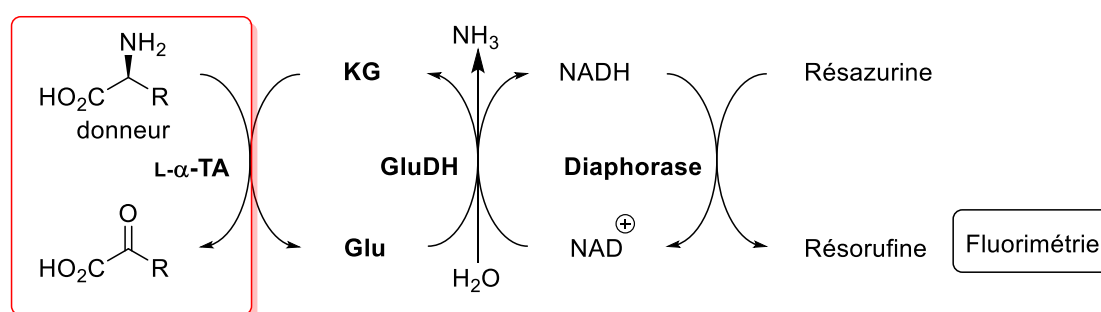


Schéma 83 : Test pour l'étude du spectre de substrats donneurs des L- $\alpha$ -TA.

Nous avons donc cherché à optimiser les conditions de ce test, et notamment à établir la corrélation entre le signal fluorimétrique et l'activité de la TA. Pour cela, nous avons fait varier les différents paramètres (concentration en enzymes, en cofacteurs, etc.) de manière à obtenir la gamme dynamique la plus large possible. Nous avons, dans un premier temps, choisi comme réaction modèle, la transamination entre le KG et l'ACS, en utilisant la TA A4A10 comme catalyseur. Notre objectif était de mesurer en parallèle le signal fluorimétrique (variation d'unités de fluorescence relative =  $\Delta$ RFU/min), et la  $\Delta$ DO à 412 nm pour quantifier l'activité de la TA avec le test direct au DTNB (Schéma 84).

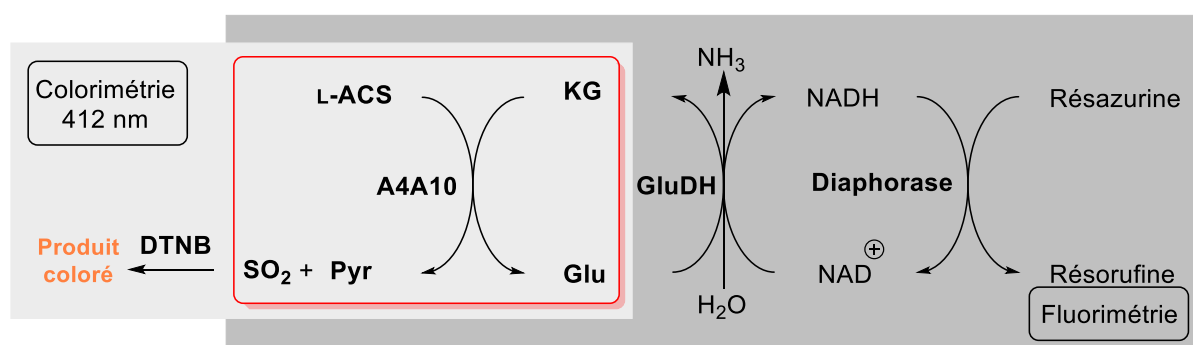
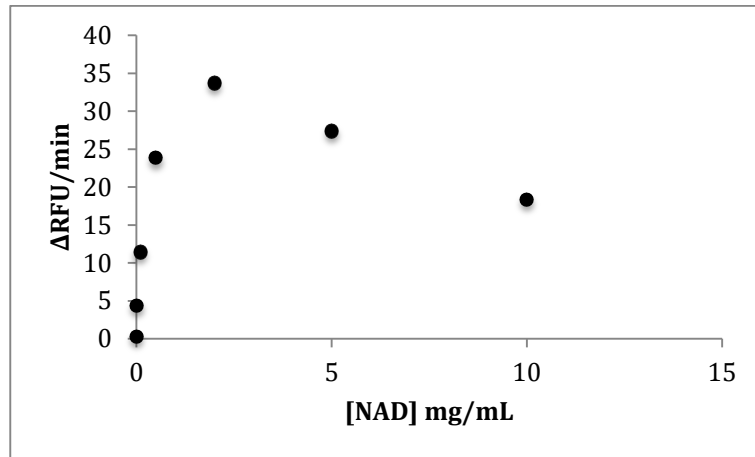


Schéma 84 : Première réaction modèle pour le test à la résazurine.

À l'issue de nos premières investigations nous avons pu conclure que les quantités de GluDH (1 UI/puits), de diaphorase (0,1 UI/puits) et de résazurine (100  $\mu$ M) décrites dans la littérature étaient celles qui permettait d'obtenir le signal optimal.<sup>212</sup> Nous avons cependant remarqué que l'intensité du signal pouvait être légèrement améliorée en passant de 0,5 à 2 mg/mL en  $\text{NAD}^+$ , comme le montre le Graphique 16.

Au cours de nos essais, nous avons aussi essayé de remplacer la diaphorase par un médiateur d'oxydoréduction : la phénazine méthosulfate (PMS). Cette substitution nous aurait permis de nous affranchir d'une enzyme et de simplifier le test. Toutefois, quelle que soit la concentration en PMS, nous avons mesuré un signal très inférieur à celui obtenu avec la diaphorase dans les mêmes conditions. Cette approche a donc été abandonnée.



Graphique 16 : Variation du signal de fluorescence ( $\Delta$ RFU/min) en fonction de [NAD+].

Par ailleurs, nos études préliminaires ont révélé deux limitations liées au choix de la TA A4A10 et de l'ACS pour la réaction modèle. La première concerne la présence de sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , qui est utilisé pour la précipitation et la conservation des enzymes purifiées au laboratoire. Malgré un « dessalage » par centrifugation de l'enzyme A4A10 avant son utilisation, la concentration en ions ammonium reste suffisamment importante pour déplacer l'équilibre de la réaction catalysée par la GluDH. Ceci a pour conséquence de diminuer fortement la vitesse d'oxydation du KG, et par conséquent la production de résorufine. Le second problème provient, quant à lui, du fait que les ions sulfites, libérés à l'issue de la transamination à partir de l'ACS, diminuent le signal de fluorescence, en interagissant vraisemblablement avec la résazurine ou la résorufine. En effet, en utilisant l'Ala, et en ajustant l'activité de la A4A10 pour rester dans les mêmes conditions, nous avons observé une nette augmentation du signal. Le choix de l'ACS dans la réaction modèle n'est donc pas judicieux. Nous avons donc par la suite utilisé l'Ala comme donneur et la TA A3D9 purifiée au Génoscope et conservée en absence de sulfate d'ammonium. Cette TA présente une excellente activité avec une variété de cétoacides comprenant le KG et le Pyr (Schéma 85). L'activité de la TA a alors été mesurée en utilisant le test LDH/NADH.

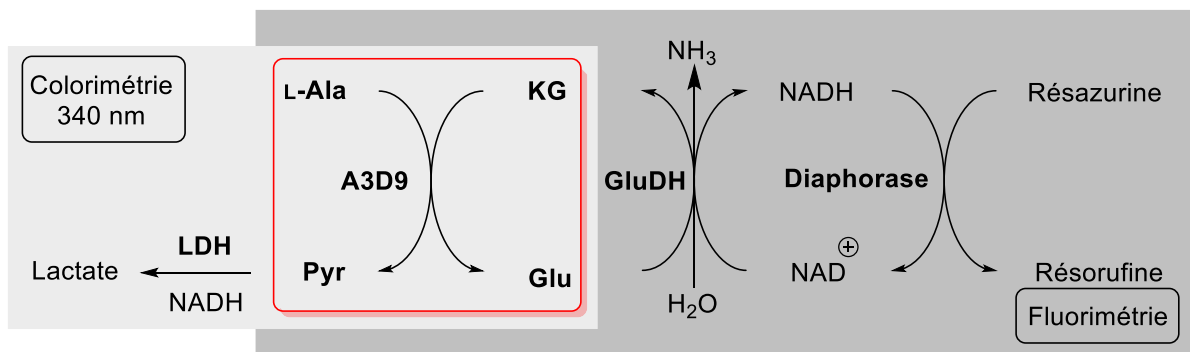
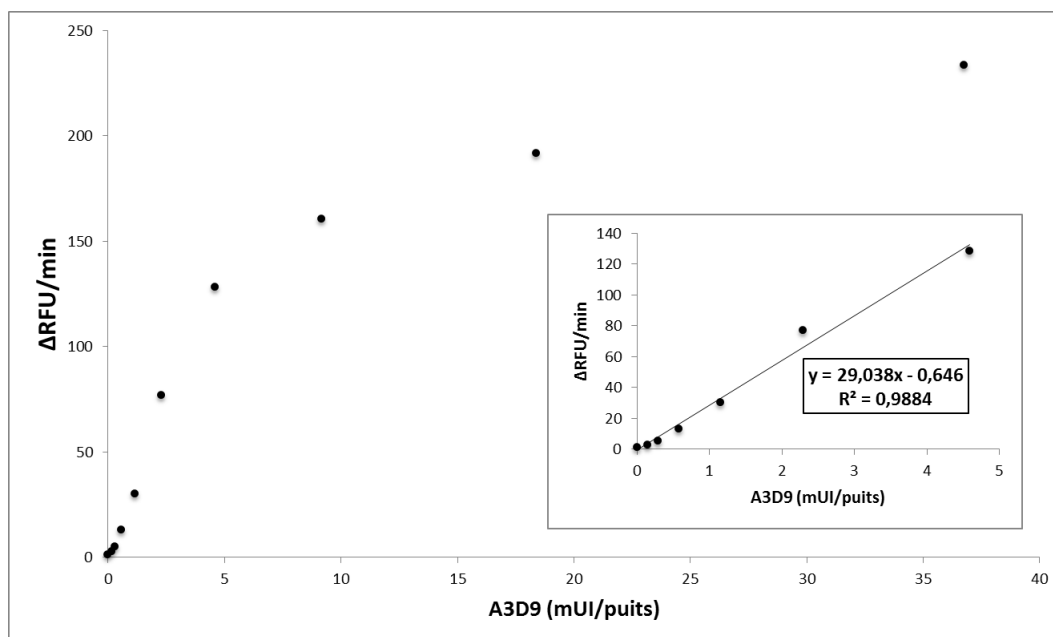


Schéma 85 : Seconde réaction modèle pour le test à la résazurine.

En utilisant une gamme de concentration en A3D9 correspondant à des activités de 0,14 à 37 mUI/puits nous avons pu obtenir la courbe de calibration décrite dans le Graphique 17.



Graphique 17 : Courbe de calibration pour le test à la résazurine.

La LOD de la A3D9 avec ce test a été calculée à 0,2 mUI/puits tandis que la limite de linéarité se situe approximativement à 5 mUI/puits. La gamme dynamique de ce test est donc relativement restreinte avec un rapport d'activités mesurables de 1 à 25. Dans le cadre de l'étude du spectre de substrats donneur d'une TA, il sera bien sûr possible d'utiliser différentes concentrations en enzymes afin d'étendre le rapport d'activités mesurables. Nous utiliserons ce test, d'une part, pour compléter la « carte d'identité » de chacune des nouvelles  $\alpha$ -TA issues de nos criblages, et d'autre part, pour trouver les

meilleurs donneurs dans l'optique d'applications synthétiques. Le même type de test pourra être par la suite optimisé pour l'étude des amines TA en remplaçant le couple KG/GluDH par le couple Pyr/AlaDH.

## 2 Synthèse des substrats pour le criblage

Une fois les tests mis au point, la seconde étape de notre projet a consisté à choisir et à préparer les substrats donneurs et accepteurs nécessaires à la réalisation des criblages. La première partie de ce chapitre est ainsi consacrée à la synthèse des  $\beta$ AS : les L- et D-ACS, l'hypotaurine (HPT) et la méthylhypotaurine (MHPT).

Concernant les accepteurs, nous avons sélectionné 25 substrats carbonylés présentant une large diversité structurale dans le but de caractériser le spectre de substrats et les potentialités des TA présentes dans nos collections. La synthèse de plusieurs de ces molécules est décrite dans la seconde partie de ce chapitre.

### 2.1 Synthèse des substrats donneurs

#### 2.1.1 Synthèse de l'ACS

Les synthèses du L- et du D-ACS ont été réalisées à partir de la L- ou D-cystine selon la méthode décrite par Emilliozzi et Pichat que nous avons optimisée.<sup>236</sup> Cette synthèse, réalisée en deux étapes, consiste tout d'abord en l'oxydation en milieu acide à l'aide de peroxyde d'hydrogène de 3 molécules de cystine en 3 molécules de cystine-disulfoxyde (**1**). Ces dernières sont ensuite dismutées en présence d'une solution ammoniacale aqueuse pour donner 4 molécules d'ACS et reformer une molécule de cystine (Schéma 86).

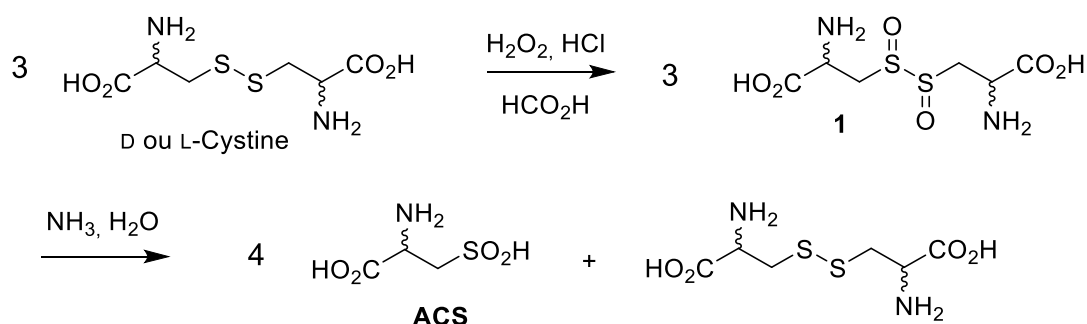


Schéma 86 : Synthèse du L- ou D-ACS à partir de la L- ou D-cystine.

L'oxydation de la cystine en intermédiaire **1** est réalisée en présence d'un léger excès d'HCl et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en solution dans l'acide formique et à une température maintenue autour de 20 °C. Après évaporation et élimination des traces d'acide, la dismutation de **1** est ensuite directement réalisée par traitement avec une solution d'ammoniaque concentrée. Le mécanisme proposé pour cette réaction est décrit au Schéma 87.<sup>237</sup>

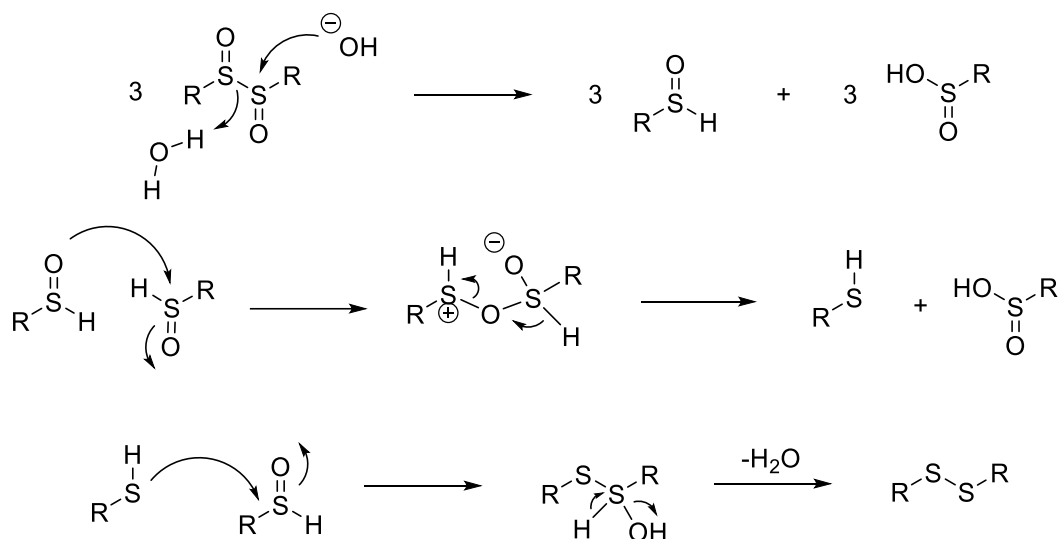


Schéma 87 : Mécanisme de dismutation du disulfoxyde **1**.

La cystine qui précipite dans l'eau à pH = 7 est facilement éliminée par filtration et l'ACS est ensuite purifié par chromatographie d'échange d'ions. Il a tout d'abord été déposé sur une colonne de résine sulfonique sur laquelle il n'est pas adsorbé en raison de son point isoélectrique très bas (< 1). Cette étape permet cependant d'éliminer la majorité des impuretés notamment la cystine. La pureté de l'ACS est encore augmentée par adsorption sur une résine échangeuse d'anions (Dowex 1). Une élution avec une solution d'acide formique permet alors de l'isoler après concentration avec une grande pureté (> 98%). Le rendement global de la réaction à partir de la cystine avoisine 70 %. Nous avons donc pu accéder ainsi sans difficulté majeure aux deux énantiomères de l'ACS. La cystine récupérée est suffisamment pure pour être réutilisée pour une nouvelle synthèse. Ceci est important dans le cas du D-ACS, car la D-cystine est particulièrement onéreuse.

Parfois, nous avons obtenu l'ACS en mélange avec l'acide cystéine sulfonique. Il semble que ce dernier soit issu d'une suroxydation de l'ACS lors d'un séjour prolongé

sur la colonne de résine acide. Bien qu'il soit possible de séparer les acides sulfiniques et sulfoniques sur la colonne de résine basique (Dowex 1), il est cependant préférable d'éviter la formation de l'acide sulfonique en minimisant au maximum la durée de la première étape de purification.

### 2.1.2 Synthèse de l'hypotaurine

L'hypotaurine (HPT) a été préparée à partir de la cystamine en adaptant la méthode précédemment décrite pour l'ACS (Schéma 88).

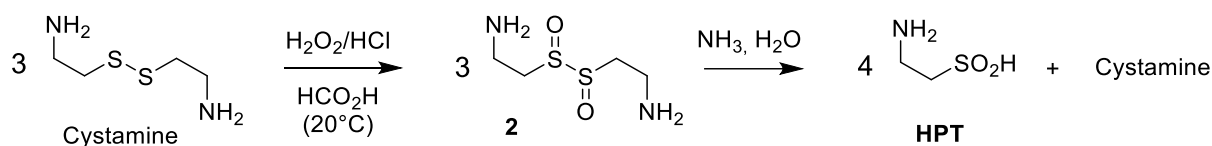


Schéma 88 : Synthèse de l'hypotaurine à partir de la cystamine.

L'intermédiaire disulfoxyde (2) a été obtenu en appliquant la méthode déjà décrite pour la synthèse de 1. Nous avons cependant remarqué que la cystamine, contrairement à la cystine, ne se dissout qu'après l'ajout d'HCl et a tendance à précipiter dans le milieu réactionnel. Il est donc essentiel de procéder rapidement à l'ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> afin d'éviter que le milieu ne prenne en masse. À l'issue de la réaction l'intermédiaire 2 est récupéré après concentration et utilisé directement dans l'étape suivante. À l'issue de la dismutation, la cystamine ne précipite pas et ne peut donc pas, comme la cystine, être éliminée par filtration. Elle est par contre sélectivement adsorbée sur la résine acide. Une simple élution avec H<sub>2</sub>O permet ainsi, après concentration, d'isoler l'HPT sous la forme d'un solide blanc cristallin, avec une excellente pureté attestée par RMN, et un rendement global de 75 %.

### 2.1.3 Synthèse des L- et D-méthylhypotaurine

Nous avons envisagé de préparer la méthylhypotaurine (MHPT) à partir de la diméthylcystamine en appliquant la même méthode que pour l'ACS et l'HPT. Le Schéma 89 décrit l'approche rétrosynthétique que nous avons explorée à partir de l'Ala. L'enchaînement synthétique comprend la réduction de l'Ala en alaninol, une réaction de Mitsunobu pour substituer l'alcool par le thioacétate puis une oxydation du thiol pour accéder à l'intermédiaire disulfure 7. Les synthèses des L- et D-MHPT ont été menées en

parallèle à partir des L- et D- Ala. Les rendements indiqués par la suite correspondent aux meilleurs résultats dans l'une ou l'autre des 2 séries.

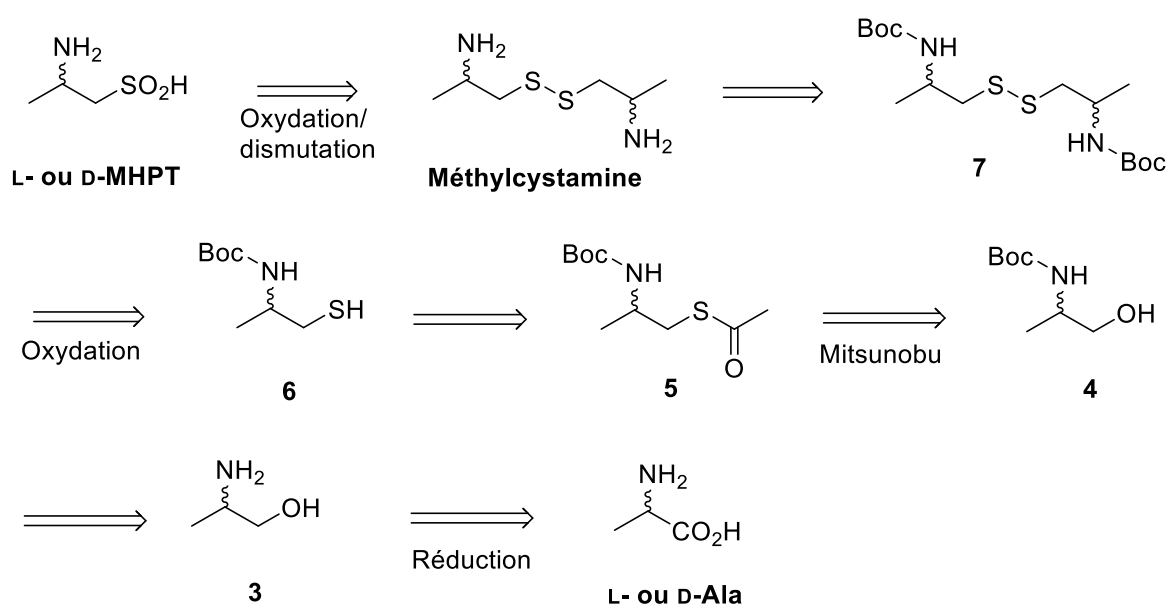
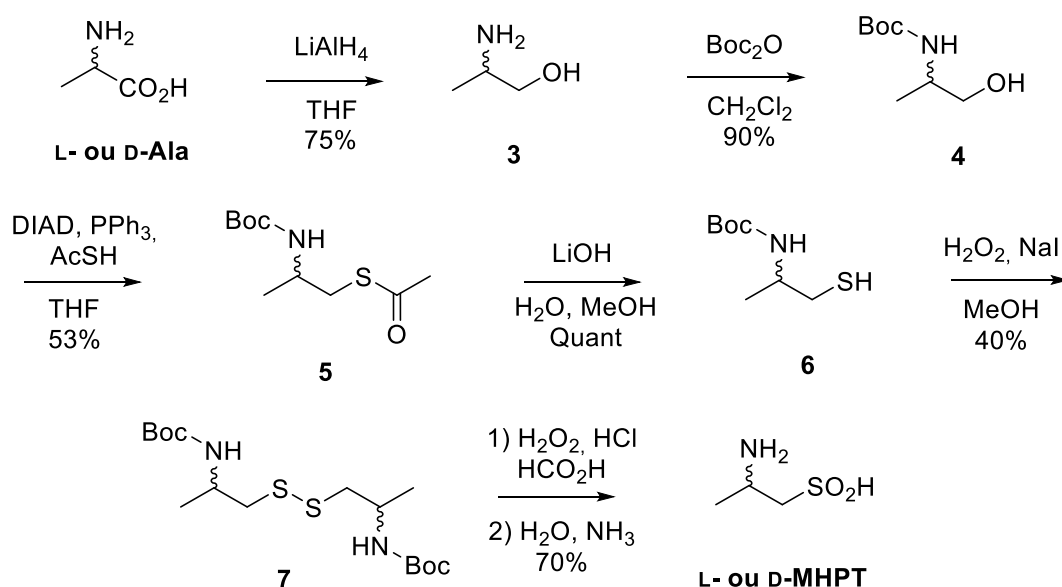


Schéma 89 : Rétrosynthèse envisagée pour la méthylhypotaourine.

L'alaninol a été préparé par réduction de l'Ala avec  $\text{LiAlH}_4$  dans le THF à reflux.<sup>238</sup> Après élimination des sels par filtration, et concentration, l'alaninol (3) est isolé avec un rendement de 75 % et une pureté suffisante pour être engagé dans l'étape suivante sans purification supplémentaire. Le groupement Boc a été choisi pour protéger la fonction amine car il sera directement éliminé lors de l'étape d'oxydation de l'intermédiaire 7 effectuée en milieu acide. Ce groupement a été introduit sans difficulté en utilisant le réactif  $\text{Boc}_2\text{O}$  dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .<sup>239</sup> L'intermédiaire 4 a été isolé après lavage et concentration avec un rendement de 90 % et une pureté suffisante pour être engagé dans l'étape suivante. La réaction de Mitsunobu a ensuite été réalisée en présence d'azodicarboxylate de diisopropyle (DIAD) et d'acide thioacétique selon un protocole décrit dans la littérature.<sup>239</sup> Après chromatographie sur silice, le thioacétate 5 a été isolé avec un rendement de 53 %. Ce rendement modeste s'explique en partie par la difficulté de séparation du produit 5 des sous-produits formés à partir du DIAD. L'optimisation des conditions de purification devrait permettre à l'avenir d'améliorer ce rendement. La saponification de 5 a été effectuée avec un léger excès de lithine et le produit 6 isolé avec un rendement quantitatif après une simple extraction. L'oxydation du thiol en disulfure a été obtenue par l'action d' $\text{H}_2\text{O}_2$  en présence d'une quantité catalytique de  $\text{NaI}$ , selon



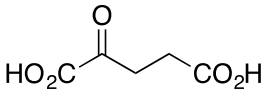
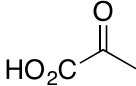
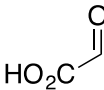
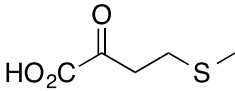
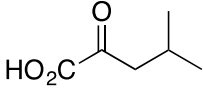
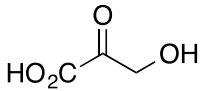
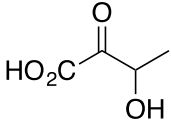
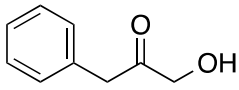
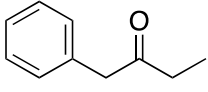
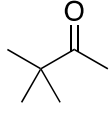
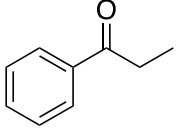


un protocole récemment décrit dans la littérature.<sup>240</sup> Après chromatographie sur silice, le produit **7** a été obtenu avec un rendement modeste de 40 %. Finalement, les L- et D-MHPT ont été obtenues avec un rendement de 70 % en appliquant le protocole déjà décrit pour l'HPT. Ici encore nous avons pu observer la formation de méthyltaurine (< 20 %) par oxydation au cours de la purification sur résine acide. La MHPT a finalement été obtenue avec un rendement global de 10 % à partir de l'Ala. Ce rendement pourrait sans nul doute être augmenté par optimisation des différentes étapes et en particulier des conditions de chromatographie. Le Schéma 90 résume la synthèse des L- et D-MHPT.

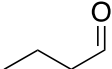
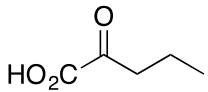
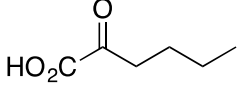
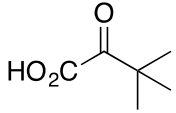
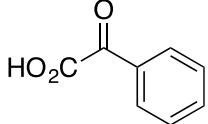
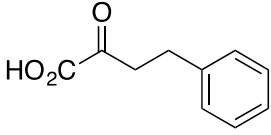
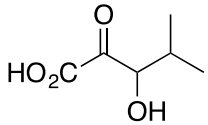
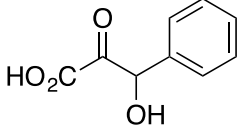
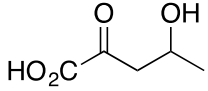
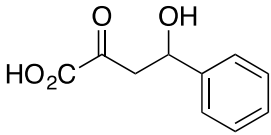
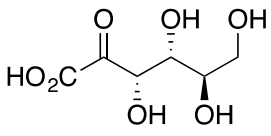
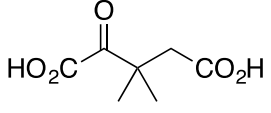


## 2.2 Choix et synthèse des Substrats accepteurs

Nous avons sélectionné 26 composés carbonylés, que nous avons répartis en 5 catégories en fonction de leur intérêt pour le projet. Ces substrats carbonylés, associés aux amines chirales correspondantes, sont regroupés dans le Tableau 14.

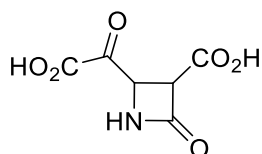
Tableau 14 : Substrats choisis pour le criblage des collections de TA.

Catégorie	Substrat accepteur		Produit aminé correspondant
<b>I</b> : Substrats communs des TA	Acide $\alpha$ -cétoglutarique ( <b>KG</b> )		Glu
	Acide pyruvique ( <b>Pyr</b> )		Ala
<b>II</b> : Cétoacides précurseurs d'acides aminés canoniques	Acide glyoxylique ( <b>Glyox</b> )		Gly
	Acide 4-(méthylthio)-2-oxobutanoïque ( <b>MTOB</b> )		Met
	Acide 4-méthyl-2-oxopentanoïque ( <b>MOPA</b> )		Leu
	Acide 3-hydroxy-2-oxopropanoïque ( <b>HPA</b> )		Ser
	Acide 3-hydroxy-2-oxobutanoïque ( <b>HOBA</b> )		Thr
<b>III</b> : Cétones simples substrats potentiels des amine-TA	1-Hydroxy-3-phénylpropan-2-one ( <b>HPPO</b> )		2-Amino-3-phénylpropan-1-ol
	1-Phényl-2-butanone ( <b>PBO</b> )		1-Phénylbutan-2-amine
	3,3-Diméthyl-2-butanone ( <b>DBO</b> )		3,3-Diméthylbutan-2-amine
	1-Phénylpropan-1-one ( <b>PPO</b> )		1-Phénylpropan-1-amine
<b>IV</b> : précurseurs de donneurs d'amine simples	Acétaldéhyde		Ethylamine
	Acétone		Isopropylamine

Butanal		Butylamine
Acide 2-oxopentanoïque (AOP)		Norvaline
Acide 2-oxohéxanoïque (AOH)		Norleucine
Acide 3,3-Diméthyl-2-oxobutanoïque (DMOB)		tert-Leucine
Acide 2-oxo-2-phénylacétique (OPA)		Phénylglycine
Acide 2-oxo-4-phénylbutanoïque (OPBA)		Homophénylalanine
Acide 3-hydroxy-4-méthyl-2-oxopentanoïque (HMOP)		Acide 2-amino-3-hydroxy-4-méthylpentanoïque
Acide 3-hydroxy-2-oxo-3-phénylpropanoïque (HOPP)		Acide 2-amino-3-hydroxy-3-phénylpropanoïque
Acide 4-hydroxy-2-oxopentanoïque (HOP)		Acide 2-amino-4-hydroxypentanoïque
Acide 4-hydroxy-2-oxo-4-phénylbutanoïque (HOPB)		Acide 2-amino-4-hydroxy-4-phénylbutanoïque
Acide 2-désoxy-2-oxogluconique (KDG)		Acide 2-désoxy-2-aminogluconique
Acide 3,3-diméthyl-2-oxopentanedioïque (DMOP)		3,3-Diméthyl-Glu

---

Acide 2-(carboxycarbonyl)-  
4-oxoazétidine-3-  
carboxylique (COC)



Analogue  $\beta$ -lactame du  
Glu

---

La première catégorie correspond aux deux cétoacides considérés comme accepteurs communs des TA : le KG (pour les  $\alpha$ -TA) et le pyruvate (pour les amine-TA). L'utilisation de ces 2 accepteurs doit permettre, d'une part, de vérifier la validité des tests enzymatiques utilisés lors des criblages en servant de témoins positifs. D'autre part, ils permettent d'optimiser les chances de mettre en évidence les TA acceptant les  $\beta$ AS : l'ACS, l'HPT et la MHPT.

Les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> catégories sont constituées d'accepteurs ayant des structures et des polarités variées afin d'avoir une première vision du spectre de substrats des TA présentes dans nos banques et d'évaluer ainsi leurs potentialités synthétiques. La deuxième catégorie est ainsi constituée de cétoacides naturels, précurseurs d'acides aminés canoniques et devrait permettre d'identifier des  $\alpha$ -TA. La troisième catégorie est constituée d'amines simples destinées à identifier des amine-TA.

La quatrième catégorie est constituée de 3 dérivés carbonyles (acétaldéhyde, acétone et butanal) qui ont été choisis pour leur volatilité, qui peut permettre la mise en œuvre de système de déplacement d'équilibre via l'utilisation des amines correspondantes comme donneur.

Enfin, la dernière catégorie de substrats regroupe des cétoacides précurseurs d'acides aminés rares ou non naturels présentant un intérêt identifié ou potentiel dans le domaine pharmaceutique. On y trouve ainsi les précurseurs de la norvaline, norleucine, tert-leucine ou encore de l'homophénylalanine. On y trouve aussi des précurseurs d'acides aminés  $\beta$ - ,  $\gamma$ - ou poly-hydroxylés ou encore de 2 analogues du Glu. La norvaline et la norleucine sont présentes dans de nombreux peptidomimétiques biologiquement actifs. La L-homophénylalanine (HPhe) est, quant-à-elle, présente dans la structure de plusieurs pseudopeptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine appartenant à la famille des « prils » (enalapril, lisinopril) (Figure 23) qui sont principalement utilisés pour le traitement de l'hypertension artérielle et de certaines maladies cardiovasculaires.<sup>241,242</sup> L'HPhe est aussi présente dans le carfilzomib (Figure

23), un médicament anticancéreux. La mise au point de nouveaux procédés de synthèse efficaces et hautement stéréosélectifs de l'HPhe demeure un sujet d'actualité.<sup>108</sup>

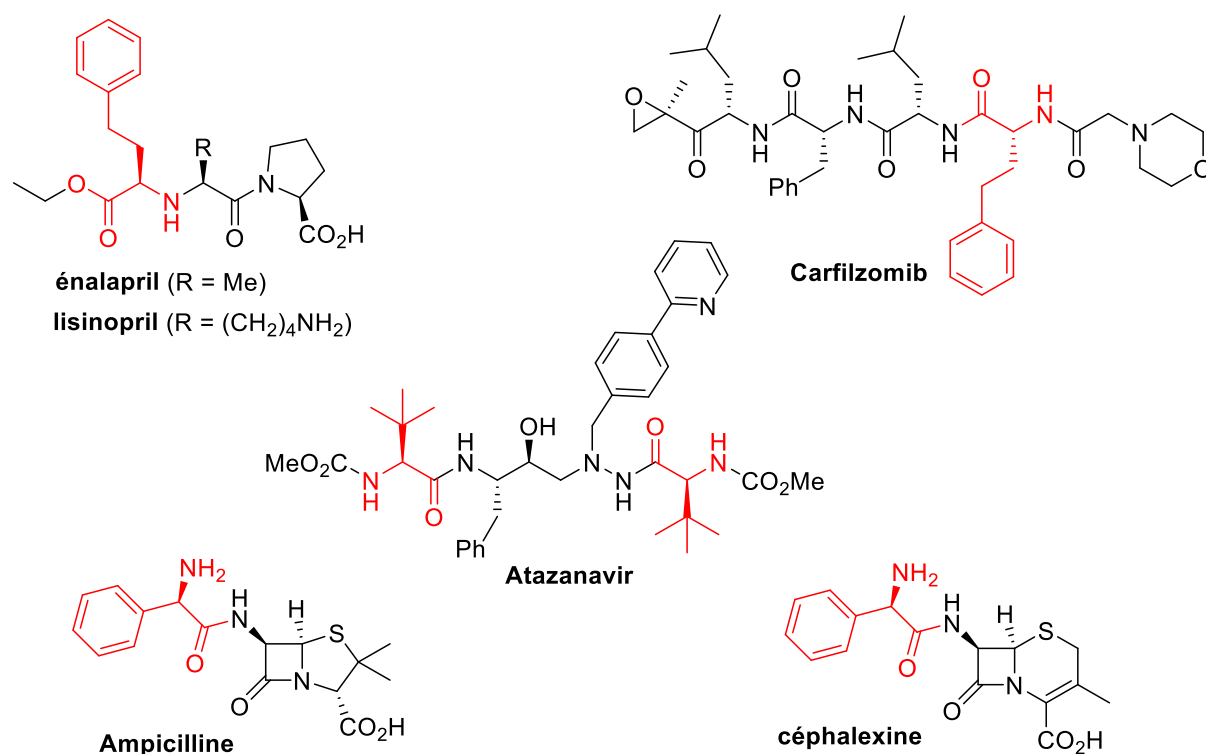


Figure 23 : Structure de principes actifs intégrant l'HPhe, la tert-Leu ou la phénylglycine.

C'est aussi le cas pour la *L-tert*-leucine qui entre dans la composition de molécules anticancéreuses et d'inhibiteurs de protéase du HIV (Atazanavir),<sup>243</sup> ou encore de la *D*-phénylglycine qui est, quand-à-elle, présente dans la structure d'antibiotiques de la classe des β-lactames comme l'ampicilline ou la céphalexine.<sup>244-246</sup> Tout ces aminoacides ont déjà été préparés via de procédés de transaminations avec diverses enzymes (BCAT, AspTA, AroTA, *D*-aaTA). Cependant, la découverte de nouvelles TA plus actives et permettant la mise en place de stratégies simples de déplacement d'équilibre présente toujours un grand intérêt pour la mise au point de procédés plus performants.

Les aminoacides β- et γ-hydroxylés, qui sont à la fois des analogues des aminoacides canoniques hydroxylés (Ser, Thr) et d'acides aminés aromatiques (Phe, HPhe) et aliphatiques (Leu, norVal), peuvent aussi être inclus dans des peptidomimétiques. La présence du groupement hydroxyle offre des possibilités d'interaction supplémentaires avec la cible biologique. La fonction alcool peut aussi participer à une structuration particulière du peptide. La synthèse de ce type de dérivés par transamination n'a pas

encore été décrite bien qu'elle constitue une approche potentiellement très performante. Globalement peu de TA actives avec des cétoacides  $\beta$ -hydroxylés ont été décrites à ce jour.

Enfin, les 2 analogues de KG, précurseurs d'analogues du Glu ont été choisis pour leur action potentielle dans le système glutamatergique. En effet, Les travaux précédents menés au laboratoire laissent penser que ces analogues originaux du Glu pourraient être des ligands sélectifs vis-à-vis des récepteurs du Glu. La découverte de TA offrant un accès stéréosélectif à ces analogues ou à d'autres molécules de structure proche serait donc très intéressante.

Parmi les accepteurs carbonylés décrits dans le tableau 16, plusieurs ne sont pas disponibles commercialement et nous avons donc entrepris leurs synthèses en mettant en œuvre des méthodes décrites dans la littérature ou des approches originales. Il s'agit des composés des cétoacides  $\beta$ -hydroxylés (HOBA, HMOP, HOPP),  $\gamma$ -hydroxylés (HOP, HOPB), de la cétone hydroxylée HPPO et des 2 analogues du KG (DMOP et COC). Par ailleurs en raison de son prix élevé, nous avons aussi mis en œuvre la synthèse du OPBA, précurseur de l'HPhe afin d'en disposer en quantité suffisante.

### 2.2.1 Synthèse de l'acide 2-oxo-4-phénylbutanoïque : OPBA

Deux voies de synthèses ont été testées en parallèle en s'inspirant de méthodes décrites dans la littérature ou développées au laboratoire.<sup>247-249</sup>

#### 2.2.1.1 Utilisation d'un organomagnésien

Nous nous sommes tout d'abord appuyés sur une méthode décrite pour la synthèse de l'homotyrosine.<sup>248</sup> Cette synthèse débute par une réaction de Grignard entre l'oxalate d'éthyle et l'organomagnésien formé à partir du bromure de phényléthyle. Cette réaction conduit à l'ester éthylique de l'OPBA (**8**) qu'il suffit alors de saponifier pour accéder à l'OPBA (Schéma 91).

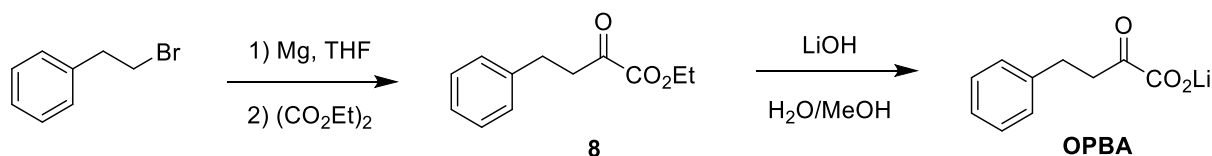


Schéma 91 : Synthèse de l'OPBA via un organomagnésien.

À l'issue de la première étape, nous avons obtenu un mélange contenant de nombreuses impuretés. Des tentatives de purification par chromatographie sur gel de silice se sont soldées par un échec. En effet le composé **8** s'est avéré particulièrement instable dans les conditions de purification que nous avons utilisées et le produit a été isolé avec un très faible rendement (< 20 %) et sous une forme insuffisamment pure pour poursuivre la synthèse. Bien que cette réaction puisse être vraisemblablement optimisée, nous nous sommes tournés vers une autre approche synthétique.

### 2.2.1.2 Synthèse de l'OPBA via l'ozonolyse d'un acétate d'énol

La seconde voie que nous avons explorée comporte 4 étapes, et utilise une méthodologie précédemment développée au laboratoire. Elle consiste en l'alkylation de l'acétoacétate de méthyle suivie de la conversion du  $\beta$  cétoester **9** en acétate d'énol **10**. Ce dernier est alors ozonolysé pour produire l' $\alpha$ -cétoester **11** qui est ensuite saponifié pour obtenir l'OPBA sous la forme de sel de lithium (Schéma 92).

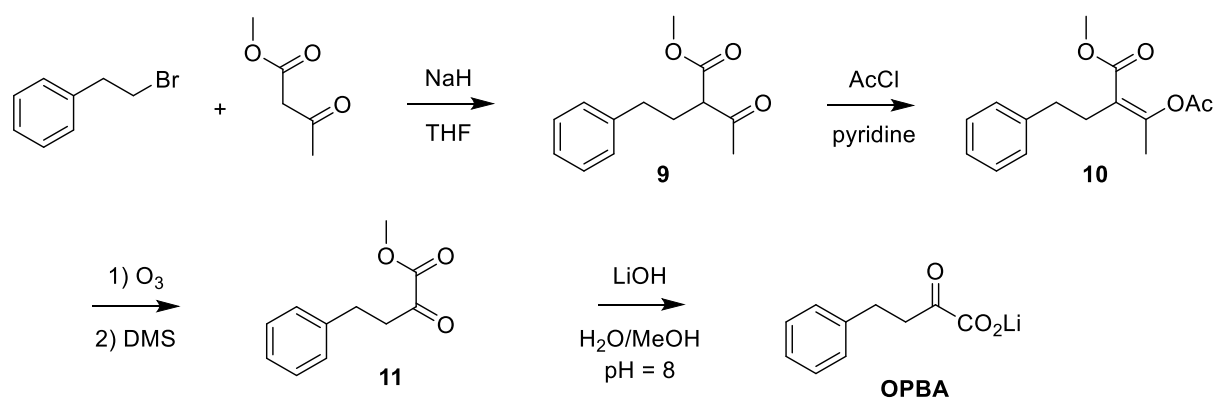


Schéma 92 : Synthèse de l'OPBA via l'ozonolyse d'un acétate d'énol.

L'alkylation de l'acétoacétate de méthyle a été réalisée dans le THF à reflux en présence d'un léger excès de NaH. La réaction s'est révélée très lente et incomplète après 100 h. Après purification sur silice, le produit **9** a été isolé avec un rendement modeste de 30 %. La quantité de produit obtenue (environ 10 g) nous a cependant permis de poursuivre nos expériences. L'action d'une quantité stoechiométrique de chlorure d'acétyle et de pyridine en solution dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  n'a pas conduit à la formation de l'acétate d'énol **10**. Par contre ce dernier a été obtenu en utilisant la pyridine comme solvant. Dans ces conditions, après 48 h de réaction, le composé **10** a pu être isolé après

chromatographie sur silice, avec un rendement modeste de 34 %. Ici encore, nous n'avons pas cherché à optimiser cette réaction.

L'ozonolyse du produit **10** a ensuite été réalisée en solution dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à -78 °C. Après réduction des ozonides avec du diméthylsulfure, le cétoester **11** a pu être isolé avec un bon rendement de 87 %. Ce dérivé, tout comme le produit **8** s'est révélé instable dans les conditions chromatographiques. Cependant l'avantage de cette approche est que l'ozonolyse permet après lavage et concentration d'obtenir un produit avec très peu d'impuretés, que nous avons pu directement hydrolyser sans purification supplémentaire. La saponification de **11** a été effectuée à pH = 8 en additionnant lentement une quantité stoechiométrique de lithine à l'aide d'un pH-stat. Ainsi après lyophilisation, le sel de lithium de l'OPBA a pu être isolé avec une pureté suffisante (> 90 % estimé par RMN <sup>1</sup>H) et en quantité suffisante pour mener nos expériences. Il conviendrait cependant de répéter ces expériences et d'optimiser les conditions réactionnelles afin d'améliorer le rendement global qui n'est ici que de 8 %.

## 2.2.2 Synthèse des cétoacides β-hydroxylés : HOBA, HMOP et HOPP

Nous avons développé une approche originale pour préparer ces cétoacides pour lesquels aucune synthèse n'a été décrite à ce jour. La méthode que nous avons développée repose sur la condensation de Baylis-Hillman entre un acrylate et divers aldéhydes, suivie d'une réaction d'ozonolyse permettant d'accéder au motif α-céto-ester (Schéma 93).

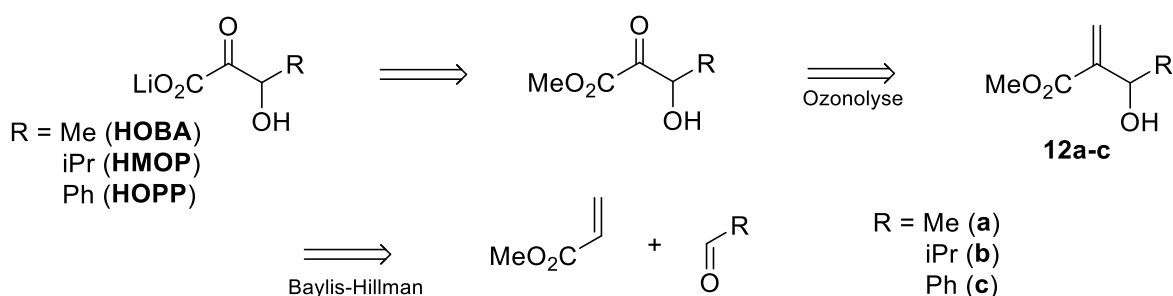


Schéma 93 : Rétrosynthèse envisagée pour les α-céto-β-hydroxyacides.

La condensation de l'acrylate de méthyle sur l'acétaldéhyde, l'isobutyraldéhyde et le benzaldéhyde a été effectuée en présence de 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane (DABCO). Après 7 à 14 jours de réaction, les 3 intermédiaires **12a-c** ont été isolés après distillation sous pression réduite avec des rendements respectifs de 82, 39 et 30 %. Nous avons



ensuite envisagé l'ozonolyse directe de ces dérivés. Cependant, les produits obtenus se sont révélés très instables et non purifiables par chromatographie. Ainsi, dans le cas du dérivé **12c**, nous avons notamment observé une isomérisation conduisant à un produit conjugué (Schéma 94).

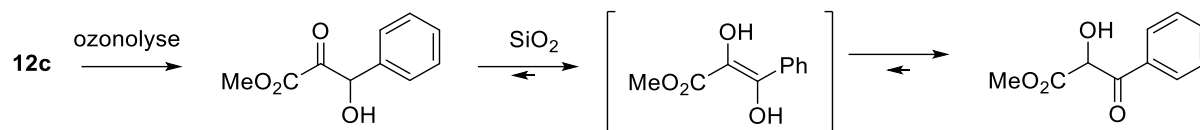


Schéma 94 : Isomérisation du composé **12c**.

Nous avons donc décidé d'acétyler les produits **12a-c** afin de stabiliser les produits d'ozonolyse. Cette acétylation a été effectuée en présence d'un léger excès de chlorure d'acétyle et de pyridine dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Les intermédiaires **13a-c** ont été isolés, après lavage et concentration, avec des rendements respectifs de 89, 80 et 91 %. Ils ont pu être engagés, sans purification supplémentaire, dans l'étape suivante d'ozonolyse qui a été effectuée selon le protocole standard déjà décrit pour l'obtention de l'OPBA. Ici encore, les produits **14a-c** se sont révélés instables lors d'une tentative de purification sur gel de silice. Cependant, la pureté des produits obtenus à l'issue de l'ozonolyse s'est avérée suffisante pour poursuivre la synthèse sans purification supplémentaire. La saponification a été réalisée dans des conditions douces en utilisant 2 équivalents de lithine et en contrôlant le pH à l'aide d'un pH-stat. Nous avons ainsi obtenu l'hydrolyse simultanée de l'ester méthylique et de l'acétate. Dans le cas du dérivé **14c**, la réaction s'est avérée efficace à  $\text{pH} = 8$ . Dans le cas de **14a** et **14b**, un pH égal à 10 a dû être appliqué pour observer une hydrolyse complète des 2 fonctions ester. Les produits finaux, ont été isolés après lyophilisation sous la forme de sels de lithium et en mélange avec un équivalent d'acétate de lithium. L'analyse RMN a permis de mettre en évidence une bonne pureté, les 3 produits représentant plus de 90 % (pourcentage molaire estimé par RMN  $^1\text{H}$ ) du solide obtenu sans comptabiliser l'acétate de lithium. La présence de ce dernier ne devrait pas poser de problème pour la mise en œuvre des criblages. Des rendements globaux de 46, 29 et 22 % ont été obtenus respectivement pour le HOBA, HMOP et HOPP et ces synthèses n'ont donc nécessité aucune purification par chromatographie. Cette approche efficace pourra à l'avenir être utilisée pour la synthèse d'une variété de cétoacides  $\beta$ -hydroxylés. Le Schéma 95 résume la synthèse des 3 cétoacides  $\beta$ -hydroxylés.

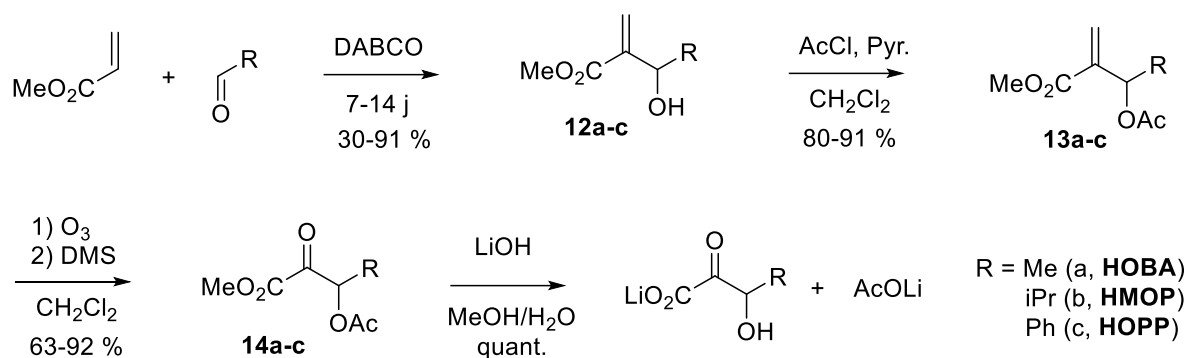


Schéma 95 : Synthèse des  $\alpha$ -céto- $\beta$ -hydroxyacides, HOBA, HMOP et HOPP.

### 2.2.3 Synthèse des cétoacides $\gamma$ -hydroxylés : HOP et HOPB

Très peu de dérivés  $\alpha$ -céto- $\gamma$ -hydroxyacides sont mentionnés dans la littérature. Une approche synthétique relativement directe a été proposée pour accéder au composé HOP, à l'acide 4,5-dihydroxy-2-oxopentanoïque ou au 4-hydroxy-KG (Schéma 96).<sup>250,251,252</sup>

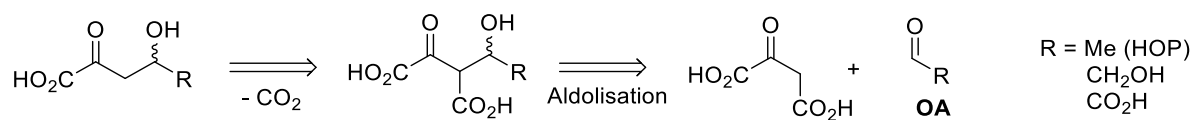


Schéma 96 : Approche générale décrite pour la synthèse des cétoacides  $\gamma$ -hydroxylés.

Cette méthode consiste à condenser l'OA sur un aldéhyde à pH = 8 puis à décarboxyler le produit d'aldolisation en milieu légèrement acide. L'utilisation de l'OA, qui est facilement déprotoné en milieu faiblement basique assure la chimiosélectivité de la réaction, en évitant notamment l'autocondensation de l'aldéhyde. Les produits de la réaction ne sont pas isolés mais utilisés en solution dans des réactions consécutives. Des tentatives d'isolement et de purification réalisées précédemment au laboratoire ont montré que ces produits subissent très facilement des réactions de déshydratation ou de lactonisation.

Nous avons donc appliqué cette méthodologie pour accéder aux 2 dérivés HOP (R = Me) et HOPB (R = Ph). Une solution aqueuse d'OA en présence d'un excès d'aldéhyde (acétaldéhyde ou benzaldéhyde) a donc été ajustée à pH = 8 et la réaction d'aldolisation suivie par dosage de l'OA résiduel en utilisant la malate-déshydrogénase et le NADH. En présence d'acétaldéhyde, nous avons observé une disparition complète de l'OA après 4 h, tandis que 20 h de réaction ont été nécessaires avec le benzaldéhyde. Comme nous

l'avons évoqué précédemment, l'OA se décarboxyle lentement en milieu neutre et nous avons aussi observé la formation concomitante de Pyr attestée par dosage avec la lactate-déshydrogénase et le NADH. À l'issue de l'aldolisation, la décarboxylation a été observée après ajustement du pH à 3 par addition de résine sulfonique. Après neutralisation de la solution à pH = 7, nous avons finalement isolé les 2 produits HOP et HOPB par lyophilisation. L'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  a montré que les deux produits sont majoritairement présents au sein de mélanges contenant aussi du pyruvate (16 % molaire dans le cas du HOP, 25 % dans le cas du HOPB) ainsi que les produits de déshydratation (12 % molaire dans le cas du HOP, 22 % dans le cas du HOPB) (Schéma 97).

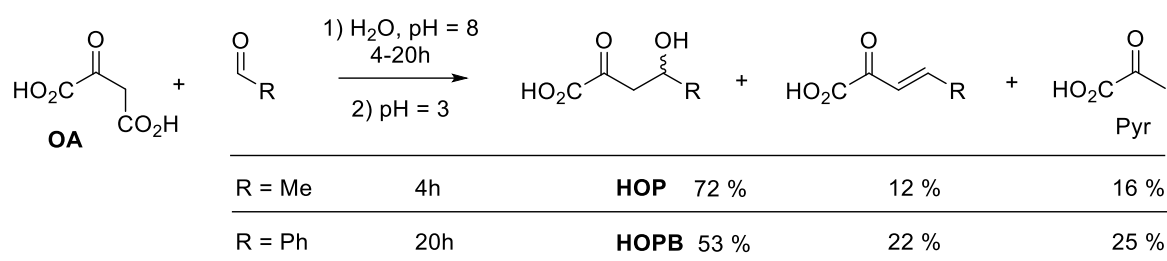


Schéma 97 : Synthèse des cétoacides  $\gamma$ -hydroxylés.

Afin de pouvoir disposer de produits plus purs, nous avons envisagé de préparer les lactones correspondantes, de les purifier et d'effectuer ensuite une saponification dans les conditions douces décrites ci-dessus pour les  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -cétoacides. À l'issue de l'aldolisation mettant en jeu l'OA et l'acétaldéhyde, nous avons donc acidifié le milieu à  $\text{pH} < 2$  afin de favoriser la formation de la lactone. Celle-ci a effectivement été isolée par extraction sous une forme impure. Cependant, de nouveau, une tentative de purification sur gel de silice a conduit à la formation d'impuretés supplémentaires parmi lesquelles nous avons notamment identifié des produits d'autocondensation (Schéma 98).

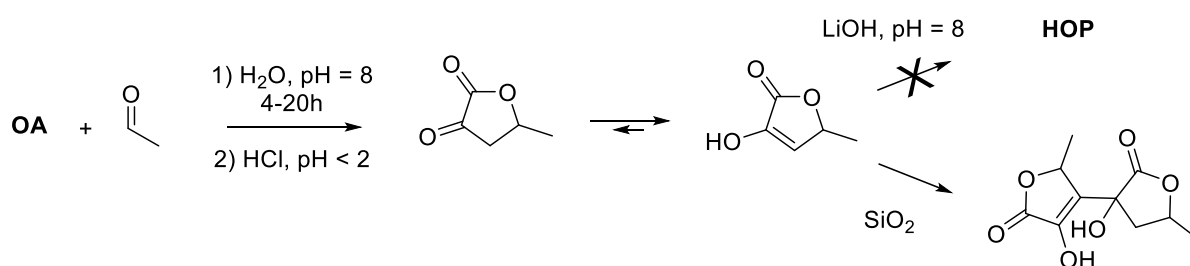


Schéma 98 : Tentative de synthèse du HOP via la lactone correspondante.

Par ailleurs un essai de saponification a conduit à un mélange complexe résultant de la formation de divers produits secondaires. Nous avons donc renoncé à cette approche et décidé d'utiliser les mélanges obtenus précédemment pour effectuer nos criblages.

## 2.2.4 Synthèse de la 1-hydroxy-3-phénylpropan-2-one (HPPO)

La synthèse de cette cétone non commerciale a été envisagée à partir du chlorure de phénylacétyle via la formation d'une diazocétone puis une réaction de substitution du groupement diazonium (Schéma 99).

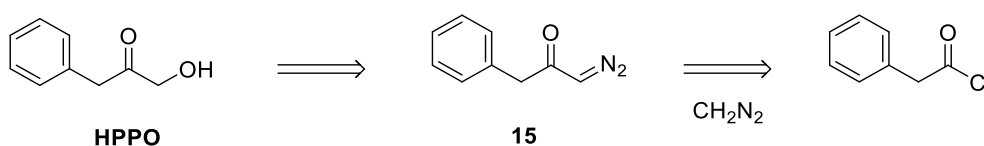


Schéma 99 : Rétrosynthèse envisagée pour l'HPPO.

La diazocétone a été préparée par addition du chlorure de phénylacétyle à une solution de diazométhane dans l'éther. Le diazométhane est généré à partir du Diazald commercial (Schéma 100).

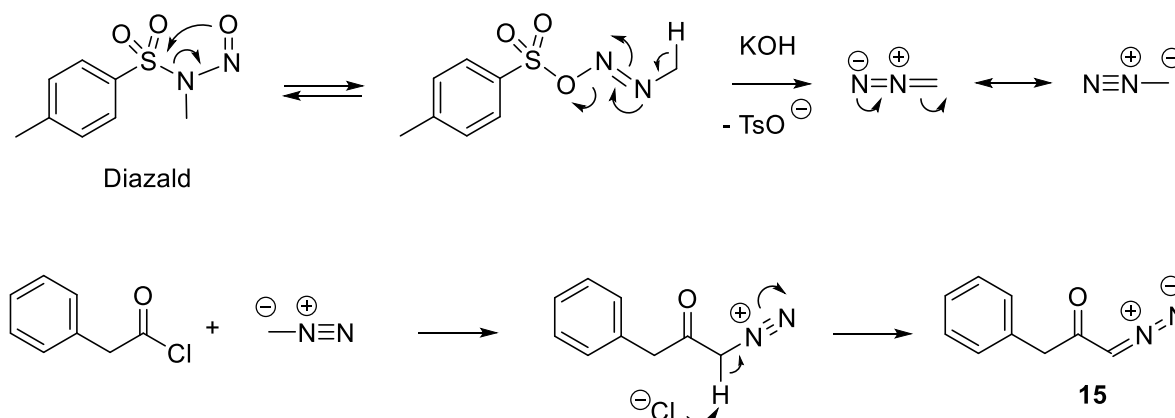
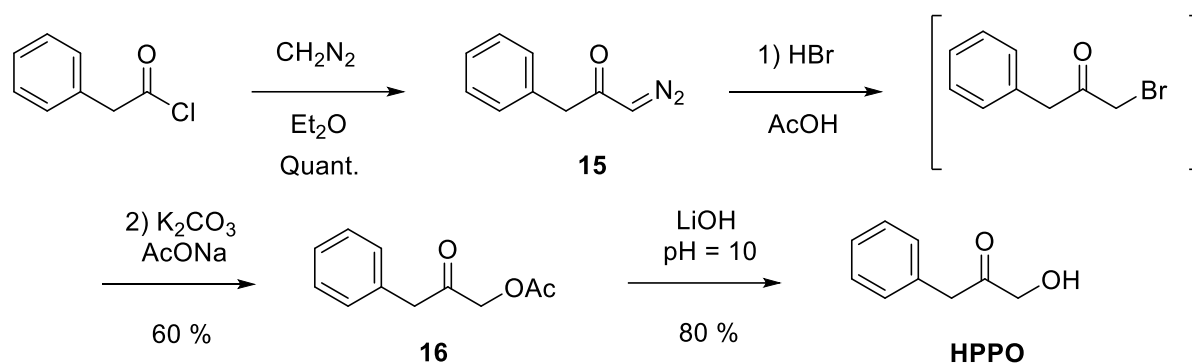


Schéma 100 : Synthèse de la diazocétone.

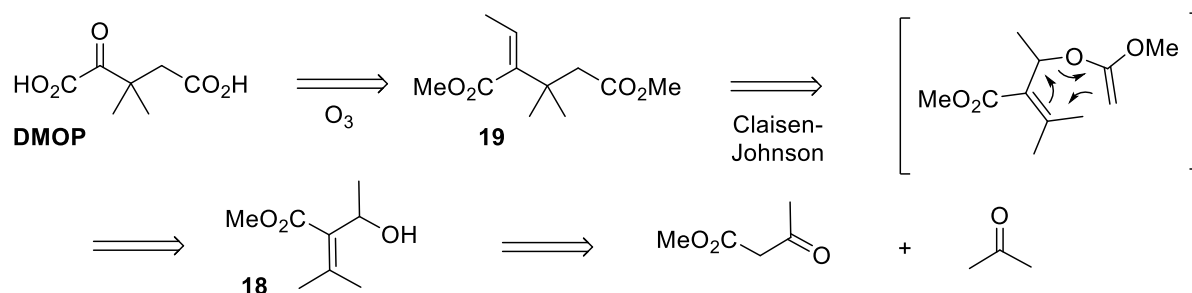
La diazocétone **15** a été isolée après lavage et concentration avec une excellente pureté et un rendement quantitatif. La substitution du groupement diazonium par un hydroxyle a été réalisée en 3 étapes. La diazocétone a tout d'abord réagi avec HBr en solution dans l'acide acétique pour produire une  $\alpha$ -bromocétone. L'addition de  $K_2CO_3$  et d'AcONa à ensuite permis de substituer le brome par un groupement acétate. L'intermédiaire **16** a ainsi été isolé après chromatographie avec une excellente pureté et

un rendement de 60 %. Enfin, une saponification réalisée avec une quantité stoechiométrique de lithine à pH = 10 a permis d'obtenir l'HPPO isolé après extraction, lavage et concentration avec un rendement de 80 %. Le Schéma 101 résume la synthèse de l'HPPO.



### 2.2.5 3.2.2.5 Synthèse de l'acide 3,3-diméthyl-2-oxopentanedioïque (DMOP)

Le DMOP, analogue du KG diméthylé en position 3 n'a jamais été décrit dans la littérature. Afin de le préparer, nous avons adopté une méthodologie développée précédemment au laboratoire.<sup>106</sup> Elle repose sur le réarrangement de Claisen-Johnson entre l'alcool allylique **18** et l'orthoacétate de triméthyle qui permet d'obtenir le 3-alkylidène glutarate **19** dont l'ozonolyse conduit au motif  $\alpha$ -cétoester (Schéma 102). L'alcool **18** est préparé par condensation entre l'acétoacétate de méthyle et l'acétone, suivie d'une réduction sélective de la fonction cétone.



La première étape d'aldolisation entre l'acétoacétate de méthyle et l'acétone a été réalisée selon des conditions décrites dans la littérature, en utilisant  $ZnCl_2$  comme

catalyseur, en solution dans l'anhydride acétique.<sup>253-257</sup> Après 72 h de chauffage à 60 °C, nous avons isolé un mélange de produits contenant majoritairement le composé **17** attendu mais aussi deux impuretés en quantité importante (Schéma 103).

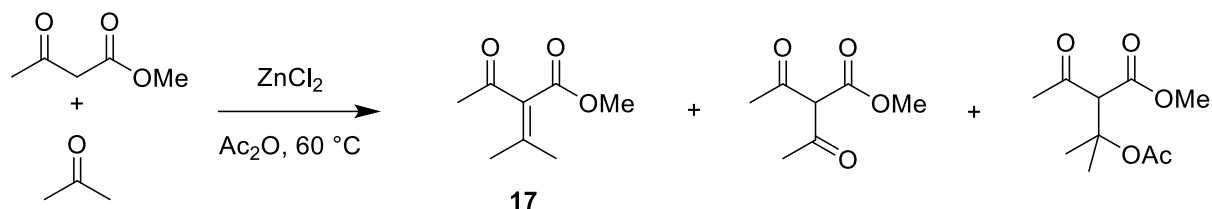


Schéma 103 : Synthèse de l'intermédiaire **17**.

Une distillation n'a pas permis de séparer efficacement les 3 produits. Une séparation partielle a cependant été obtenue par chromatographie sur gel de silice et nous avons pu isoler une fraction contenant le produit **17** avec une pureté > 95 % estimée par RMN <sup>1</sup>H. Bien que le rendement en produit purifié s'élève à seulement 15 %, nous avons obtenu une quantité suffisante de produit **17** pour poursuivre la synthèse. Nous n'avons donc pas cherché, à ce stade, à optimiser cette réaction. La réduction sélective du composé **17** a ensuite été réalisée avec NaBH<sub>4</sub> en présence de CeCl<sub>3</sub> en solution dans un mélange THF/MeOH.<sup>258</sup> Le produit **18** a été isolé après chromatographie avec un rendement de 64 %. Le réarrangement de Claisen-Johnson consiste à faire réagir un alcool allylique avec un orthoester en présence d'un catalyseur acide. Une première réaction de trans-orthoestérification suivie de l'élimination d'une molécule de méthanol conduit alors à la formation d'un acétal de cétène qui subit ensuite le réarrangement conduisant à l'intermédiaire **19**. Un premier essai, réalisé avec l'acide propionique comme catalyseur, a conduit, en plus du produit attendu, à une quantité importante d'un produit secondaire résultant probablement d'une estérification entre l'alcool **18** et l'acide propionique, suivie d'un réarrangement électrocyclique (Schéma 104).

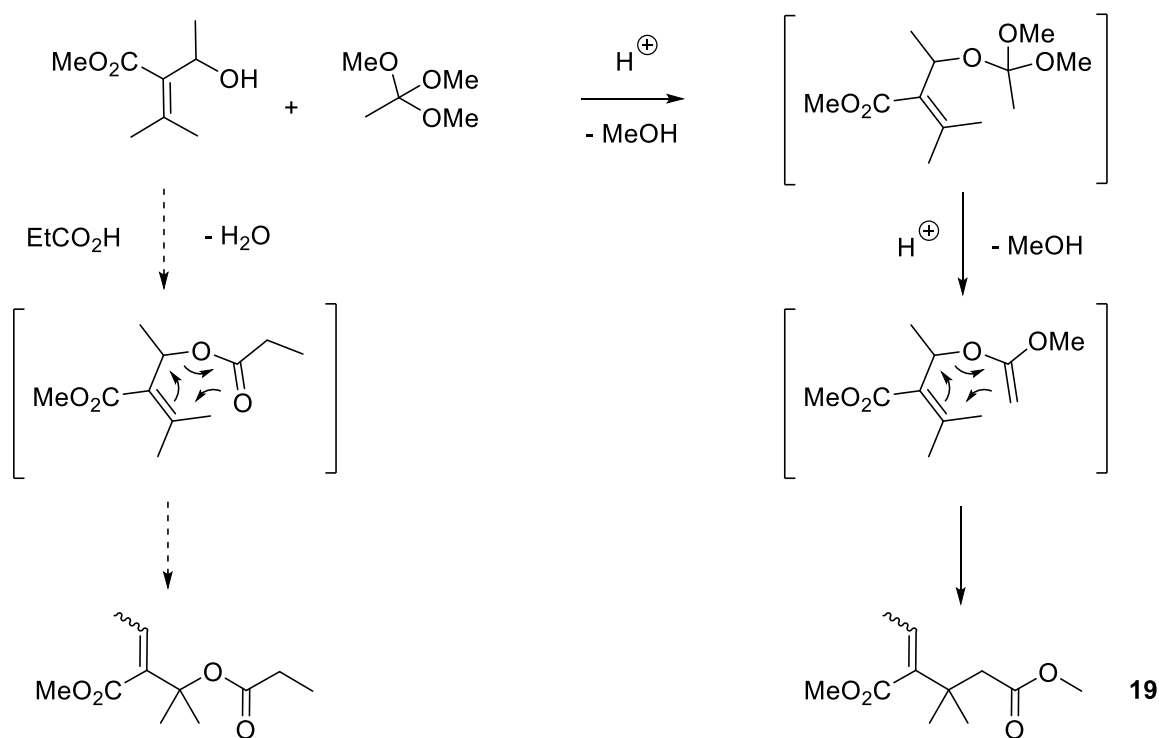


Schéma 104 : Mécanisme du réarrangement de Claisen-Johnson et de la formation d'une impureté.

Le remplacement de l'acide propionique par l'acide pivalique plus encombré a permis de réduire le pourcentage de cette impureté. L'intermédiaire **19** a ainsi été isolé après chromatographie avec un rendement de 56 %. L'ozonolyse a ensuite été réalisée selon un protocole standard en utilisant le diméthylsulfure (DMS) comme agent réducteur. Cependant dans ces conditions nous avons observé une réduction lente et incomplète des ozonides. Nous avons alors remplacé le DMS par de la triphénylphosphine (Ph<sub>3</sub>P). Dans ces conditions, nous avons observé la réduction totale des ozonides et le cétodiester **20** a été isolé après chromatographie avec un rendement de 83 %. Finalement, la saponification du diester a été faite comme décrit précédemment en utilisant une quantité stoechiométrique de LiOH à pH = 10 dans un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH (80/20). Le DMOP a finalement été isolé après lyophilisation avec une excellente pureté (> 95 % selon la RMN <sup>1</sup>H) et avec un rendement global de 30 % à partir du produit **17** (4,5 % à partir de l'acétoacétate). Le Schéma 105 résume la synthèse du DMOP.

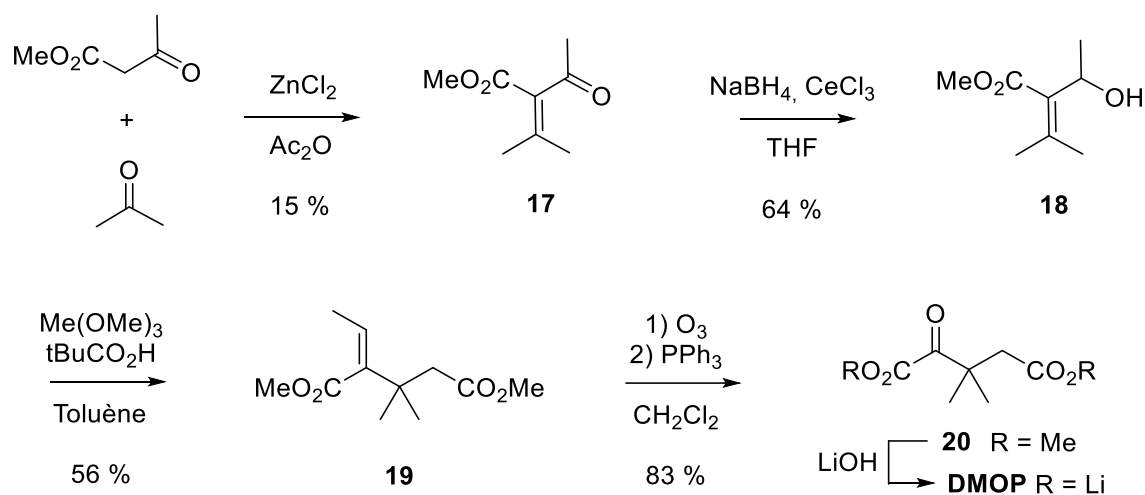


Schéma 105 : Synthèse du DMOP.

## 2.2.6 Synthèse de l'acide 2-(carboxycarbonyl)-4-oxoazétidine-3-carboxylique (COC)

Nous avons enfin entrepris la synthèse d'un autre analogue du KG possédant un motif  $\beta$ -lactame (COC). Ce travail a été en partie réalisé dans le cadre du stage de Master 2 d'Axel Gorce. Cet analogue original du KG devrait permettre la synthèse d'un nouvel analogue du Glu qui possède une structure voisine d'un dérivé cyclobutane (L-CBG-II), préparé au laboratoire, et qui a montré une sélectivité vis-à-vis des récepteurs métabotropiques du Glu appartenant au groupe des mGluR-II (Schéma 106).<sup>107</sup> Ces récepteurs représentent une cible thérapeutique d'intérêt car ils jouent un rôle essentiel dans la régulation de la quantité de Glu dans la fente synaptique. Lors de leur activation, la libération de Glu est fortement diminuée. Des agonistes sélectifs des mGluR-II pourraient donc permettre d'apporter des solutions thérapeutiques aux dysfonctionnements du SNC impliquant le phénomène d'excitotoxicité qui résulte d'une suractivation des récepteurs par le Glu.<sup>259,260</sup> La modulation de l'activité des mGluR-II a ainsi montré des résultats très prometteurs pour le traitement de l'anxiété, de l'épilepsie, de la schizophrénie ainsi que des effets protecteurs contre l'ischémie.<sup>261,262</sup> La modélisation des interactions entre le L-CBG-II et les mGluR-II laisse penser que la substitution du cyclobutane par un  $\beta$ -lactame - qui permet de conserver une conformation contrainte tout en offrant de nouvelles possibilités d'interaction - pourrait permettre d'augmenter l'affinité et la sélectivité vis-à-vis de ces récepteurs. La découverte de TA permettant de convertir efficacement le COC en analogue du Glu serait donc d'un grand intérêt.



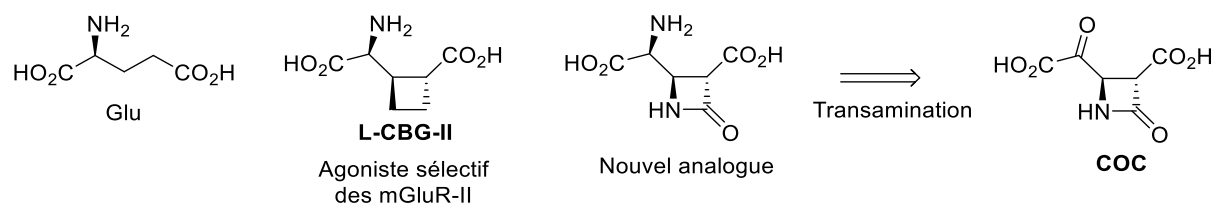


Schéma 106 : Structure d'analogues contraints du Glu.

Les expériences que nous avons mené en vue de préparer le COC, s'inscrivent dans la continuité de travaux antérieurs qui ont permis de valider partiellement une approche synthétique originale qui repose d'une part sur le réarrangement électrocyclique par voie photochimique d'une pyridone et sur une réaction d'ozonolyse permettant de créer les motifs  $\beta$ -lactame et  $\alpha$ -cétoester (Schéma 107).

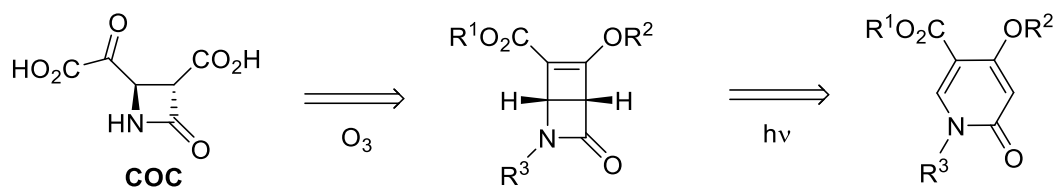


Schéma 107 : Rétrosynthèse proposée pour le COC.

Au cours de précédents travaux menés au laboratoire, cette approche a été explorée avec différents groupements  $R^{1-3}$ . La présence d'un groupement  $R^2$  sur l'oxygène phénolique est essentielle pour l'obtention d'un éther ou ester d'énol avant l'étape d'ozonolyse. La présence d'un substituant sur l'azote s'est également révélée nécessaire pour le bon déroulement du réarrangement électrocyclique. Dans le cas où  $R^1 = R^2 = R^3 = \text{Me}$ , la synthèse a pu être menée à son terme à partir de la pyridone **21** dont la synthèse est décrite dans la littérature (Schéma 108).<sup>263</sup> Cette synthèse a été réalisée par Julie Kristiansen au cours de son stage de Master 2.

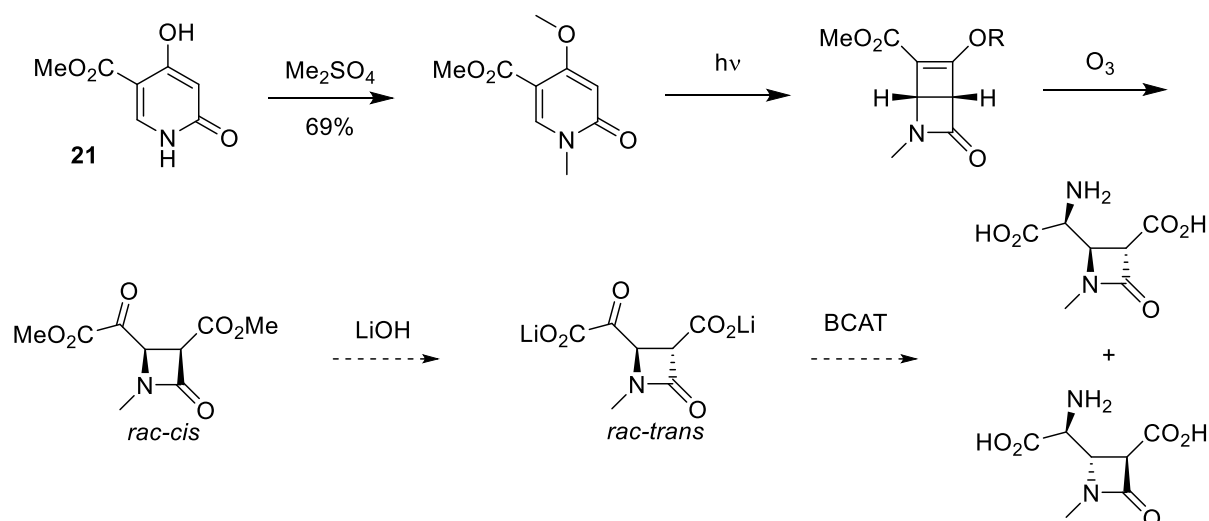


Schéma 108 : Synthèse d'un analogue N-méthylé du COC.

En dépit de nombreux essais, il n'a pas été possible d'alkyler sélectivement le groupement hydroxyle de la pyridone **21**. En effet cette pyridone est aussi alkylée au niveau de l'amide (azote et oxygène) mais aussi au niveau du carbone 3. L'utilisation de diméthylsulfure et de  $K_2CO_3$  dans l'acétone a cependant permis d'effectuer une dialkylation sélective avec un bon rendement de 69 %. La pyridone triméthylée a donc été utilisée pour valider l'approche synthétique. Les conditions du réarrangement électrocyclique et de l'ozonolyse ont été optimisées et les 2 produits attendus ont été obtenus avec des bons rendements. Cependant, ces intermédiaires sont relativement instables et il n'a pas été possible de les purifier par chromatographie. Dans les 2 cas, l'analyse RMN a cependant permis de confirmer la structure des produits et de montrer qu'ils étaient majoritairement présents dans les mélanges obtenus (> 80 %). Par contre la saponification a conduit à un mélange de nombreux dérivés très difficilement analysable mais susceptible de contenir le dérivé N-méthylé du COC. Un essai de transamination a alors été réalisé en utilisant la BCAT d'*E. coli* et la formation de 2 analogues du Glu de configuration *trans* a pu être mise en évidence. Ces 2 produits ont cependant été isolés en très faibles quantités (5 mg). Quoi qu'il en soit, ces résultats nous ont encouragés à poursuivre nos efforts pour accéder au COC et pour trouver des TA efficaces pour convertir le COC en analogues du Glu.

Pour notre part, nous avons donc envisagé de préparer 2 nouvelles pyridones présentant des groupements plus labiles et permettant une déprotection finale dans des conditions plus douces permettant d'accéder au COC (Schéma 109).

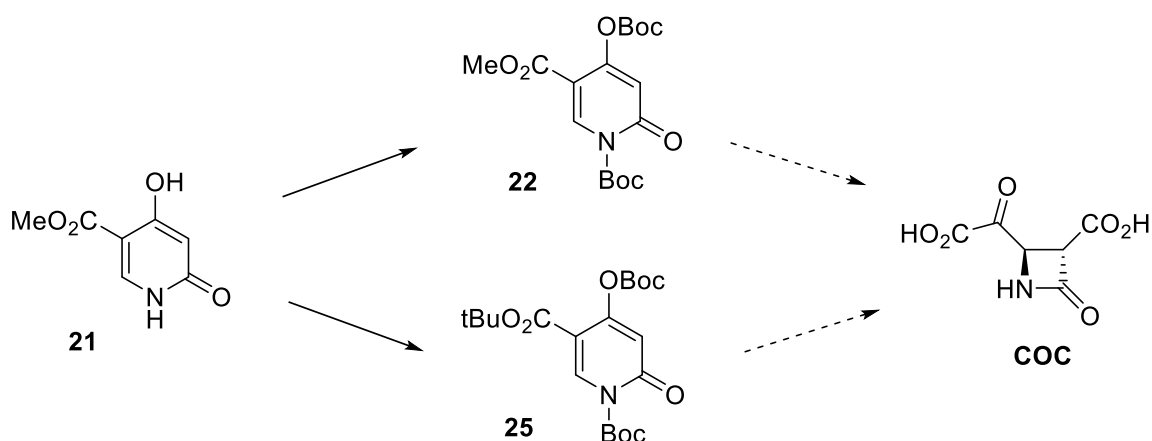


Schéma 109 : Synthèse envisagée pour le COC, via les intermédiaires **22** et **23**.

Nous avons choisi le groupement Boc pour protéger l'azote amidique et le phénol de la pyridone **21**. Nous avons aussi envisagé de substituer l'ester méthylique par un ester tert-butylique afin de pouvoir éliminer les 3 groupements protecteurs dans des conditions douces, en milieu faiblement acide.

### 2.2.6.1 Synthèse des pyridones (21-25)

La pyridone **21** a été préparée à partir du 3-oxopentanedioate de diméthyle et d'orthoformiate de triméthyle (Schéma 110).<sup>263</sup>

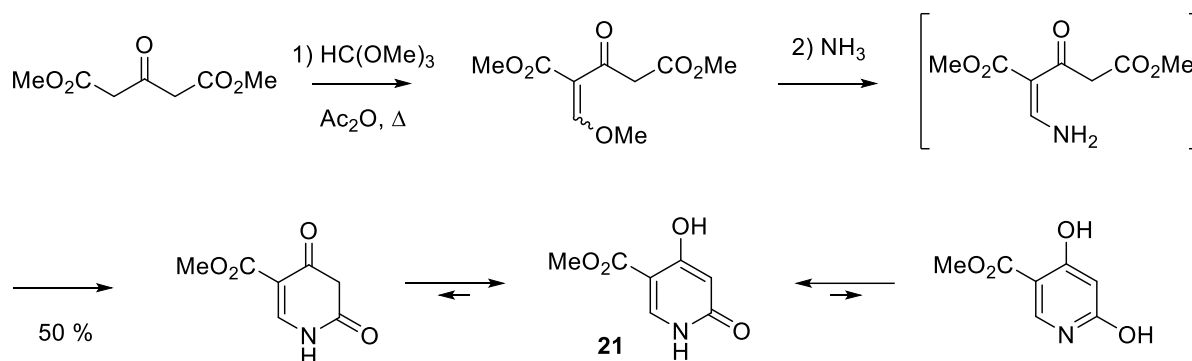


Schéma 110 : Synthèse de la pyridone **21**.

Cette synthèse comprend une condensation entre le cétoester et l'orthoformiate qui conduit après élimination de MeOH à un intermédiaire de type β-méthoxyacrylate. Ce dernier réagit ensuite avec l'ammoniac pour donner tout d'abord une substitution, puis une cyclisation par aminolyse de l'ester en position 5. Le produit **21**, stable sous la forme pyridone est ainsi isolé avec un rendement de 50 %.

La pyridone **22** a ensuite été préparée par réaction avec l'anhydride carbonique  $\text{Boc}_2\text{O}$ . Après plusieurs essais, nous avons observé une réaction complète en 24 h avec 3 équivalents de  $\text{Boc}_2\text{O}$  en présence de triéthylamine dans le DMF. Une tentative de purification par chromatographie a montré que les groupements Boc sont éliminés au contact de la silice. Nous avons cependant jugé la pureté du produit **22** suffisante (> 90 % estimée par RMN) pour poursuivre la synthèse sans purification supplémentaire (Schéma 111).

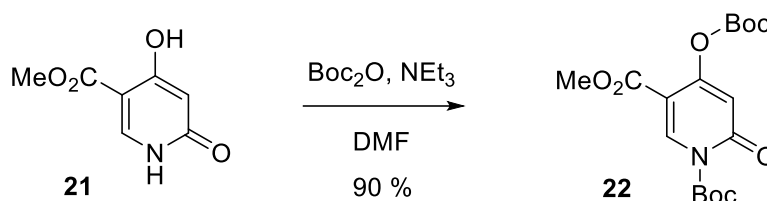


Schéma 111 : Synthèse de la pyridone **22**.

Afin d'accéder à la pyridone **25**, nous avons exploré différentes voies. Une transestérification mettant en jeu la pyridone **21** et le tert-butanol n'a pas pu être réalisée en dépit d'un grand nombre d'essais dans des conditions variées (catalyse acide ou basique). Nous avons alors décidé d'hydrolyser l'ester méthylique et de préparer la pyridone **23** présentant une fonction acide pouvant être ensuite estérifiée. La saponification a nécessité un chauffage à reflux pendant 48 h de la pyridone **21** dispersée dans un mélange  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  en présence de 2,5 équivalents de  $\text{LiOH}$ . Après acidification, l'acide **23** a été isolé avec un rendement de 98 %. Après plusieurs essais infructueux d'estérification avec le tert-butanol en milieu acide ou avec un agent de couplage (DCC), nous avons pensé qu'il serait envisageable de réaliser simultanément l'estérification et l'introduction des groupements Boc. En effet, la réaction de l'acide avec  $\text{Boc}_2\text{O}$  conduit à la formation d'un anhydride mixte carbonique susceptible de réagir avec le  $\text{tBuOH}$  pour produire l'ester tert-butylique (Schéma 112).

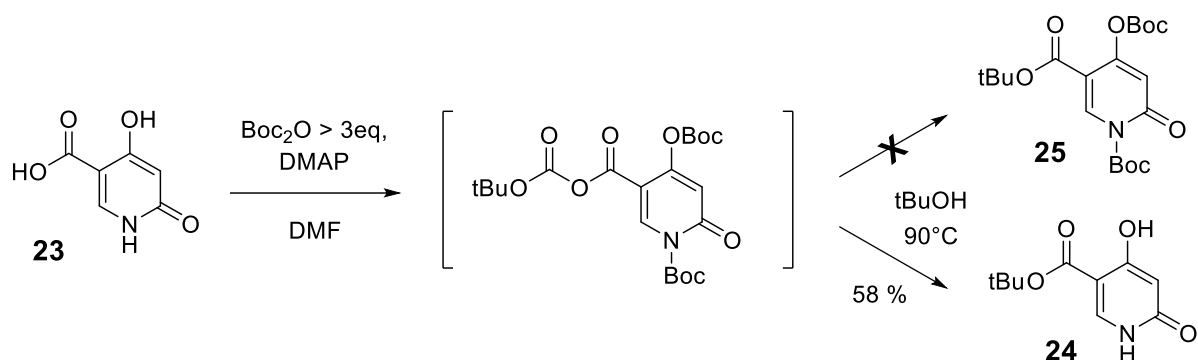


Schéma 112 : Méthode envisagée pour les synthèses des pyridones **24** et **25**.

Malheureusement, en dépit de nombreux essais et de temps de réaction très longs (jusqu'à une semaine à température ambiante) la réaction est restée incomplète et a donné lieu à la formation d'un mélange de divers intermédiaires. Un chauffage consécutif à 90 °C a cependant permis d'observer la formation de l'ester **24** que nous avons pu isoler avec un rendement de 58 %. Le chauffage permet donc la réaction du tBuOH avec l'anhydride, mais aboutit aussi à la perte des groupements Boc. Ce résultat démontre encore la labilité de ces groupements sur cet hétérocycle. De nouveau, le composé **24** n'a pas pu être purifié par chromatographie sur silice. Cependant, nous avons estimé sa pureté suffisante (> 90 %) pour l'engager dans la réaction suivante. Nous avons donc soumis le composé **24** à une nouvelle réaction avec 3 équivalents de Boc<sub>2</sub>O pour accéder à la pyridone **25**. Après concentration, nous avons obtenu un mélange de produits contenant majoritairement la pyridone **25** (70 % d'après l'analyse du spectre de RMN <sup>1</sup>H) et une impureté résultant d'une réaction d'isomérisation (19 %). L'analyse par ccm de l'évolution du milieu réactionnel, a par ailleurs montré que ce produit se forme à partir de la pyridone **25** et que sa quantité augmente avec le temps de réaction (Schéma 113).

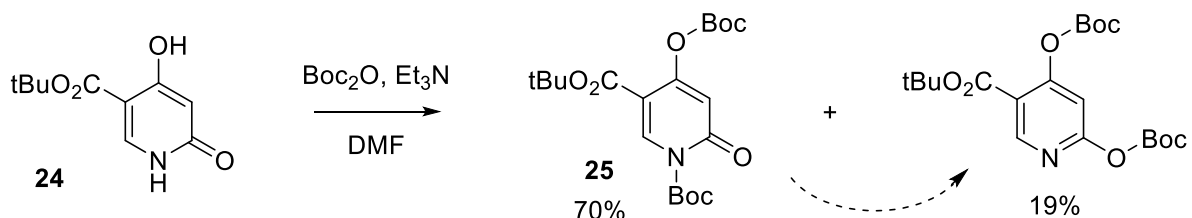


Schéma 113 : Synthèse et isomérisation de la pyridone **25**.

Malgré la proportion non négligeable de cette impureté, le produit **25** n'étant pas stable, nous n'avons pu procéder à sa purification. Cependant, l'impureté qui est une pyridine s'est révélée inerte dans les conditions suivantes du réarrangement électrocyclique et de l'ozonolyse.

### 2.2.6.2 Réarrangement électrocyclique des pyridones et ozonolyse

Les 2 pyridones **22** et **25** en solution dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ont été irradiées avec une lampe à mercure de 400 W, dans un réacteur en Pyrex. Les 2 composés ont été convertis en dérivés bicycliques **26** et **27** de façon quasi quantitative (> 95 %) en 8 h pour le produit **22** et en 3,5 h pour le produit **25** (Schéma 114).

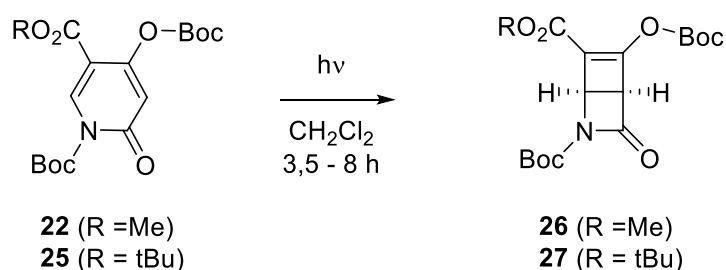


Schéma 114 : Produits de réarrangement électrocyclique issus des composés **22** et **25**.

Les 2 composés **26** et **27** présentent une stéréochimie *cis*, dictée par les règles de Woodward-Hoffmann.<sup>264</sup> Dans le cas de notre système à quatre orbitales engagées dans un processus photochimique, le réarrangement électrocyclique s'effectue de façon disrotatoire, ce qui dispose les hydrogènes en position 3 et 4 du lactame sur la même face du système bicyclique (Schéma 115).

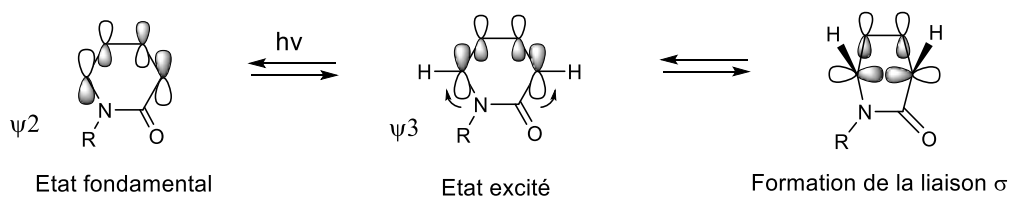


Schéma 115 : Règles de Woodward-Hoffmann pour le réarrangement électrocyclique.

Ces produits ne peuvent être purifiés par chromatographie. Toutefois, nous avons de nouveau considéré que la pureté des 2 produits **26** et **27** était suffisante pour poursuivre la synthèse.

L'ozonolyse a été réalisée directement sur les solutions des composés **26** et **27** dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> obtenues à l'issue du réarrangement électrocyclique. Les ozonides obtenus ont été réduits en présence de Me<sub>2</sub>S et les composés **28** et **29** ont été isolés après lavage et évaporation du solvant (Schéma 116). La RMN a permis de montrer que dans les 2 cas, les composés attendus étaient bien formés très majoritairement.

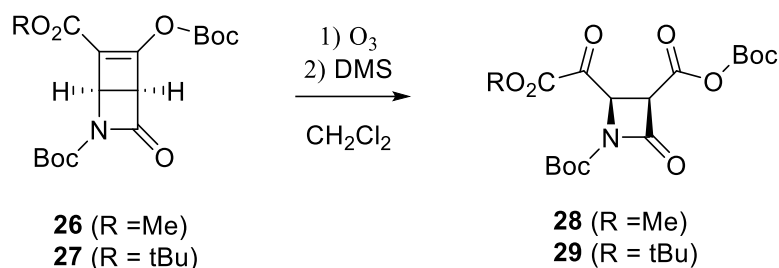


Schéma 116 : Synthèse des composés **28** et **29** par ozonolyse des composés **26** et **27**.

Les constantes de couplage mesurées ( $J = 5,6$  à  $6,8$  Hz) pour les deux hydrogènes en position 3 et 4 des cycles  $\beta$ -lactame sont en accord avec une configuration *cis*.<sup>265,266</sup> Nous avons aussi observé, une isomérisation partielle en produits de configuration *trans* ( $J = 2,8$  à  $3,4$  Hz) ainsi qu'une l'hydrolyse partielle de l'anhydride mixte carbonique (CO<sub>2</sub>Boc).

### 2.2.6.3 Déprotection des intermédiaires **28** et **29**

Nous avons tenté de déprotéger les 2 composés **28** et **29** en les soumettant à des conditions d'hydrolyse en milieu acide. Pour des raisons de clarté, nous nous limiterons ici à la présentation des résultats obtenus avec le composé **29**. Nous avons utilisé deux catalyseurs différents : une résine sulfonique (Dowex 50) d'une part et de l'acide chlorhydrique (0,5 M) d'autre part. Afin de contrôler l'avancement de la déprotection, nous avons fait un suivi par RMN de l'évolution du milieu réactionnel. Pour cela, à des temps variables, des aliquots ont été concentrés sous pression réduite et les résidus dissous dans le DMSO-D<sub>6</sub> pour permettre l'analyse par RMN <sup>1</sup>H. Nous avons alors pu observer au cours du temps la formation de différentes espèces qui sont répertoriées dans le Schéma 117, et qui résultent à la fois de l'isomérisation *cis-trans* du cycle lactame, de l'hydrolyse des divers groupements (anhydride, carbamate et ester), de l'hydratation du groupement carbonyle du dérivé *trans*, et de la cyclisation du dérivé *cis*.

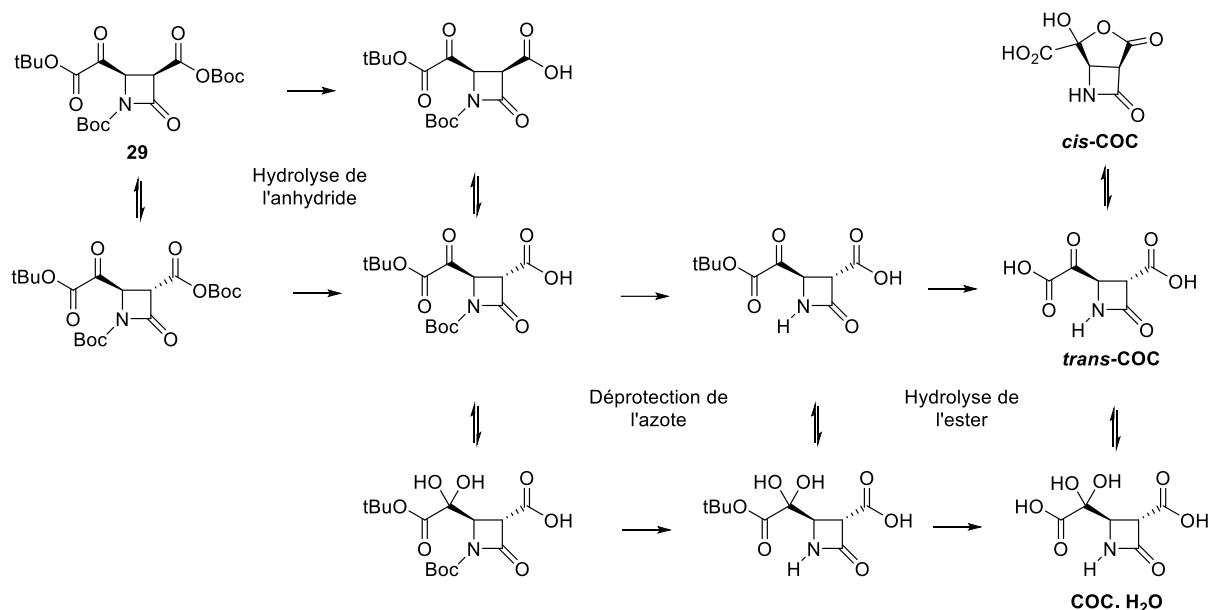


Schéma 117 : Intermédiaires formés au cours de l'hydrolyse en milieu acide du composé **29**.

Au cours de ces expériences, nous avons été confrontés à un problème de reproductibilité à l'origine d'incohérences au niveau des analyses RMN. Il conviendra donc lors de prochains essais de neutraliser les aliquots et d'utiliser les conditions les plus douces possible pour éliminer l'eau, comme par exemple par lyophilisation. Malgré ces problèmes, ces expériences nous ont cependant permis de tirer plusieurs conclusions.

Nous avons observé dans les 2 cas (résine sulfonique ou HCl) l'hydrolyse rapide de l'anhydride et l'isomérisation *cis* → *trans* du lactame. A peu près la moitié du produit se trouve par ailleurs sous forme hydrate en dépit de la faible quantité d'H<sub>2</sub>O dans le DMSO D<sub>6</sub>.

D'autre part, en présence de résine sulfonique (Dowex, H<sup>+</sup>), la déprotection de l'azote est lente et encore incomplète après 140 h à température ambiante. Dans le même temps, nous n'avons pas observé l'hydrolyse de l'ester tert-butyle. La Figure 24 illustre l'évolution du milieu réactionnel que nous avons pu observer. Les couples de doublets correspondent aux deux hydrogènes en position 3 et 4 du β-lactame pour les différents intermédiaires.



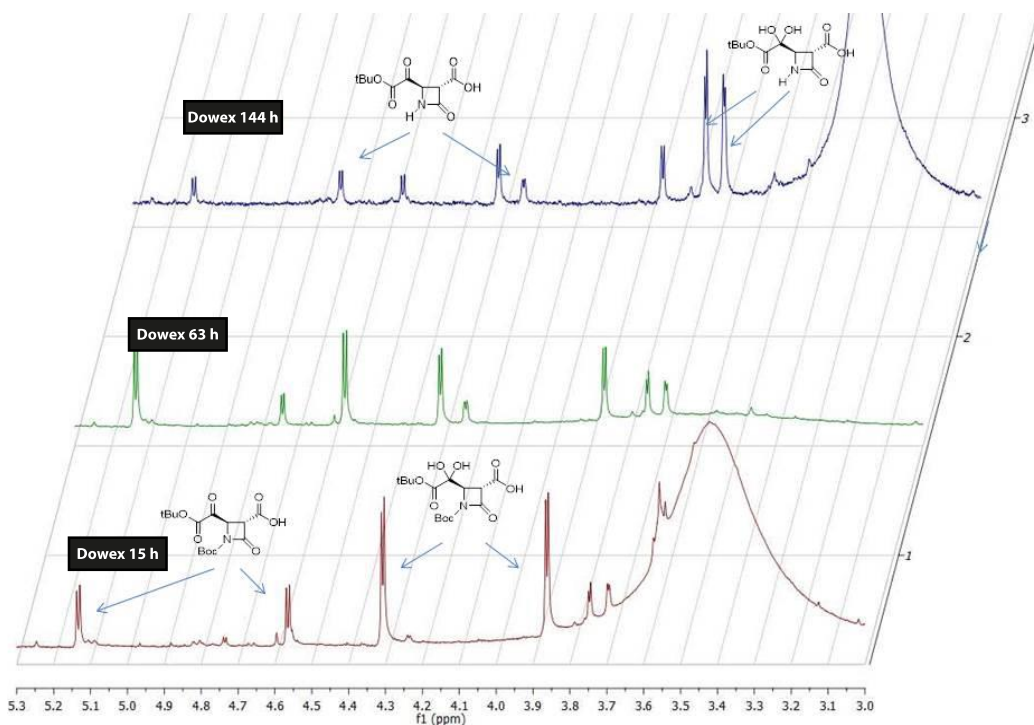


Figure 24 : Suivi par RMN <sup>1</sup>H de la déprotection du produit **29** en présence de résine acide.

On peut remarquer que la déprotection de l'azote s'accompagne de l'apparition d'un doublet dédoublé correspondant à l'atome d'hydrogène en position 4 qui présente, en plus du couplage avec le CH voisin ( $J = 2,8$  Hz), un couplage avec l'hydrogène porté par l'azote ( $J = 0,6$  Hz). On peut aussi remarquer que la proportion des formes hydrates est corrélée avec la quantité d'eau présente en solution (grand pic large à 3,5 ppm environ).

Enfin, en présence d'HCl 0,5 M, nous avons pu observer une déprotection quasi complète de l'azote en quelques heures, et un début de déprotection de l'ester conduisant au COC. Celle-ci demeure cependant incomplète (environ 30 %) après 22 h de réaction (Figure 25).

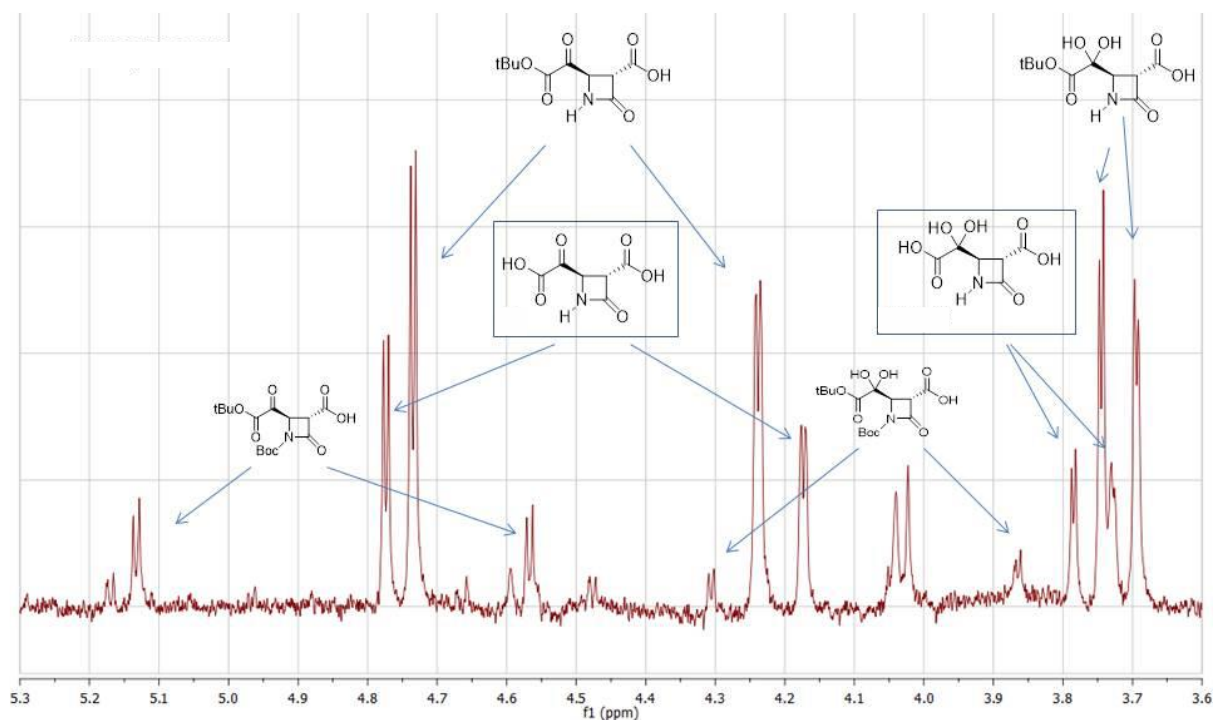


Figure 25 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-D}_6$ ) obtenu pour l'hydrolyse du cétoester **29** en présence d' $\text{HCl}$  à 0,5 M après 22 h.

Malgré ces résultats très prometteurs, nous n'avons pu, par manque de temps, optimiser la synthèse du COC et disposer d'une quantité suffisante pour l'inclure dans nos criblages. Nous avons cependant contribué à des avancées notables qui permettront sans nul doute de finaliser cette synthèse dans un avenir proche.

Pour conclure, nous avons pu mener à terme la synthèse de la quasi-totalité des substrats donneurs et accepteurs non commerciaux que nous avons choisis pour le criblage des collections de TA. La construction des banques d'enzymes constitue l'objet du chapitre suivant.

### 3 Création des collections de transaminases

Parmi les différentes approches permettant l'obtention de nouveaux biocatalyseurs, nous avons choisi de rechercher de nouvelles TA dans la biodiversité en adoptant une approche d'exploration génomique. Compte tenu de la diversité microbiologique et de la part probablement infime des organismes qui ont été décrits à ce jour, il est raisonnable de postuler qu'une très grande variété d'enzymes, optimisées au cours de milliards d'années d'évolution, reste encore à découvrir. Par ailleurs, les progrès des dernières décennies dans le domaine du séquençage ont conduit à une accumulation sans

précédent de séquences dans les bases de données génomiques. L'exploration de ces mines de gènes apparaît donc comme une voie pertinente pour identifier de nouvelles enzymes avec des propriétés originales et valorisables. C'est la démarche qu'a choisi d'adopter l'équipe du Dr Véronique de Bérardinis au Génoscope d'Evry. Globalement, cette approche repose sur la création de banques de protéines présentant une identité modérée entre elles et avec des enzymes bien décrites et caractérisées, ces dernières possédant des activités proches de celles qui sont recherchées. En bref, cette démarche repose sur le postulat que des protéines proches en termes de séquences, auront des activités enzymatiques également proches. La création de ces banques d'enzymes se décompose donc en 4 étapes :

- 1) Création d'un set de référence regroupant des enzymes bien caractérisées expérimentalement et qui possèdent des propriétés similaires à celles qui sont recherchées.
- 2) Sélection de toutes les séquences protéiques présentes dans les bases de données et possédant un certain taux d'identité avec les enzymes du set de référence.
- 3) Réduction du nombre de séquence par « clustering », c'est-à-dire en regroupant les séquences semblables et en sélectionnant un nombre limité de candidats par groupe (cluster).
- 4) Clonage et surexpression des séquences sélectionnées.

Le criblage de ces banques en utilisant des méthodes adaptées, permet ensuite de détecter les activités enzymatiques recherchées (Figure 26).

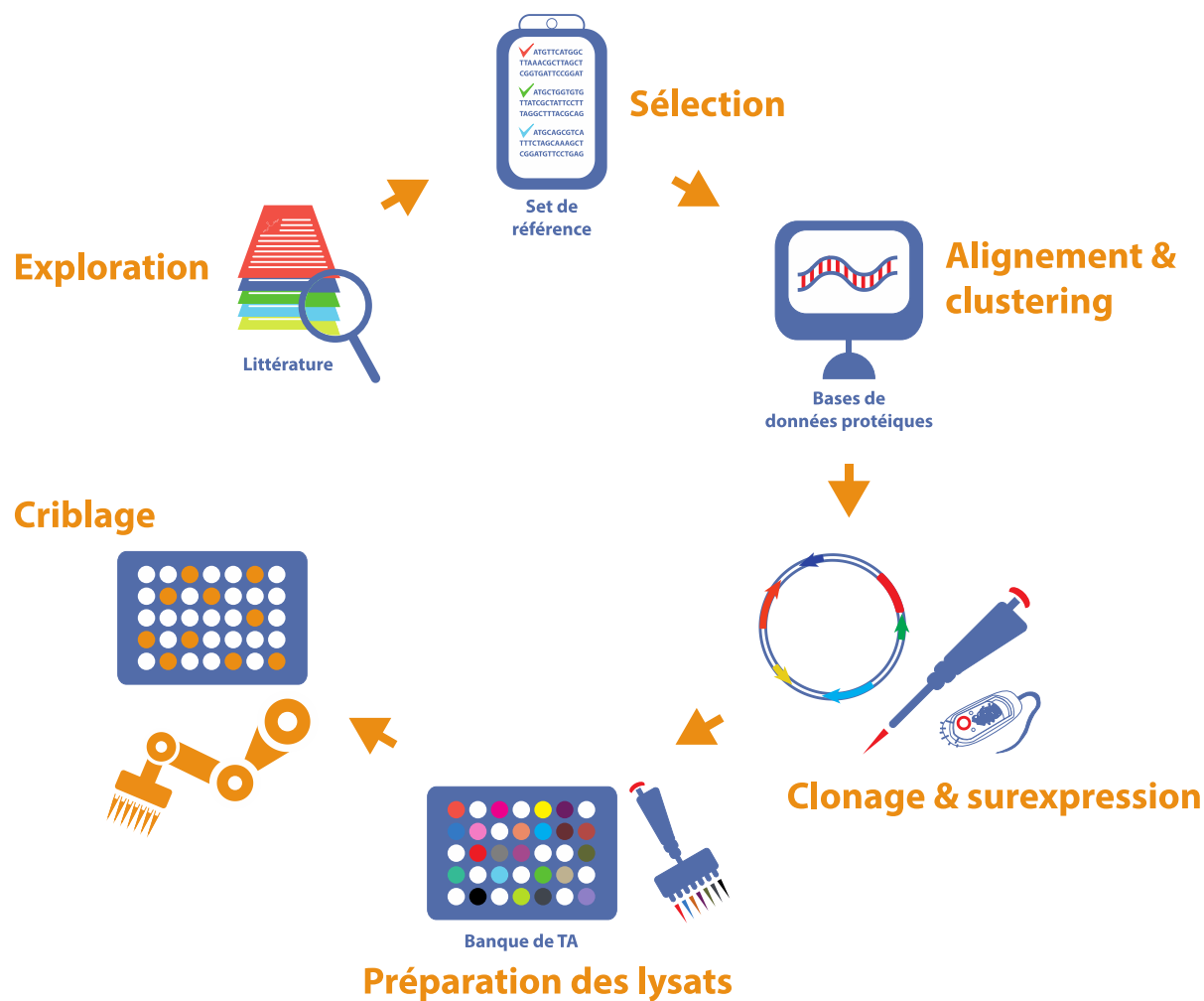


Figure 26 : Démarche générale d'exploration génomique pour la recherche de nouvelles TA.

Cette approche a largement fait ses preuves au cours des dernières années en permettant la découverte de nouveaux biocatalyseurs valorisables appartenant à différentes classes d'enzymes : nitrilases, aldolases, baeyer-willigerase, ou encore dioxygénases.<sup>267-270</sup>

Cette thèse a donc été l'occasion d'initier un nouveau projet collaboratif entre l'ICCF de Clermont-Ferrand et le Génomoscope d'Evry. Grâce à cette collaboration, nous avons pu disposer de plusieurs collections de TA au sein desquelles nous avons cherché diverses activités de transamination en utilisant les tests de criblages que nous avons mis au point.

Une première collection, constituée de deux banques TAM(A) et (B) identiques mais issues de deux cultures bactériennes différentes, et contenant des TA très variées annotées dans les différentes classes, a tout d'abord été construite. Cette collection a

ensuite été complétée par 2 autres banques TAM(C) et (D). La banque TAM(C) contenant des TA annotées dans la Classe IV a été créée en vue de découvrir de nouvelles D- $\alpha$ -TA et (*R*)-amine-TA. La banque TAM(D) contenant quant à elle des TA annotées dans la Classe III a été conçue pour trouver de nouvelles (*S*)-amine-TA.

### 3.1 Construction de la première collection : TAM(A)

#### 3.1.1 Élaboration du set de référence

La banque TAM(A) a été construite dans l'optique de regrouper des TA diverses représentant la variété des activités enzymatiques existant au sein des Classes I-V. Nous avons donc regroupé dans le set de référence (SDR(A)) des TA appartenant à ces différentes classes et présentant un faible taux d'homologie. Deux critères de sélection, ont par ailleurs orientés nos choix : un large spectre de substrat et/ou une activité vis-à-vis de substrat de type  $\beta$ -amino- ou  $\beta$ - cétoacides. Ce dernier critère avait, bien sûr, pour objectif une optimisation des chances d'identifier de nouvelles  $\beta$ ASTA avec notre test direct utilisant le DTNB. Nous avons ainsi sélectionné diverses enzymes à large spectre acceptant l'Asp, l'OA, la  $\beta$ -alanine, ou encore la  $\beta$ -homoalanine. Après une analyse bibliographique (réalisée en janvier 2013), 18 TA ont été retenues, qui répondent aux différents critères de sélection. Ces enzymes sont regroupées dans le Tableau 15, avec leur numéro d'immatriculation et leur annotation dans la base de données UniProt. L'organisme d'origine de ces TA, ainsi que les références bibliographiques qui ont permis leur identification sont aussi mentionnés.

Tableau 15 : Séquences sélectionnées pour le set de référence de TAM(A).

Entrée	N° UniProt	Organisme	Classe	Annotation UniProt	Référence
SDR(A)-01	Q8ZVF1	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	I	AspTA	Koma et al. 2008 <sup>130</sup>
SDR(A)-02	Q9SIE1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	I	Glu/asp-PrephenateTA	Graindorge et al. 2010 <sup>135</sup>
SDR(A)-03	P53090	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	I	Aro/aminoadipate TA	Karsten et al. 2011 <sup>271</sup>
SDR(A)-04	Q72LL6	<i>Thermus thermophilus</i>	I	2-aminoadipateTA	Ouchi et al. 2009 <sup>272</sup>
SDR(A)-05	Q97BQ1	<i>Thermoplasma volcanium</i>	I	AspTA	Koma et al. 2008 <sup>130</sup>

SDR(A)-06	Q58365	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	II	HisPTA	Koma et al. 2008 <sup>130</sup>
SDR(A)-07	Q5SL65	<i>Thermus thermophilus</i>	II	HisPTA	Koma et al. 2008 <sup>130</sup>
SDR(A)-08	Q712I5	<i>Streptomyces tendae</i>	II	HisPTA	Binter et al. 2011 <sup>273</sup>
SDR(A)-09	A3EYF7	<i>Mesorhizobium sp.</i>	III	$\beta$ -AT	Kim et al. 2007 <sup>274</sup>
SDR(A)-10	Q12DH7	<i>Polaromonas sp.</i>	III	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	Kim et al. 2007 <sup>274</sup>
SDR(A)-11	Q4JFX0	<i>Geobacillus toebii</i>	IV	D-AlaTA	Lee et al. 2006 <sup>275</sup>
SDR(A)-12	P19938	<i>Bacillus sp</i>	IV	D-AlaTA	Tanizawa et al. 1989 <sup>137</sup>
SDR(A)-13	Q58414	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	IV	BCAT	Koma et al. 2008 <sup>130</sup>
SDR(A)-14	O27481	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	IV	BCAT	Koma et al. 2008 <sup>130</sup>
SDR(A)-15	P23721	<i>Escherichia coli</i>	V	PSerTA	Hester et al. 1999 <sup>276</sup>
SDR(A)-16	Q8R715	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	V	Ala:GlyoxTA	Koma et al. 2008 <sup>130</sup>
SDR(A)-17	O59033	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	V	SerTA	Koma et al. 2008 <sup>130</sup>
SDR(A)-18	F9VNX9	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	V	PSerTA	Koma et al. 2008 <sup>130</sup>

---

Le Tableau 16 résume les spectres de substrat décrits dans la littérature pour les différentes TA appartenant au SDR(A).

Tableau 16 : Spectre de substrat des transaminases du SDR(A).

<b>Entrée</b>	<b>Aminoacides ou cétoacides acceptés</b>
SDR(A)-01	<b>Asp</b> , His, Asn, Gln, Thr, Cys, Met, Ala, Trp, Phe, Val, Leu, Ile
SDR(A)-02	<b>Asp</b> , Glu, Préphénate
SDR(A)-03	Phe, Tyr, Glu, $\alpha$ -Amino adipate, $\alpha$ -Céto adipate, KG
SDR(A)-04	$\alpha$ -Amino adipate, Leu, Glu, KG, $\alpha$ -Céto isocaproate
SDR(A)-05	<b>Asp</b> , Cys, Met, Ala, Trp, Phe, Val, Leu, Ile
SDR(A)-06	<b>Asp</b> , Arg, His, Gln, Thr, Met, Trp, Phe
SDR(A)-07	<b>Asp</b> , His, Asn, Gln, Met, Ala, Trp, Phe, Leu
SDR(A)-08	Glu, Phe, Trp, Ala, His, Met, Leu, <b>Asp</b> , Gln, Arg, Lys, Val, Cys, Ser
SDR(A)-09	Pyr, <b>OA</b> , KG, Pyruvate de Methylene et d'éthyle, Propanal, <b>Asp</b> , Lys, Glu, Leu, Tyr, D/L-Phe, Val, 1-Phenylpropan-2-amine, 1-Phényléthylamine, 3-Aminobutyrate, 3-Amino-5-méthylhexanoate, 3-Amino-3-phénylpropionate
SDR(A)-10	Pyr, KG, PhCHO, 2-Oxobutyrate, Fluoropyruvate, <b><math>\beta</math>-Alanine</b> , <b><math>\beta</math>-Homoalanine</b> , $\beta$ -Homoleucine
SDR(A)-11	D-Ala, D- $\alpha$ -Aminobutyrate, <b>D-Asp</b> , D-Ser, D-Asn, D-Norvaline, D-Trp, D-Val, D-His, D-Thr, D-Met, KG, $\alpha$ -Kétobutyrate, $\alpha$ -Kétoisovalérate, Phénylpyruvate
SDR(A)-12	D-Ala, D- $\alpha$ -Aminobutyrate, D-Glu, <b>D-Asp</b> , D-Cysteinesulfinate, D-Gln, D-Asn, Glutamyl- $\gamma$ -ethylamide, D-Met, D-Ethionine, D-Norvaline, D-Norleucine, D-Val, D-Leu, D-Ile, D-Trp, D-Phe, D-Tyr, D-Arg, D-Lys, D-Ornithine, D-His, D-Thr, D-Cys, D-Diaminopimélate, Mésodiaminopimélate, $\alpha$ -Cétobutyrate, $\alpha$ -Cétovalérate, Glyoxylate, <b>OA</b> , Phénylpyruvate, $\alpha$ -Cétoisocaproate, $\alpha$ -Cétoisovalérate
SDR(A)-13	<b>Asp</b> , Lys, His, Gln, Thr, Cys, Met, Ala, Trp, Phe, Val, Leu, Ile
SDR(A)-14	<b>Asp</b> , Lys, Gln, Thr, Met, Trp, Val, Leu, Ile
SDR(A)-15	Glu, 3-Phosphohydroxypyruvate, Phosphosérine, <b>Asp</b> (probablement)
SDR(A)-16	<b>Asp</b> , His, Asn, Gln, Cys, Met, Ala, Trp, Phe
SDR(A)-17	<b>Asp</b> , His, Thr, Phe
SDR(A)-18	<b>Asp</b> , Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Cys, Met, Ala, Trp, Phe

*Les aminoacides dont la stéréochimie n'est pas précisée sont de configuration L. Les substrats de type  $\beta$ AS,  $\beta$ -amino- ou  $\beta$ -cétoacides sont en gras.*

Les séquences des 18 TA du SDR(A) ont été alignées les unes avec les autres afin de quantifier leur pourcentages d'identité, en utilisant l'outil MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log Expectation, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Le Tableau 17 présente la matrice obtenue qui permet de visualiser le pourcentage d'identité de tous les couples de TA du SDR(A).

Tableau 17 : Matrice du pourcentage d'identité des TA du SDR(A), obtenue avec l'outil MUSCLE.

Classe		I					II			III		IV				V			
Classe	Entrée	SDR(A)-01	SDR(A)-02	SDR(A)-03	SDR(A)-04	SDR(A)-05	SDR(A)-06	SDR(A)-07	SDR(A)-08	SDR(A)-09	SDR(A)-10	SDR(A)-11	SDR(A)-12	SDR(A)-13	SDR(A)-14	SDR(A)-15	SDR(A)-16	SDR(A)-17	SDR(A)-18
I	SDR(A)-01	100																	
	SDR(A)-02	19	100																
	SDR(A)-03	27	18	100															
	SDR(A)-04	37	17	25	100														
	SDR(A)-05	47	20	26	36	100													
II	SDR(A)-06	19	19	17	17	21	100												
	SDR(A)-07	17	20	15	20	16	25	100											
	SDR(A)-08	15	14	15	21	14	19	25	100										
III	SDR(A)-09	12	12	8	14	10	10	16	14	100									
	SDR(A)-10	12	12	11	16	11	10	18	14	52	100								
IV	SDR(A)-11	10	11	13	15	12	10	14	9	9	10	100							
	SDR(A)-12	11	9	13	12	11	12	12	12	8	7	41	100						
	SDR(A)-13	16	11	16	11	12	10	11	14	11	10	29	38	100					
	SDR(A)-14	11	10	9	10	10	11	11	12	10	11	23	29	43	100				
V	SDR(A)-15	12	11	11	11	10	11	11	11	12	11	11	8	10	10	100			
	SDR(A)-16	13	12	13	14	15	14	12	13	15	16	11	11	11	10	13	100		
	SDR(A)-17	12	11	13	13	11	15	16	14	15	13	9	10	11	13	16	33	100	
	SDR(A)-18	12	13	10	12	13	12	14	12	17	16	10	9	12	12	11	29	22	100

Les valeurs d'identité obtenues après alignement nous prouvent la très faible similarité entre les séquences, avec un pourcentage moyen de 15 % et une valeur maximum de 52 %.

### 3.1.2 Sélection des enzymes de la banque TAM(A)

Les séquences composant le SDR(A) ont été alignées par le Génoscope avec toutes les séquences contenues dans la base UniProt, ainsi qu'avec celles d'un métagénome appelé « Cloaca Maxima », propre au Génoscope. Ce dernier est censé contenir un grand



nombre de séquences protéiques encore non répertoriées dans UniProt et a donc été utilisé afin d'élargir encore un peu plus la diversité des enzymes.

Une première sélection des candidats a été effectuée en ne retenant que les séquences ayant un pourcentage d'identité minimum de 30 % avec celles du set de référence sur 80 % de la longueur de la plus petite séquence, ce qui correspond à la valeur classiquement utilisée. On peut noter que ce pourcentage est supérieur au taux d'identité du SDR(A), ce qui limite le recoupement entre les groupes de séquences sélectionnées à partir de chaque TA du SDR(A) et assure ainsi une grande diversité. À l'issue de cette première sélection, plus de 10000 candidats ont été identifiés. L'objectif étant de construire une banque TAM(A) composée de quelques centaines de TA, un nouvel alignement des séquences a été réalisé en utilisant cette fois un taux d'identité supérieur à 30 % et variable en fonction de la classe de chaque TA du SDR(A). Cette opération a permis d'une part de réduire le nombre de séquences, et d'autre part d'équilibrer la proportion de chaque classe au sein de TAM(A). Le nombre de candidats final, ainsi que les taux d'identité utilisés, sont répertoriés dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Nombre de candidats obtenus pour chaque séquence du SDR(A).

Taux d'identité minimum utilisé pour l'alignement	Séquence du SDR(A)	Classe	Nombre de candidats obtenu
37%	SDR(A)-06	II	100
	SDR(A)-07	II	50
	SDR(A)-08	II	4
	SDR(A)-09	III	43
	SDR(A)-10	III	322
	SDR(A)-16	V	324
	SDR(A)-17	V	63
	SDR(A)-18	V	19
		Total :	925
45%	SDR(A)-01	I	40
	SDR(A)-02	I	257
	SDR(A)-03	I	1
	SDR(A)-04	I	266

	SDR(A)-05	I	59
	SDR(A)-11	IV	83
	SDR(A)-12	IV	465
	SDR(A)-13	IV	527
Total :			1698
50%	SDR(A)-14	IV	1481
	SDR(A)-15	V	1800
Total :			3280

On peut remarquer que le nombre de candidats obtenu à partir de chaque séquence du SDR(A) est très variable. Les TA homologues à certaines TA du SDR(A) sont très largement représentées (> 1000 candidats obtenus à partir de SDR(A)-14 et 15) alors que d'autres TA du SDR(A) ont permis d'obtenir moins d'une dizaine de protéines (SDR(A)-03 et 08). Afin de corriger ce biais et de réduire encore le nombre de séquences tout en conservant la diversité, les 3280 séquences retenues à ce stade ont été groupées en adoptant une approche de « clustering ». Les séquences présentant plus de 80 % d'identité ont ainsi été rassemblées dans un même groupe (« cluster »). À l'issue de cette opération, des clusters de taille variable ont été obtenus, dont certains composés d'une seule séquence (« singletons »). L'étape suivante a donc consisté en la sélection d'une enzyme dans chaque cluster, censée représenter dans la banque les caractéristiques supposées communes des différentes TA du cluster. Il faut cependant garder à l'esprit que cette technique, bien que très efficace pour réduire le nombre d'enzymes à étudier, peut conduire à la sélection de séquences qui ne puissent être efficacement clonées et/ou surexprimées. L'information des clusters correspondants sera, dans ce cas, absente de la banque. On peut tout de même espérer que la globalité des caractéristiques principales des clusters sera conservée, notamment grâce au fait qu'une propriété puisse être partagée par plusieurs clusters.

D'autre part, pour réaliser cette dernière sélection, un filtre supplémentaire a été utilisé, en choisissant le représentant du cluster en fonction de la disponibilité du microorganisme d'origine au sein de la « souchothèque » du Génoscope qui compte actuellement environ un millier de membres. Bien que ce filtre ait peu d'influence sur les gros clusters contenant plusieurs représentants potentiels dont la souche est disponible,

il pose un problème dans le cas des petits clusters et des singletons parmi lesquels plusieurs n'ont pu être représentés dans la banque. Le Tableau 19 dresse un bilan des enzymes retenus avant et après l'étape de clustering.

Tableau 19 : Nombre de représentants sélectionnés pour TAM(A) avant et après clustering.

<b>Séquence du SDR(A)</b>	<b>Classe</b>	<b>Nombre de candidats obtenu avant le clustering</b>	<b>Nombre de représentants après le clustering</b>	<b>Total par Classe</b>
SDR(A)-01		40	9	
SDR(A)-02		257	34	
SDR(A)-03	I	1	0	87
SDR(A)-04		266	29	
SDR(A)-05		59	15	
SDR(A)-06		100	32	
SDR(A)-07	II	50	18	50
SDR(A)-08		4	0	
SDR(A)-09		43	13	
SDR(A)-10	III	322	19	32
SDR(A)-11		83	6	
SDR(A)-12		465	16	
SDR(A)-13	IV	527	76	158
SDR(A)-14		1481	60	
SDR(A)-15		1800	54	
SDR(A)-16		324	82	
SDR(A)-17	V	63	8	148
SDR(A)-18		19	4	

À l'issue de la sélection 475 représentants ont finalement été retenus pour construire la banque TAM(A) avec une répartition relativement équilibrée des différentes classes de TA. On peut cependant remarquer que la Classe III est un peu sous-représentée dans la TAM(A) avec seulement une trentaine d'enzymes. Le Tableau

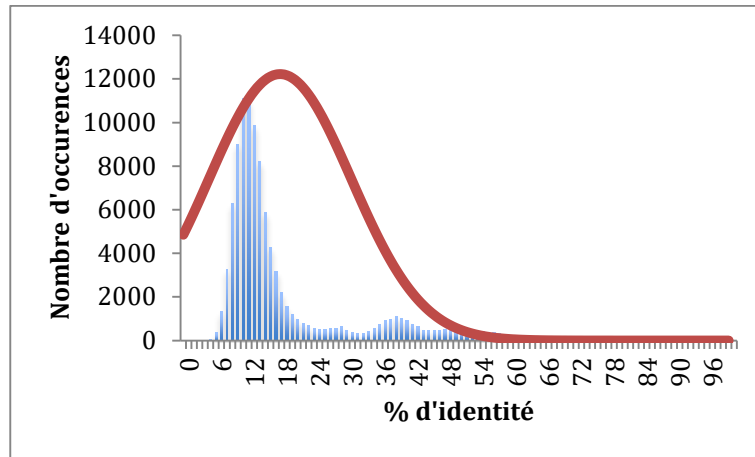
20 résume la composition de TAM(A) avec les principales annotations issues de la base Uniprot et leur représentation au sein de la banque.

Tableau 20 : Annotations dans Uniprot et répartition des enzymes de TAM(A).

Classe	Nombre de séquences par Classe	Annotations UniProt	Nombre de séquences par annotation	% de représentation au sein de chaque classe	% de représentation au sein de la banque
I & II	126	AspTA	32	25%	7%
		HisPTA	46	37%	10%
		Autres	48	38%	10%
III	32	GSA-TA <sup>a</sup>	21	66%	5%
		Autres	11	34%	2%
IV	155	BCAT	133	86%	29%
		D- $\alpha$ -TA	22	14%	5%
V	139	PSerTA	86	62%	19%
		Autres	53	38%	11%
Cloaca	11	---	---	---	2%

<sup>a</sup> GSA-TA = *Glutamate-1-semialdéhyde transaminase*

Le Graphique 18 présente par ailleurs les pourcentages d'identité des différents couples au sein de la banque TAM(A). Un pourcentage moyen de 17 % a été calculé. On visualise cependant un ensemble d'occurrences principal avec une moyenne plutôt centrée à 12 % d'identité.



Graphique 18 : Nombre d'occurrences des pourcentages d'identité calculés au sein de TAM(A).<sup>2</sup>

Pour conclure la création *in silico* de TAM(A), nous avons créé son « arbre d'identité ». Il ne s'agit cependant en aucun cas d'un arbre phylogénétique puisque sa création ne se base pas sur des relations de parenté entre séquences, mais uniquement sur leur taux d'identité. Il a été réalisé à l'aide de l'outil ClustalO (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) proposé par le centre européen de biologie moléculaire (EMBL). Cet arbre, présenté en Figure 27, a été annoté à l'aide du tableau précédent de manière à cerner un peu plus l'activité des TA de chacune de ses branches, et nous servira de base pour l'analyse des résultats des criblages.

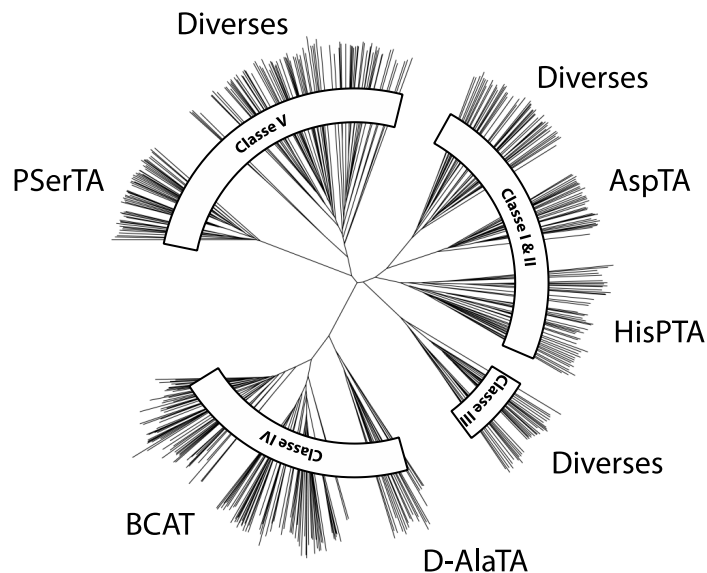


Figure 27 : Arbre d'identité de TAM(A).

<sup>2</sup> La matrice du pourcentage d'identité pour la banque TAM(A) complète n'a pas été réalisée avec MUSCLE à cause d'une limitation du nombre de séquences. L'outil ClustalO (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) a cette fois été employé. Bien qu'il soit un peu moins précis, il offre des résultats similaires et accepte un nombre de séquences beaucoup plus important. Il en sera donc de même pour les matrices des autres banques.

### 3.1.3 Clonage et surexpression des enzymes de la banque TAM(A)

Parmi les 475 représentants des différents clusters, 12 ont dû être abandonnés en raison de leur composition en bases, qui s'est trouvée être inadaptée au clonage dans des conditions standard. Le clonage de 463 gènes a donc été mis en œuvre au sein de la plateforme de clonage haut débit du Génoscope. Les différents gènes ont été introduits dans le plasmide pET-22b(+) et clonés dans une souche d'*E. coli* BL21(DE3). À ce stade, 403 gènes ont été clonés avec succès. La culture des différentes souches recombinantes a été menée dans 5 plaques 96-puits et la surexpression des TA induite par addition d'isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Après lyse des cellules, une analyse électrophorétique a permis d'évaluer visuellement le niveau de surexpression de chaque TA au sein de la banque. Au total, 232 enzymes sont ainsi apparues comme bien surexprimées à l'issue de cette première culture (Figure 28).

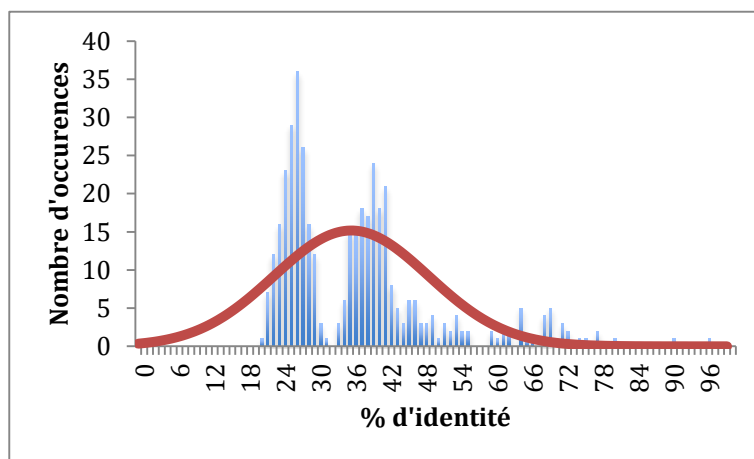


Figure 28 : Gel de vérification de la surexpression des TA de TAM(A).

Néanmoins l'ensemble des puits contenant des lysats ont été soumis aux différents criblages. Cette première banque d'enzymes (TAM(A)) a été utilisée pour l'ensemble des criblages décrits dans ce manuscrit. Par ailleurs, au cours de ce travail de thèse, la même collection de souches recombinantes a été cultivée une deuxième fois. L'analyse électrophorétique de la surexpression a montré des résultats sensiblement différents, avec un total de 237 enzymes bien surexprimées. Nous avons par ailleurs observé que des TA bien surexprimées au cours de la première culture, ne l'étaient pas toujours au cours de la deuxième. Cette collection de TA issue de la deuxième culture a été dénommée TAM(B) afin de bien la différencier de TAM(A), et n'a pas été criblée lors de cette thèse. Elle pourra tout de même être criblée au besoin par la suite.



On peut constater que les séquences du SDR(C) ont un taux d'identité bien supérieurs à celles du SDR(A). La moyenne est en effet de 36 %, soit plus du double de la valeur précédente, avec un maximum cette fois égal à 96 %. Ceci montre que certaines de nos séquences sont presque identiques (SDR(C)-04 et 05, ou SDR(C)-25 et 26 par exemple). Cela n'est cependant pas très surprenant dans la mesure où toutes les TA de ce set appartiennent à la même classe et qu'à ce jour, très peu de D- $\alpha$ -TA et de (*R*)-amine-TA ont été caractérisées expérimentalement. De plus, de façon prévisible, on observe un taux d'identité bien plus important au sein des 2 groupes constitués par les (*R*)-amine-TA d'une part et les D- $\alpha$ -TA d'autre part qu'entre des TA appartenant à ces 2 groupes. L'allure du Graphique 19 monte d'ailleurs clairement 2 groupes d'occurrences de pourcentages d'identités correspondant d'une part aux couples d'enzymes homologues au sein d'un même groupe avec une moyenne aux alentours de 40 % et d'autre part aux couples formés par des enzymes appartenant à chacun des groupes avec une moyenne d'environ 25 %. Bien que ces observations concernent un nombre limité d'enzymes, elles semblent confirmer notre postulat de base d'une corrélation entre séquence et activité.



Graphique 19 : Nombre d'occurrences des pourcentages d'identité calculés au sein du SDR(C).

### 3.2.2 Sélection des enzymes de la banque TAM(C)

L'alignement du SDR(C) avec les séquences de la base de données Uniprot en appliquant un seuil d'identité minimum de 30 % a généré un ensemble de 13283 séquences. Dans ce cas, des nombres équivalents de candidats ont été sélectionnés à partir des différentes TA du SDR(C). Les séquences ont ensuite été classées sous la

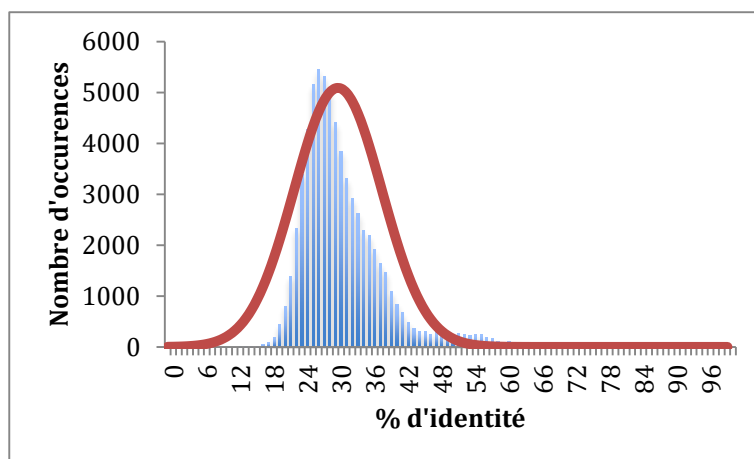


forme de 442 clusters et 847 singletons. Les représentants ont ensuite été sélectionnés comme précédemment sur la base de la disponibilité des souches. Les TA de Classe IV présentes dans TAM(A) ont par ailleurs été intégrées dans la banque TAM(C) afin de disposer d'une banque homogène de TA de Classe IV pour de nouveaux criblages (Tableau 22).

Tableau 22 : Nombre de séquences sélectionnées à partir des différentes TA du SDR(C).

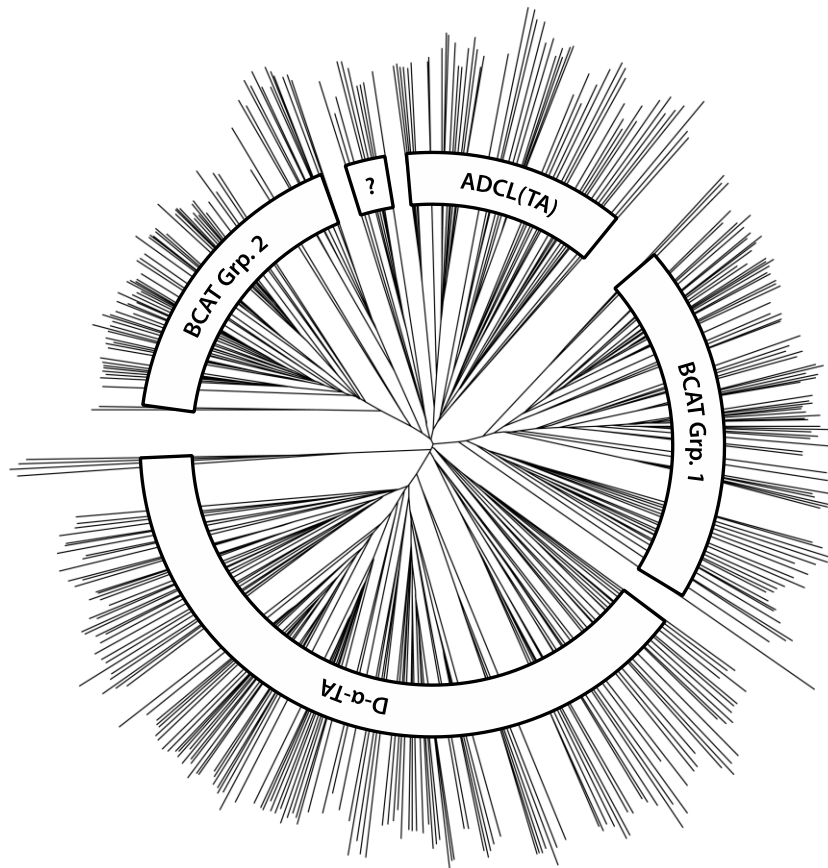
Type de TA du SDR(C)	Nombre de représentants à cloner	Représentation au sein de TAM(C) (%)
(R)-amine-TA	76	18 %
D- $\alpha$ -TA	161	37 %
D- $\alpha$ -TA (Reviewed)	96	22 %
Séquences de TAM(A)	101	23 %
Total :	434	100 %

Au total, 333 séquences ont été sélectionnées à partir du SDR(C) et 101 récupérées dans la banque TAM(A). L'alignement des séquences de TAM(C) a permis de calculer un taux d'identité moyen de 30 % ce qui reste très raisonnable au vu de l'identité présente dans le SDR(C) (Graphique 20). On observe d'ailleurs un ensemble d'occurrences plus homogène que dans le SDR(C), correspondant à une plus grande diversité de séquences.



Graphique 20 : Nombre d'occurrences des pourcentages d'identité calculés au sein de TAM(C).

De la même façon que pour TAM(A), un arbre d'identité a été déterminé pour TAM(C) (Figure 29).



*ADCL(TA) = Aminodéoxychorismate Lyase (Transaminase).*

Figure 29 : Arbre d'identité de TAM(C).

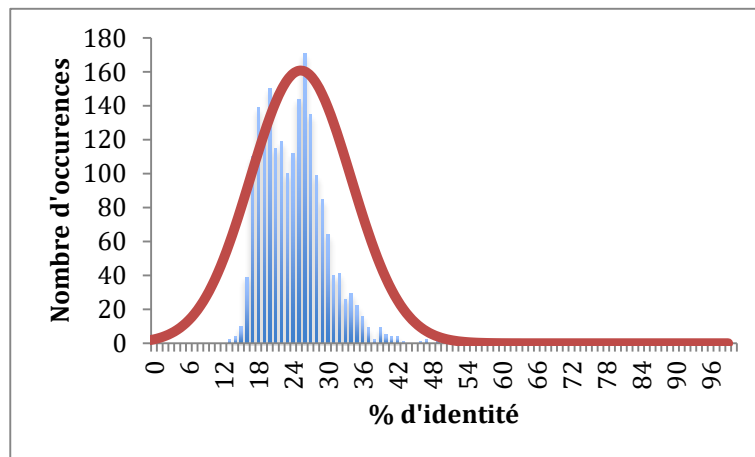
Sans surprise, on retrouve des enzymes annotées D- $\alpha$ -TA et des BCAT, ces dernières étant réparties dans deux groupes distincts qui pourraient donc correspondre à des spectres de substrats différents. On trouve par ailleurs un ensemble d'enzymes annotées « aminodéoxychorismate lyases (transaminase) » (ADCL(TA)) qui sont des enzymes à PLP catalysant une réaction de  $\beta$ -élimination et qui possèdent aussi une activité transaminase. On note enfin la présence d'un petit groupe d'enzymes (noté « ? ») pour lesquelles l'annotation, trop imprécise, ne nous a pas permis de dégager une activité prédominante. Au vu de leur position dans l'arbre, il est possible qu'elles aient aussi des activités particulières et qu'elles constituent un vivier d'enzymes intéressant.

Finalement, 372 gènes ont pu être efficacement clonés, et réparties dans 4 plaques. À l'issue de la culture, l'analyse électrophorétique a montré que 180 enzymes étaient bien surexprimées.

### 3.3 Construction de la banque TAM(D)

#### 3.3.1 Élaboration du set de référence de TAM(D)

La banque TAM(D) a été construite à partir du SDR(D) regroupant exclusivement des TA de Classe III. Nous avons pour cela recensé dans la littérature (en mars 2014) un large panel de 53 TA bien caractérisées appartenant à cette classe. Cet ensemble a été complété par 16 séquences annotées manuellement (« reviewed ») dans Uniprot. Un taux d'identité moyen d'environ 26 %, a été calculé pour le SDR(D), ce qui est donc nettement inférieur à celui calculé pour le SDR(C) et nous laisse espérer une grande diversité d'activités (Graphique 21).

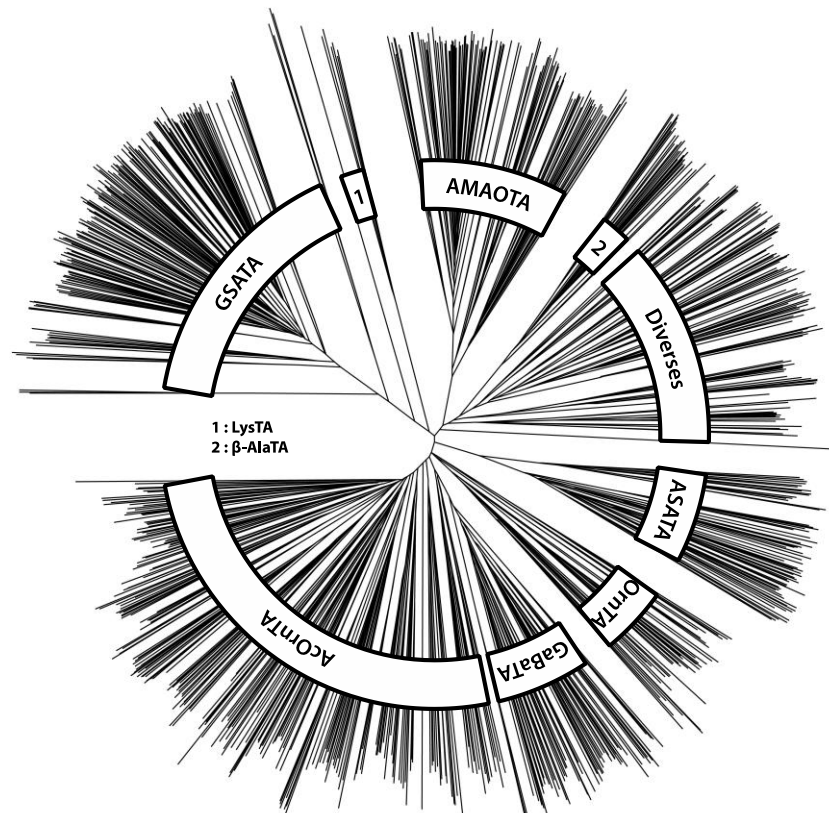


Graphique 21 : Nombre d'occurrences des pourcentages d'identité calculés au sein de TAM(D).

#### 3.3.2 Sélection des candidats dans UniProt et clustering

L'étape de sélection pour la construction de TAM(D) s'est avérée plus complexe que celle des autres banques. Après alignement du SDR(D) avec les séquences de la base Uniprot en appliquant un seuil d'identité à 30 %, un nombre bien trop important de candidats a été obtenu (> 120000). Les trois meilleures séquences ont par exemple, à elles seules, permis de sélectionner 50000 gènes. Afin de réduire le nombre de candidats, ces 3 séquences ont donc été exclues du SDR(D) et nous avons augmenté le seuil d'identité à 40 %, ce qui nous a permis, de réduire le nombre de candidats à 70000. Afin de diminuer encore ce nombre avant l'étape de clustering, nous avons éliminé toutes les séquences ayant un taux d'identité supérieur à 80 % avec celles du SDR(D) et n'avons gardé qu'un seul candidat pour toutes les séquences identiques provenant d'organismes différents. L'ensemble de ces filtres nous a finalement permis de réduire le

nombre de séquences à 15985. Après clustering, 1535 représentants ont été obtenus. Ce nombre étant encore trop important pour l'étape de clonage, seuls les gènes ayant une composition en guanine et cytosine comprise entre 40 et 65 %, assurant de bonnes chances pour le clonage, ont été retenus, soit 889 au total. La diversité des séquences a été confirmée par alignement, avec un taux d'identité moyen de 30 %, et par la création de l'arbre d'identité de la TAM(D) (Figure 30).



*GSATA = Glutamate-1-semialdéhyde-TA, LysTA = L-Lysine-6-TA, AMAOTA = Adénosyl-méthionine-8-amino-7-oxononanoate-TA, β-AlaTA = β-Alanine-TA, ASATA = Aspartate-semialdéhyde-TA, OrnTA = Ornithine-TA, GaBaTA = 4-Aminobutyrate-TA, AcOrnTA = Acétylornithine-TA).*

Figure 30 : Arbre d'identité de TAM(D).

La diversité des annotations dans Uniprot est en cohérence avec la diversité des séquences de la banque TAM(D), qui est donc représentative de la diversité des TA de Classe III. Finalement, 837 gènes ont pu être clonés avec succès et l'analyse électrophorétique après culture dans 9 plaques a montré que 375 enzymes étaient correctement surexprimées.

À l'issue de ce travail de construction des banques, réalisé pour l'essentiel dans les laboratoires du Génoscope, nous avons pu disposer de plusieurs collections de TA

variées résultant du clonage d'environ 1500 gènes et comptant plus de 800 TA bien surexprimées. Pratiquement, ces banques, provenant de 5 cultures bactériennes de 1,6 mL regroupées, sont constituées d'un ensemble de lysats cellulaires (300 µL) comprenant entre 1 et 5 mg/mL de protéine. Conservées à -80 °C, elles constituent désormais des mines dans lesquelles nous pouvons à présent creuser avec nos outils de criblages, à la recherche de nouvelles TA valorisables.

## **4 Traitements statistiques et informatiques des résultats**

La dernière étape avant la réalisation des criblages a consisté à mettre au point une approche statistique de traitement des données afin de pouvoir distinguer un signal positif (hit) du bruit de fond. Nous nous sommes appuyés pour cela sur l'utilisation de témoins positifs et négatifs, mimant les conditions du criblage afin de déterminer deux seuils permettant une détection fiable des hits.

Nous avons tout d'abord calculé un seuil de sélection (SDS) pour chaque couple de substrats afin de distinguer les hits des faux positifs. Ces derniers peuvent résulter de réactions induites par des composants du lysat autres que la TA surexprimée. Il peut notamment s'agir d'activités transaminase naturellement exprimées par les cellules hôtes d'*E. coli*. Ce seuil est donc susceptible de varier fortement en fonction des substrats testés. Pour accéder au SDS, nous avons donc utilisé des lysats témoins, issus de souches d'*E. coli* contenant un plasmide vide, c'est à dire sans gène à surexprimer (témoin négatif), ou bien surexprimant une TA connue (témoin positif).

D'autre part, nous avons aussi appliqué un « seuil de validation » (SDV) pour s'assurer que le signal détecté correspond bien à la réaction de transamination mettant en jeu les deux substrats. Pour cela nous avons mesuré l'activité en présence de lysat mais en absence de substrat accepteur. Ce seuil doit être inférieur au SDS en l'absence de réaction parasite.

### **4.1 Détermination du seuil de sélection (SDS)**

Nous avons tout d'abord évalué la variabilité globale des mesures faites avec un témoin positif. Nous avons pour cela utilisé une souche surexprimant l'AspTA d'*E. coli* et mesuré la vitesse de la réaction de transamination entre le L-ACS et le KG en utilisant le test direct (Schéma 118).

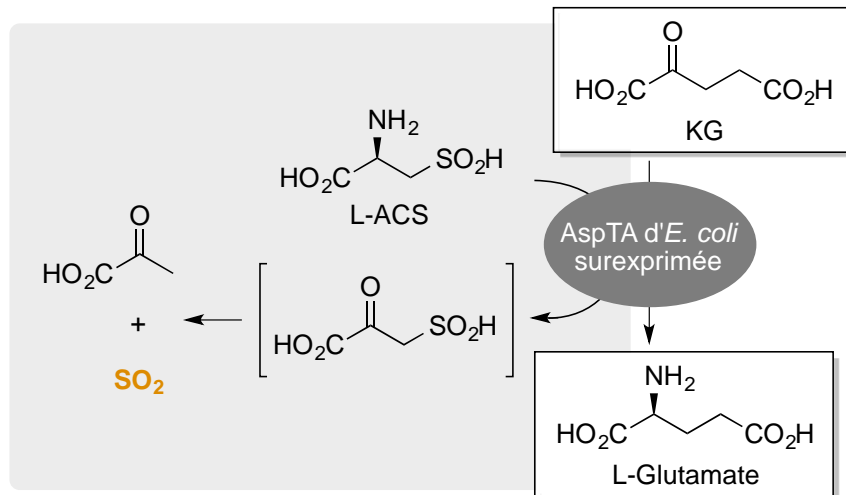


Schéma 118 : Réaction modèle pour le témoin positif.

Une série de 32 cultures indépendantes de cette souche témoin a permis de disposer de 32 lysats qui ont donné lieu à une série de mesures d'activité. La variabilité relative a alors été calculée en faisant le rapport de l'écart-type ( $\sigma_{T+}$ ) sur la moyenne ( $\mu_{T+}$ ) de cette série de mesures (Figure 31).

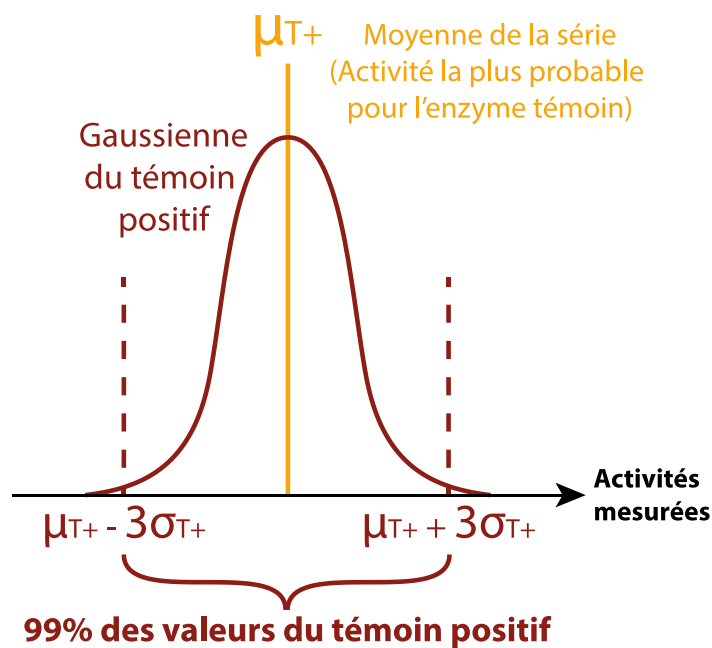


Figure 31 : Représentation selon une loi normale d'une série de mesures d'activité témoins.

Nous avons ainsi pu calculer une variabilité relative de 25 % qui est représentative des variations de surexpression et de densité cellulaire à l'issue des cultures. Nous avons

considéré que ce degré de variabilité pouvait être constant pour toutes les TA surexprimées et pour tous les couples de substrats testés.

Nous avons ensuite utilisé un témoin négatif pour déterminer le SDS. Ce seuil a en effet été défini comme la valeur au-dessus de laquelle il est certain (à plus de 99 %) qu'une activité ne fait pas partie de la population statistique correspondant au témoin négatif (T-) qui est représentée par une gaussienne. Le SDS se situe donc à la limite haute de cette gaussienne :  $\text{SDS} = \mu_{T-} + 3\sigma_{T-}$  (Figure 32).

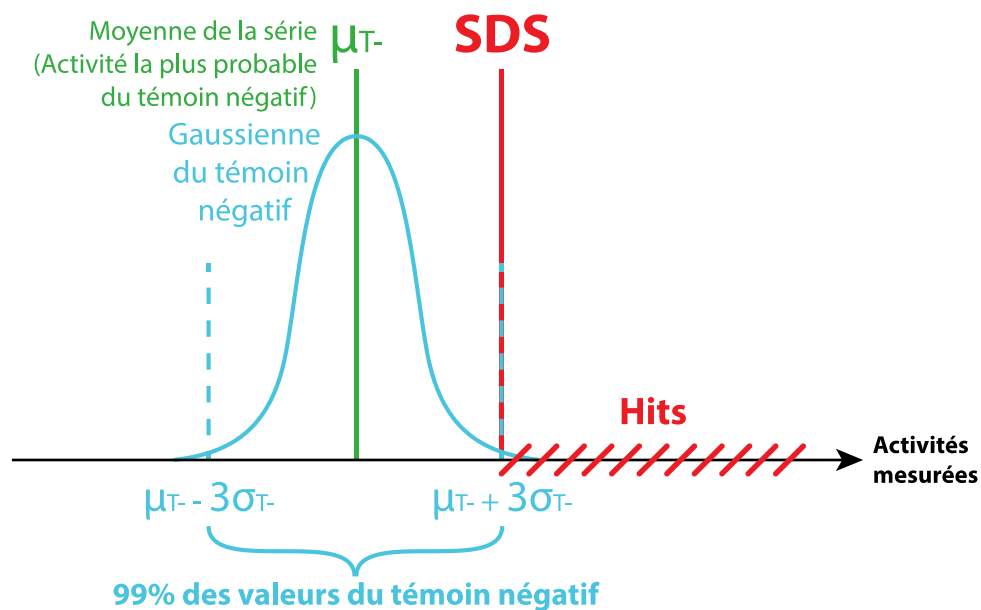


Figure 32 : Point de vue statistique du seuil de sélection (SDS).

Les paramètres  $\mu_{T-}$  et  $\sigma_{T-}$  ont été calculés, pour chaque couple de substrats, à partir d'une série de 32 mesures d'activité avec des lysats provenant de 32 cultures indépendantes d'*E. coli* contenant le plasmide sans insertion de gène. Ce témoin sans enzyme surexprimée contient cependant les différentes TA exprimées de façon constitutive par la souche d'*E. coli*. Pour certains couples de substrats, nous avons observé une variabilité relative inférieure à 25 %, soit inférieure à la variabilité mesurée pour le témoin positif. Afin de limiter le risque de faux positifs, nous avons alors décidé d'appliquer une variabilité de 25 % pour le calcul du SDS en surestimant la valeur de l'écart type ( $\sigma_{T-} = 0,25 * \mu_{T-}$ ). Dans ces conditions, une valeur de  $\text{SDS} = 1,75 \mu_{T-}$  a donc été prise en compte.

Les valeurs de SDS obtenues pour chacun des couples de substrats sont présentées dans la suite de ce manuscrit en relation avec les résultats des criblages.

## 4.2 Détermination d'un seuil de validation complémentaire (SDV)

Lors des criblages avec le L- et le D-ACS nous avons constaté pour certains lysats qu'une activité supérieure au SDS était mesurée en l'absence d'accepteur ajouté. Ces activités pourraient provenir de la présence d'accepteurs potentiels dans les lysats, mais aussi, comme nous le détaillerons par la suite, d'activité enzymatique conduisant à la production de SO<sub>2</sub> en l'absence de substrat accepteur. Afin d'écartier ces faux positifs, nous avons donc déterminé un second seuil de validation (SDV). Ce dernier a été calculé à partir d'une mesure d'activité faite pour chacun des lysats en absence d'accepteur (A<sub>0</sub>). N'ayant pas accès à des séries de mesures, permettant une approche statistique, nous avons dans ce cas considéré le cas de figure le plus défavorable ou A<sub>0</sub> (mesurée) serait la valeur la plus basse de la population statistique correspondant à l'activité sans cétoacide (Figure 33).

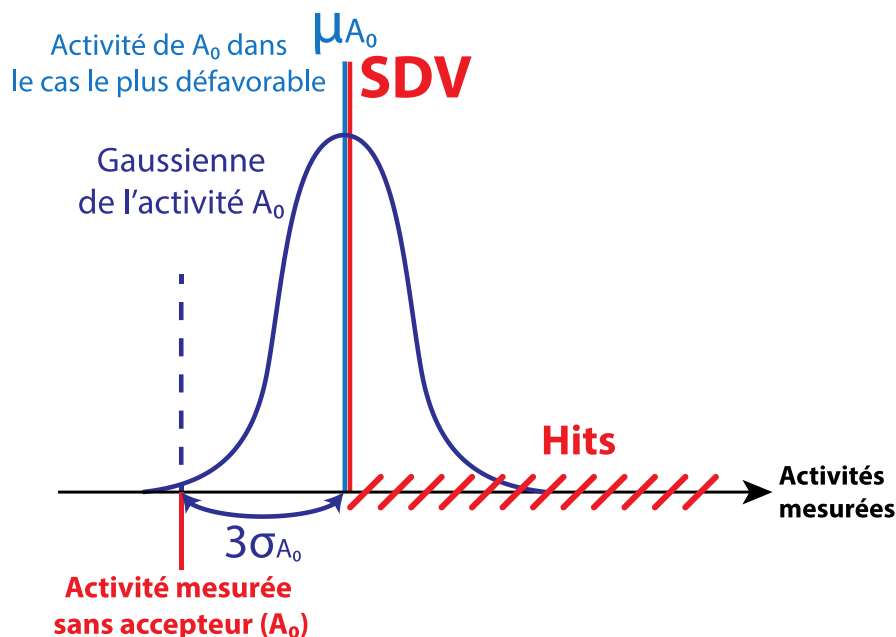


Figure 33 : Point de vue statistique pour le seuil de validation (SDV).

Dans ces conditions il y a plus de 99 % de chances que la valeur « réelle » (moyenne  $\mu_{A_0}$  qui serait obtenue à l'issue d'une série de mesures indépendantes de A<sub>0</sub>) soit inférieure à  $(A_{0(\text{mesuré})} + 3\sigma_{A_0})$ . Nous avons donc choisi dans ces conditions  $SDV = \mu(A_0)$  et considéré une variabilité relative de 25 % ( $\sigma_{A_0} = 0,25 \cdot \mu_{A_0}$ ). Dans ces conditions,  $SDV = A_0 + 3 \cdot 0,25 \cdot SDV$ , c'est-à-dire  $SDV = 4A_0$ .



A l'issue des criblages et pour chaque couple de substrats nous avons donc considéré le seuil le plus élevé (SDS ou SDV) pour la détection des hits.

## **5 Criblage des banques de Transaminases**

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons été en mesure d'effectuer plusieurs criblages en utilisant différents tests et une variété de couples de substrats. La banque TAM(A) a été notamment explorée à la recherche de nouvelles  $\alpha$ -TA en utilisant les tests directs et couplés utilisant le L- ou D-ACS. Des criblages de la Banque TAM(C) en utilisant le D-Glu comme donneur ont également été mis en œuvre à la recherche de D- $\alpha$ -TA. Enfin des premiers essais de criblages ont pu être menés pour explorer la TAM(D) en utilisant le test direct à l'HPT. Les résultats de ces différents criblages sont présentés ci-après.

### **5.1 Criblage de TAM(A) à la recherche de nouvelles $\alpha$ -TA**

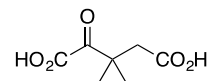
La banque TAM(A) a été criblée avec les tests directs utilisant les L- ou D-ACS, ainsi qu'avec le test couplé utilisant le L-Glu comme donneur primaire et le couple L-ACS /AspTA dans la réaction auxiliaire. De nombreux cétoacides ont été testés en tant qu'accepteurs. Pour simplifier la présentation des résultats, ils ont été classés dans des groupes qui apparaissent dans le tableau 28, en plus des catégories présentées précédemment.

Tableau 23 : cétoacides testés lors du criblage de TAM(A).

Catégorie	Groupe	abréviation	structure	
I et II : précurseurs d'aminoacides canoniques	1 Substrat commun des L-α-TA	KG		
		Glyox		
	2 Précurseurs d'aminoacides canoniques variés	Pyr		
		MTOB		
		MOPA		
		HPA		
		HOBA		
		AOP		
	V : précurseurs d'aminoacides non canoniques valorisables	3 Cétoacides alkylés	AOH	
			DMOB	
4 Cétoacides aromatiques			OPA	
		OPBA		
5 Cétoacides β- ou γ-hydroxylés		HMOP		
		HOPP		
		HOP		
		HOPB		
6 Précurseurs		KDG		

d'aminosucres ou  
d'analogues du  
Glu

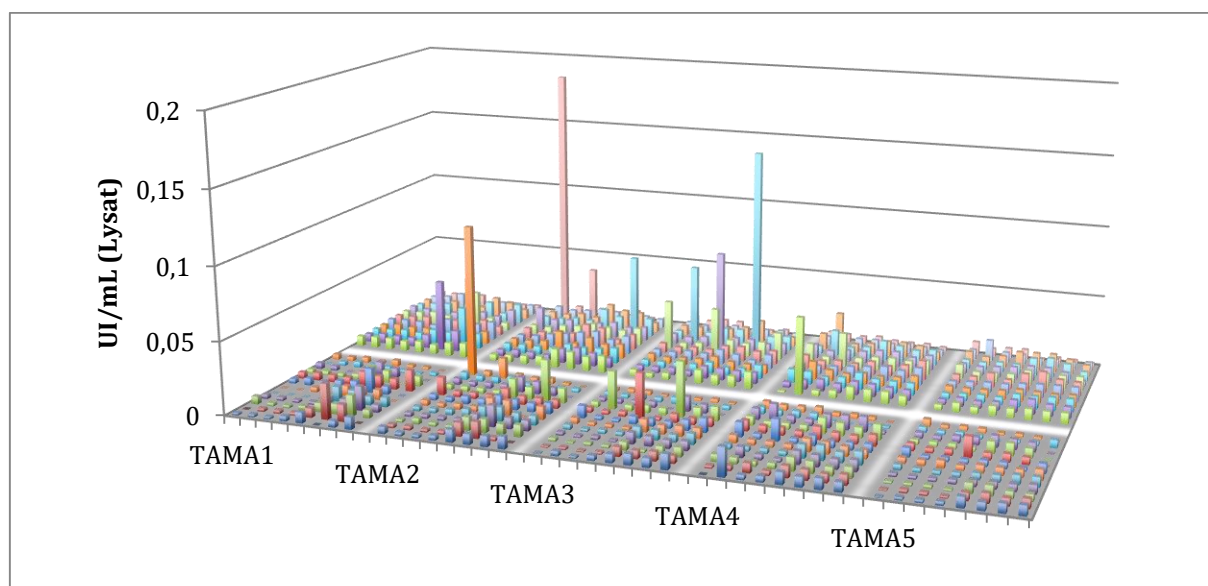
DMOP



Tous les criblages ont été réalisés en utilisant 2  $\mu$ L de lysat cellulaire par puits. Ce volume s'est en effet révélé adéquat pour détecter efficacement de faibles activités pour des substrats non canoniques. Les différents accepteurs ont été testés à une concentration standard de 2 mM. En effet les  $K_m$  généralement décrits pour les cétoacides substrats des  $\alpha$ -TA est généralement d'ordre submillimolaire. Les substrats donneurs ont, quant à eux, été testés à une concentration standard de 10 mM (D-ACS) ou 20 mM (L-ACS, L-Glu), les  $K_m$  généralement décrits pour les amino acides étant d'ordre millimolaire. Afin d'uniformiser les résultats des différents criblages avec les différentes banques, toutes les activités décrites ci-après sont exprimées en UI/mL de lysat, c'est-à-dire en  $\mu$ mol de substrat converti par min et par mL de lysat.

### 5.1.1 Mesure de l'activité sans cétoacide accepteur ( $A_0$ )

Les activités témoins sans accepteurs ( $A_0$ ) ont été mesurées pour les tests directs et indirects afin de pouvoir calculer le SDV pour chaque candidat de TAM(A). Les résultats obtenus sont regroupés dans le Graphique 22. Si les activités obtenues restent dans l'ensemble assez faibles quel que soit le test (moyenne inférieure à 0,01 UI/mL), la valeur de  $A_0$  mesurée avec certaines enzymes apparait non négligeable, atteignant dans certains cas des valeurs proches de 0,2 UI/mL. Le Graphique 22 recense les activités mesurées en absence d'accepteur ( $A_0$ ).



Graphique 22 : Activités A<sub>0</sub> mesurées lors du criblage des 5 plaques constituant TAM(A) avec le L-ACS dans le test direct (premier plan) et couplé (second plan).

Il est intéressant de noter que l'analyse des annotations dans Uniprot de ces enzymes produisant du SO<sub>2</sub> en absence d'accepteur a montré qu'il s'agit à priori, dans presque tous les cas, de D- $\alpha$ -TA.

Ceci laisse supposer que cette activité est une caractéristique de cette famille de TA. Cette hypothèse a pu être confirmée lors de la mesure de A<sub>0</sub> en présence de D-ACS. Nous avons en effet identifié les mêmes TA avec des activités plus importantes encore.

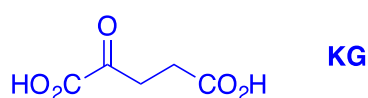
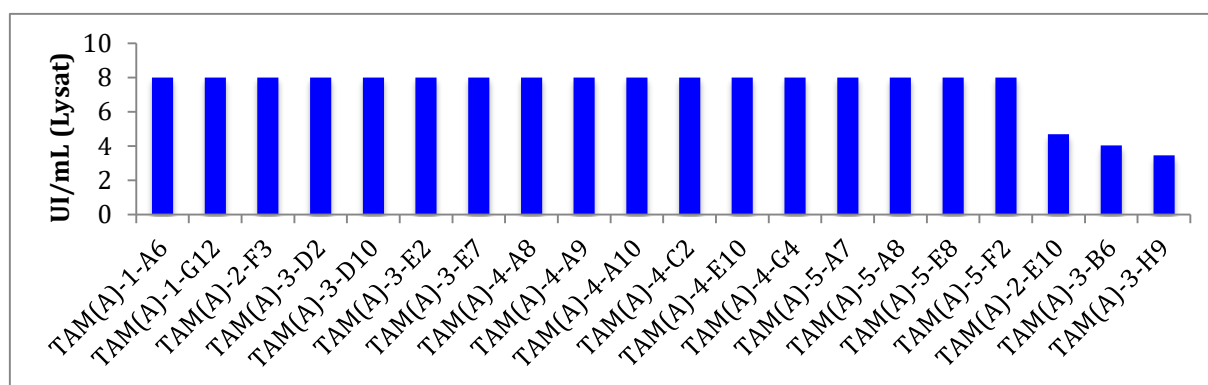
Afin de confirmer cette activité de « désulfination » de l'ACS, nous avons mené des expériences complémentaires dont les résultats font l'objet d'un chapitre à part dans la suite de ce manuscrit.

### 5.1.2 Criblage de TAM(A) avec le KG

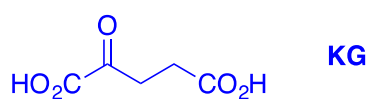
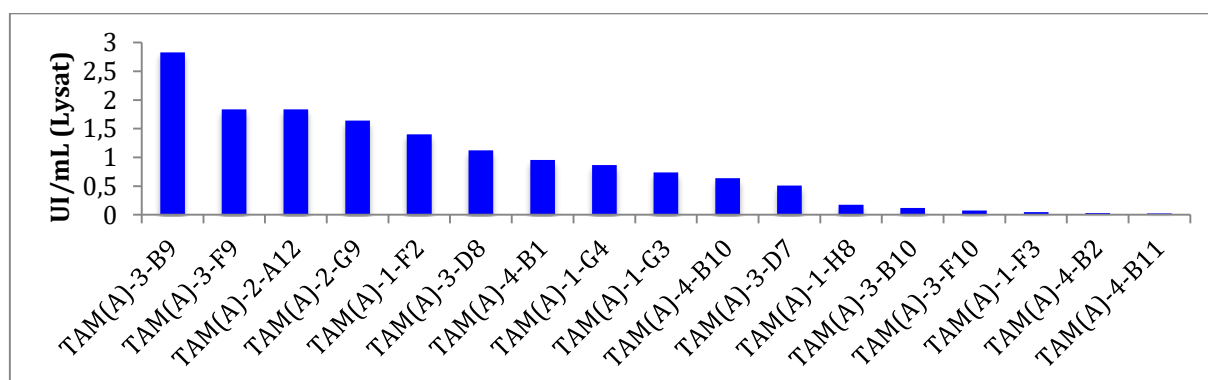
Afin d'optimiser nos chances d'identifier des nouvelles  $\beta$ ASTA utilisant l'ACS comme donneur, nous avons testé le KG comme accepteur avec le test direct utilisant le L- ou D-ACS. En effet, comme nous l'avons vu, le KG est un bon substrat pour la plupart des  $\alpha$ -TA décrites à ce jour. Ces nouvelles  $\beta$ ASTA pourraient offrir la possibilité d'un déplacement d'équilibre, à condition qu'elles n'acceptent pas le pyruvate qui rappelons-le, est produit à partir de l'ACS.

Si un SDS très bas de 0,02 UI/mL a pu être calculé avec le couple KG/D-ACS, un seuil beaucoup plus élevé (3,42 UI/mL) a été obtenu avec le L-ACS. Cette valeur très élevée est

le résultat d'une moyenne et d'un écart type élevés pour la série de mesure témoins avec la souche d'*E. coli*. sans enzyme surexprimée. Ce SDS très élevé provient donc sans nul doute de l'expression de l'AspAT constitutive de la souche hôte d'*E. coli*. Malgré cela, nous avons tout de même identifié 20 hits avec le L-ACS dont 17 présentent une activité saturante (> 8 UI/mL) (Graphique 23). Ce nombre de hits assez limité, qui représente à peine 8 % des enzymes bien surexprimées de la banque TAM(A), suggère que l'activité en présence de L-ACS n'est pas très fréquente au sein des L- $\alpha$ -TA. Cette conclusion reste cependant à vérifier dans la mesure où, le seuil de sélection très élevé ne nous a pas permis de détecter des activités inférieures à 3,42 UI/mL. Dans le cas du couple KG/D-ACS, 17 hits ont été identifiés avec des activités plus modestes (Graphique 24).

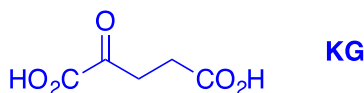
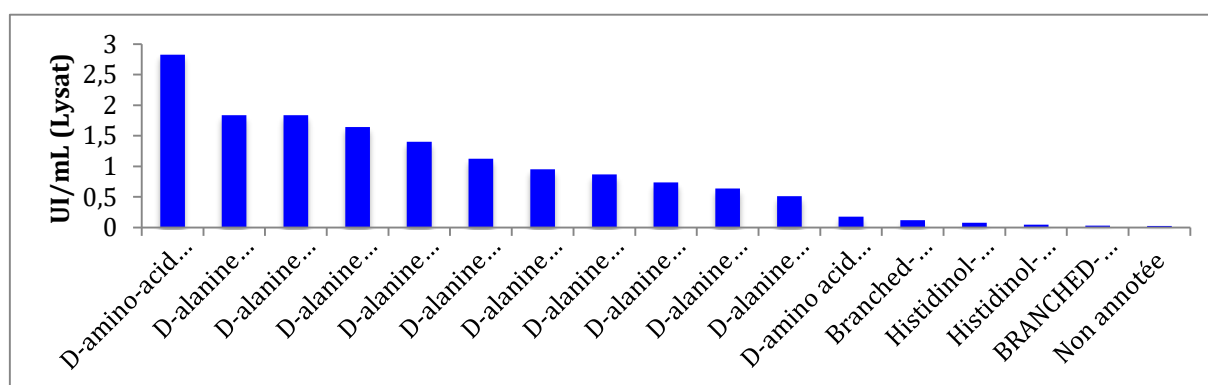


Graphique 23 : Classement des meilleurs hits pour le KG avec le test direct au L-ACS en fonction de leur activité.



Graphique 24 : Classement des meilleurs hits pour le KG avec le test direct au D-ACS en fonction de leur activité.

Parmi ceux-ci, 12 sont annotés D-AlaTA ou D-aaTA dans Uniprot (Graphique 25). De plus, compte-tenu du fait que la banque TAM(A) contient au total 17 enzymes annotées D-TA, cela signifie que plus de 70 % d'entre-elles acceptent le D-ACS comme substrat. Ce résultat suggère que l'activité vis-à-vis de l'ACS au sein des D- $\alpha$ -TA est moins rare que dans la famille des L- $\alpha$ -TA. La présence de hits annotés HisPTA ou BCAT est quelque peu surprenante. Cependant, ces 4 enzymes présentent des activités très basses, proches du seuil de sélection et pourraient donc correspondre à des artéfacts.



Graphique 25 : Annotation des hits détectés avec le test direct et le couple KG/D-ACS.

La Figure 34 dresse un bilan de la répartition au sein de TAM(A), des hits obtenus avec les couples KG/L- ou D-ACS.

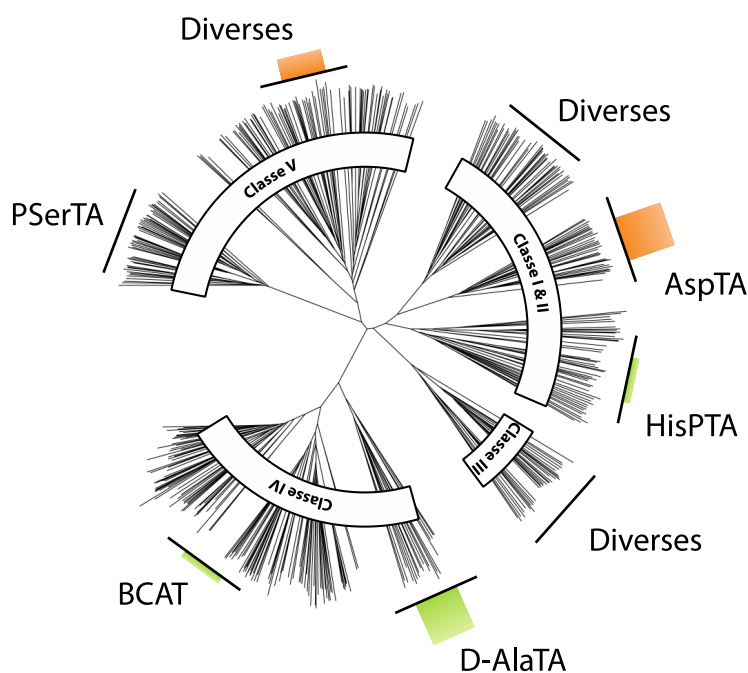


Figure 34 : Répartition au sein de TAM(A) des hits obtenus avec le couple KG/L-ACS (en orange) et le couple KG/D-ACS (en vert). Tous les histogrammes sont à la même échelle. La barre la plus importante (L-ACS, AspTA) représente 13 hits.

On peut remarquer qu'en série L, les TA acceptant l'ACS sont annotées dans les Classes I/II et V. Comme on pouvait s'y attendre nombre d'entre-elles sont annotées AspTA. Cependant des TA de Classe V acceptant l'ACS n'avaient pas encore été décrites avant ce travail. Contrairement à nos espérances, aucun hit n'a pu être identifié avec le L-ACS au sein des Classes III et IV.

### 5.1.3 Criblage de TAM(A) avec les accepteurs du groupe 2

Les accepteurs du groupe 2, sont des précurseurs d'acides aminés protéinogènes ou de leurs équivalents en série D. Le criblage avec ces substrats avait pour principal objectif d'établir un premier profil de chaque TA active au sein de TAM(A), qu'il s'agisse d'une  $\beta$ ASTA (révélée avec le test direct en série L ou D) ou d'une enzyme n'acceptant pas les  $\beta$ AS (révélée avec le test couplé en série L). Compte tenu de la très forte proportion des D-TA de TAM(A) acceptant le D-ACS, nous n'avons pas jugé pertinent d'effectuer le test couplé en série D (en utilisant le D-Glu).

#### 5.1.3.1 Criblages en série L

Le Tableau 24 dresse un bilan des criblages en série L, des accepteurs du groupe 2 avec le L-ACS (test direct) ou le L-Glu (test couplé) comme donneur. De faibles valeurs de

SDS (< 0,1 UI/mL) ont été calculées dans tous les cas à l'exception du MTOB, précurseur de Met dans le test couplé (0,168 UI/mL). De façon générale tous les seuils sont plus élevés dans le test couplé en raison des TA constitutives d'*E. coli* acceptant ces cétoacides en tant que « substrats naturels ». Comme cela était prévisible, un grand nombre de hits ont pu être détectés pour chaque couple avec des activités maximales comprises entre 0,12 UI/mL et la saturation. Il convient de rappeler à ce niveau, que dans le cas du test couplé, les activités supérieures à 0,5 UI/mL sont en réalité sous estimées. En effet une activité de 20 mUI/puits d'enzyme auxiliaire (AspTA) a été utilisée, ce qui permet de mesurer une activité de 1 mUI/puits pour la TA principale (Graphique 6). Compte tenu des dilutions, cela correspond à une activité de 0,5 UI/mL de lysat cellulaire.

Tableau 24 : Résultats obtenus pour les deux criblages effectués en série L avec le second groupe de substrat sur TAM(A).

Cétoacides	SDS (UI/mL de lysat)		Nombre de hits		Activité maximale mesurée (UI/mL de lysat)	
	L-ACS (direct)	L-Glu (couplé)	L-ACS (direct)	L-Glu (couplé)	L-ACS (direct)	L-Glu (couplé) <sup>a</sup>
Glyox	0,013	0,024	108	121	2,795	3,024
Pyr	0,019	0,094	81	72	1,126	1,121
MTOB	0,024	0,168	55	93	0,377	5,189
MOPA	0,012	0,025	10	118	0,120	Sat. <sup>b</sup>
HPA	0,011	0,012	12	16	2,064	2,238
HOBA	0,014	0,016	16	39	0,131	0,758

<sup>a</sup> Les activités mesurées dans le cadre du test couplé sont sous-estimées au dessus de 0,5 UI/mL de lysat à cause de l'utilisation de 20 mUI/puits d'AspTA comme enzyme auxiliaire. <sup>b</sup> Sat. = l'activité ne peut être mesurée précisément car elle dépasse 8 UI/mL de lysat et entraîne la saturation du spectrophotomètre.

Ces résultats montrent, tout d'abord, un nombre conséquent de nouvelles  $\beta$ ASTA, actives avec l'ACS et divers cétoacides, qui n'avaient pas été détectées avec le KG. On trouve ainsi des  $\beta$ ASTA acceptant le Glyox, le Pyr ou l'HPA avec des activités supérieures à 1 UI/mL de lysat. Il faut toutefois noter que ces activités sont inférieures au seuil de sélection appliqué avec le KG (3,42 UI/mL) et qu'il est donc probable que nombre de ces enzymes manifestent aussi une activité pour ce cétoacide. On peut par ailleurs noter que le nombre de hits est presque toujours plus élevé en utilisant le L-Glu comme donneur



dans le test couplé. Ceci est parfaitement illustré avec le MOPA, précurseur de Leu, pour lequel une petite dizaine de TA a été révélée avec le L-ACS alors que plus d'une centaine a été trouvée avec le test couplé. De plus les activités maximales en présence de Glu sont presque toujours supérieures à celle mesurées avec l'ACS dans le test direct, surtout si l'on considère que les activités supérieures à 0,5 UI/mL sont sous-estimées dans le cas du test couplé.

La Figure 35 permet de constater que l'ensemble des hits se répartissent essentiellement dans les Classes I/II, IV et V. Bien que quelques enzymes aient été décelées au sein de la Classe III avec le test couplé, leur activité ne dépasse pas 0,2 UI/mL. On peut aussi remarquer qu'aucune D- $\alpha$ -TA n'a été identifiée comme hit en série L, ce qui confirme les annotations d'UniProt et l'efficacité de nos test pour discriminer la stéréosélectivité des TA.

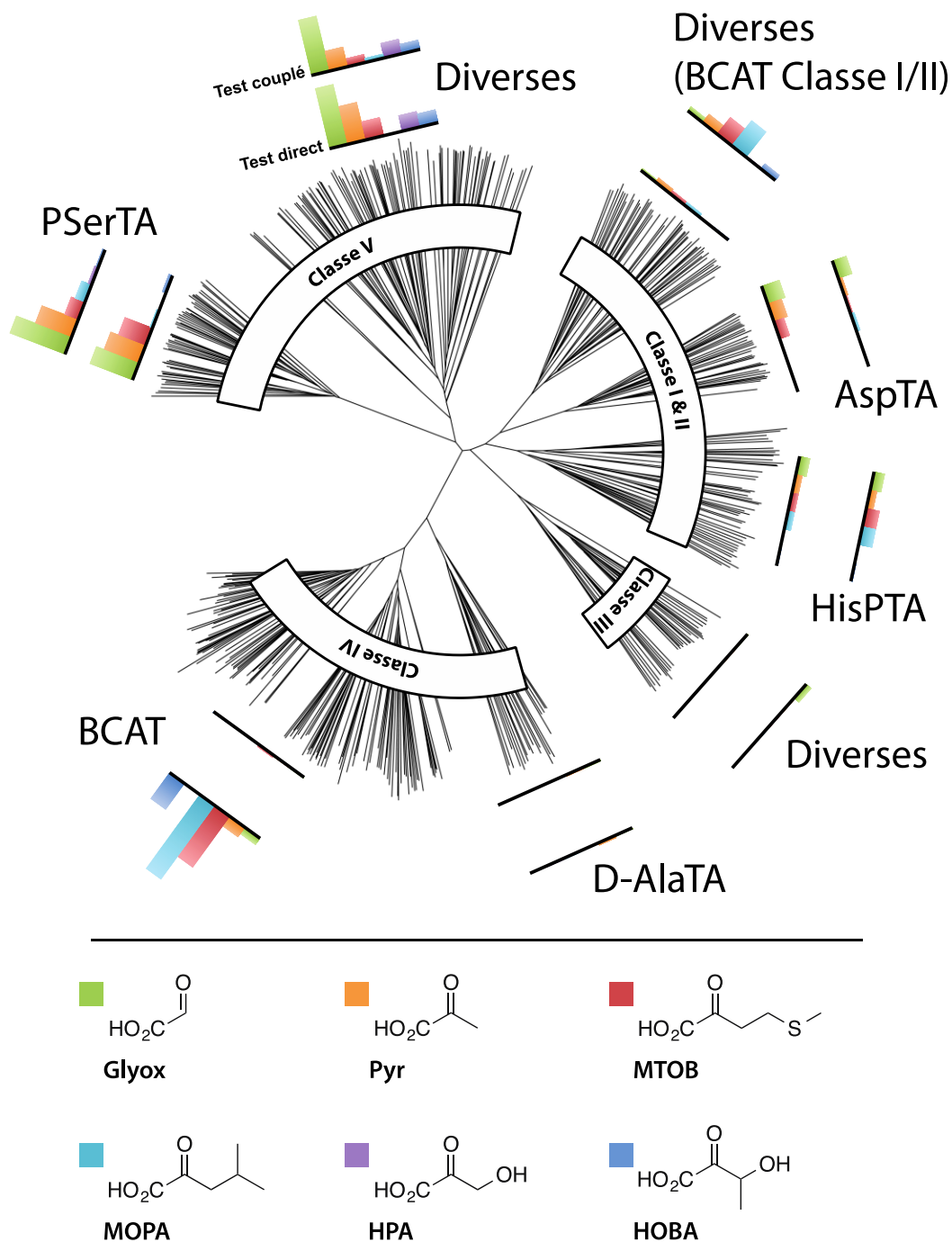


Figure 35 : Répartition au sein de TAM(A) des hits obtenus avec les différents cétoacides du groupe 2 avec les tests direct (plus près du centre) et couplé (vers l'extérieur). Tous les histogrammes sont à la même échelle. La barre la plus importante (MOPA, BCAT) représente 68 hits.

Si on analyse plus en détail les spectres de substrats et la répartition des hits, on peut clairement distinguer quatre profils principaux.

Le premier correspond à des TA de la Classe V, qui ont dans l'ensemble « répondu » aux tests direct et couplé et qui présentent donc une activité non négligeable vis-à-vis de l'ACS. Ces résultats confirment donc les premiers résultats obtenus lors du test direct avec le KG. De façon plus détaillée, on note dans ce premier groupe une préférence pour les aminoacides à chaînes courtes et non ramifiées. Ces enzymes ont donc probablement un site actif assez contraint. On peut également noter que ces TA de Classe V, non annotées PserTA, sont les seules à accepter les cétoacides hydroxylés (HPA et HOBA) précurseurs de Ser et Thr. Enfin, comme elles acceptent presque toutes le Pyr, il sera malheureusement impossible de mettre en place avec ces dernières un système de déplacement d'équilibre basé sur l'utilisation de l'ACS (ou l'Asp) comme donneur. Par contre ces enzymes acceptant le Pyr et l'ACS (PyrASTA) constituent des candidats pour servir d'enzyme auxiliaire pour le test couplé destiné au criblage des amine-TA (cf. 1.1.2.3). Ainsi sept PyrASTA présentant des activités supérieures à 0,5 UI/mL ont été détectées avec le couple L-ACS/Pyr.

Le second profil correspond aux enzymes annotées AspTA. Bien qu'elles aient été, elles aussi, mises en évidence avec les deux tests, ces enzymes se sont révélées peu actives avec les substrats du groupe 2, ce qui les rapproche du profil de l'AspTA d'*E.coli*. Malgré leur spectre de substrats restreint, elles demeurent les seules  $\beta$ ASTA à n'accepter que très faiblement le Pyr et donc à permettre un déplacement d'équilibre avec l'ACS. Il sera donc intéressant d'étudier plus en détail les TA les plus actives de ce groupe afin de voir par exemple s'il contient des enzymes thermostables mieux adaptées que l'AspTA d'*E. coli* pour des applications synthétiques.

Le troisième profil regroupe les TA annotées HisPTA. Bien que le nombre de hits soit relativement faible, il reste constant avec les divers types de substrat testés à l'exception des dérivés hydroxylés. Il s'agit donc du seul groupe à accepter aussi bien les cétoacides à chaîne courte ou longue, linéaire ou ramifiée, ce qui laisse entrevoir une variété d'applications synthétiques.

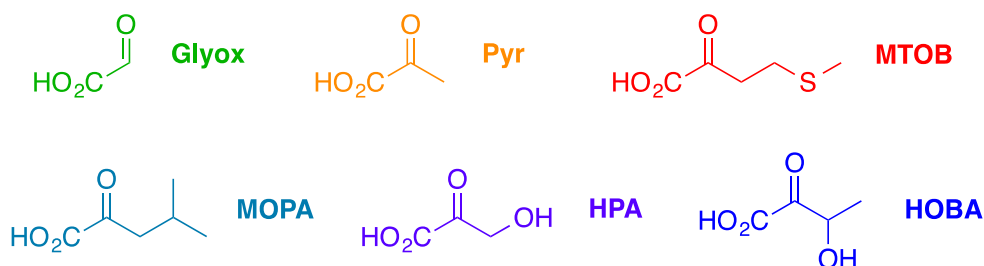
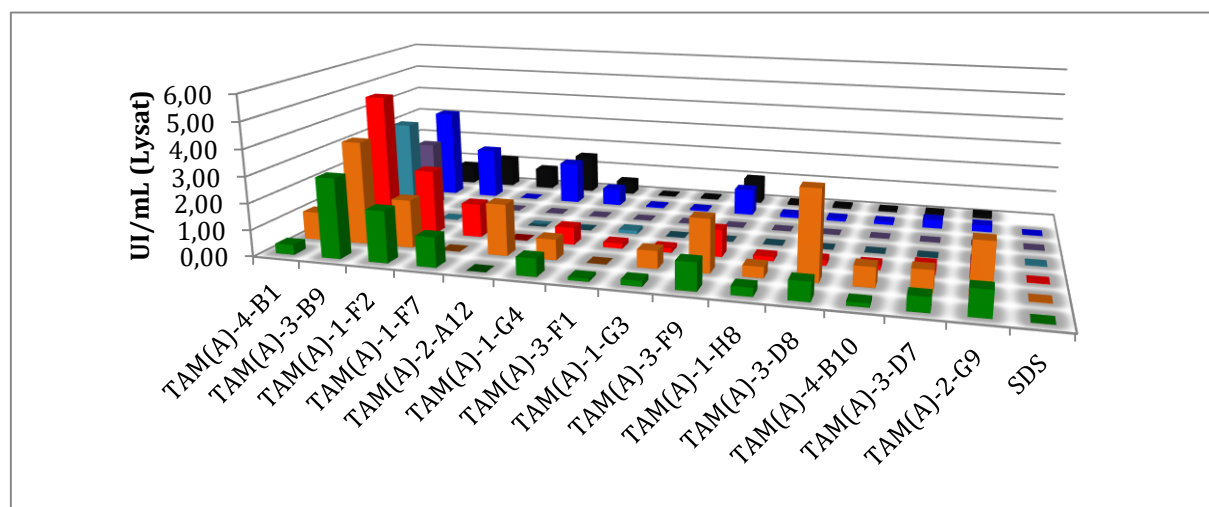
Le quatrième et dernier profil est très différent des trois précédents. Dans ce cas, les substrats à chaîne longue ou ramifié sont les mieux acceptés, avec une nette préférence pour le MOPA. Il s'agit ainsi du profil des BCAT que l'on retrouve logiquement dans la Classe IV, mais aussi, de façon surprenante au sein des Classe I/II pour un groupe, constitué d'enzymes avec des annotations diverses et imprécises, bien à part des AspTA

et HisPTA. Nos résultats corroborent la description récente d'une nouvelle BCAT de ce type appartenant à la classe I/II.<sup>277</sup> Nous avons donc décidé de qualifier ce groupe de TA de « BCAT Classe I/II » pour la suite de nos analyses des résultats des criblages.

En conclusion, ces quatre profils donnent une première image de la diversité des activités présentes dans la banque TAM(A) qui constitue donc une source abondante de catalyseurs permettant de préparer une variété d'acides aminés canoniques mais aussi vraisemblablement d'analogues de ces derniers.

### 5.1.3.2 Criblages en série D

Le criblage en utilisant le D-ACS avec le test direct nous a permis de détecter la quasi-totalité des enzymes annotées D-α-TA présentes dans TAM(A), soit 15 enzymes sur 22, et ce malgré les SDV très élevés calculés à partir des témoins sans cétoacide. Comme cela apparaît dans le Graphique 26, de bonnes activités ont été mesurées avec les différents substrats du groupe 2, avec des valeurs maximales du même ordre voire supérieures à celles obtenues avec le test couplé en série L.



Graphique 26 : Activités des hits détectés avec le D-ACS dans le test direct avec les différents cétoacides du groupe 2. Le SDV (= 4A<sub>0</sub>) calculé pour chaque enzyme est représenté en noir.

Avec les substrats accepteurs du groupe 2, aucun hit non annoté D- $\alpha$ -TA n'a été détecté avec le D-ACS. L'annotation de ces hits semble donc exacte et les D- $\alpha$ -TA se retrouvent bien cantonnées dans un petit groupe à part bien visible au sein de la Classe IV, sur l'arbre d'identité de TAM(A) (Figure 36).

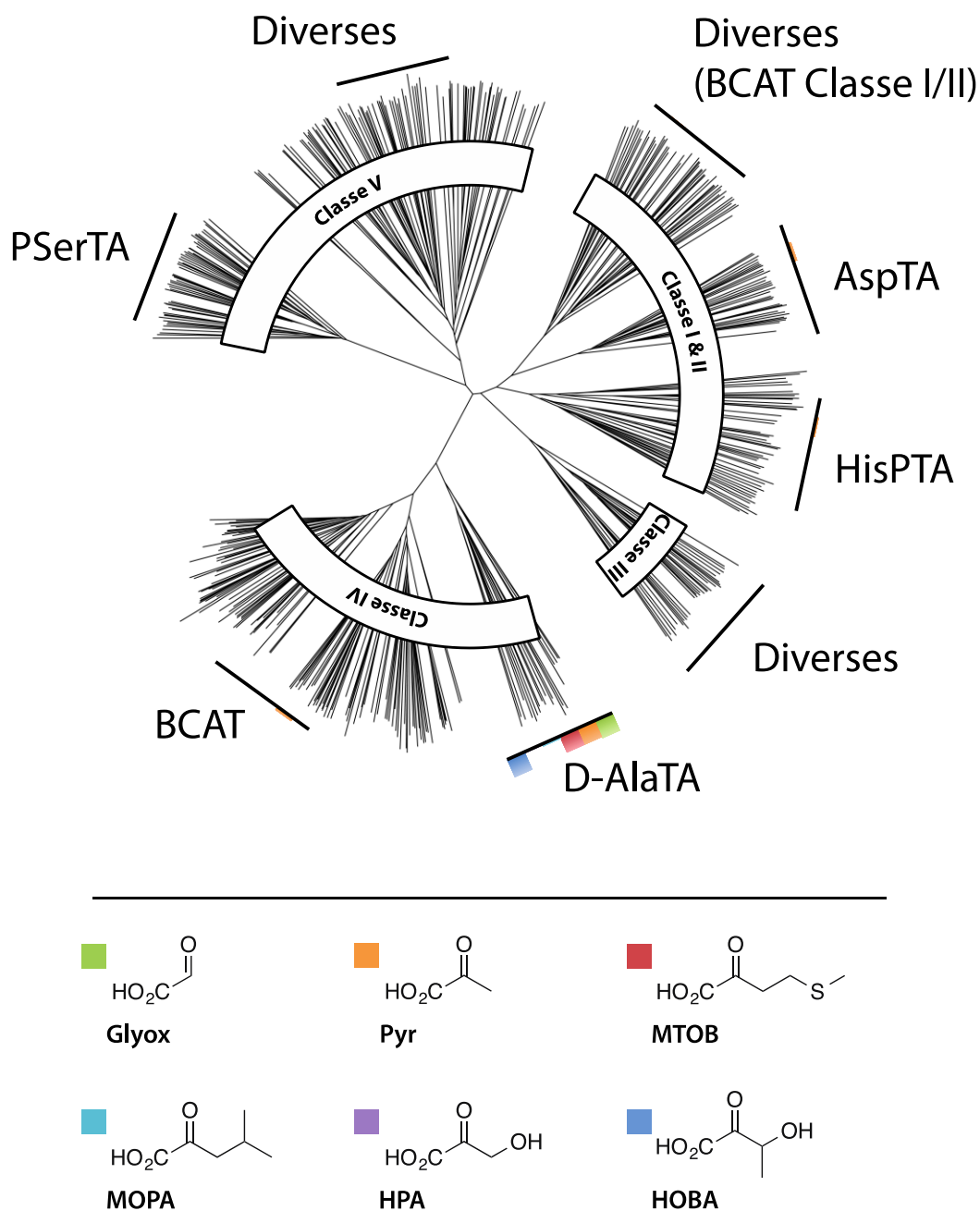


Figure 36 : Répartition au sein de TAM(A) des hits obtenus avec les différents cétoacides du groupe 2 en utilisant le D-ACS dans le test direct. Tous les histogrammes sont à la même échelle. La barre la plus importante (Glyox, D-AlaTA) représente 14 hits.

Le spectre de substrat commun aux différents hits est différent des profils présentés en série L. Ainsi les activités vis-à-vis du MOPA sont négligeables et une seule TA s'est révélée active avec le HPA. Par contre, tous les autres accepteurs du groupe 2 constituent de façon générale de bons substrats pour ce groupe de hits.

### 5.1.4 Criblage de TAM(A) avec les accepteurs du groupe 3

Le groupe 3 est constitué de 3 cétoacides à chaîne alkyle que nous avons testés afin de compléter l'analyse du spectre de substrat des enzymes de la banque TAM(A), mais aussi de détecter des catalyseurs permettant d'accéder à des aminoacides non canoniques valorisables. (Figure 37).

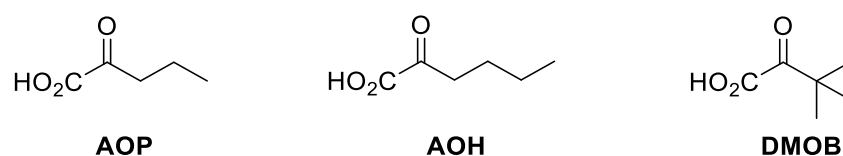


Figure 37 : Cétoacides du groupe 3.

#### 5.1.4.1 Criblage en série L

Les résultats des criblages en série L utilisant les tests direct et couplé, sont présentés dans le Tableau 25.

Tableau 25 : Résultats obtenus pour les deux criblages de la banque TAM(A) effectués en série L et avec le troisième groupe de substrats.

Cétoacides	SDS (UI/mL de lysat)		Nombre de hits		Activité maximale mesurée (UI/mL de lysat)	
	L-ACS (direct)	L-Glu (couplé)	L-ACS (direct)	L-Glu (couplé)	L-ACS (direct)	L-Glu (couplé) <sup>a</sup>
AOP	0,012	0,025	27	152	0,433	Sat. <sup>b</sup>
AOH	0,017	0,108	18	101	0,320	Sat. <sup>b</sup>
DMOB	0,013	0,015	5	15	0,014	0,151

<sup>a</sup> Les activités mesurées dans le cadre du test couplé sont sous-estimées au-dessus de 0,5 UI/mL de lysat à cause de l'utilisation de 20 mUI/puits d'AspTA comme enzyme auxiliaire. <sup>b</sup> Sat. = l'activité ne peut être mesurée précisément car elle dépasse 8 UI/mL de lysat et entraîne la saturation du spectrophotomètre.

Les résultats obtenus avec les 3 substrats du groupe 3 sont tout à fait cohérents avec les résultats présentés ci-dessus relatifs aux substrats du groupe 2. La répartition des hits au sein de l'arbre d'identité de TAM(A) (Figure 38) conforte la distinction des 4

profils présentés précédemment. Des TA de Classe V détectées avec les tests direct et couplé montrent ainsi des activités modérées avec les 2 substrats à chaîne linéaire. Au sein de la Classe I/II des enzymes annotées HisPTA présentent aussi des activités non négligeables vis-à-vis de ces 2 substrats. Le plus grand nombre de hits et les meilleures activités ont été par ailleurs obtenus avec des enzymes de type BCAT situées au sein de la Classe IV mais aussi au sein de la Classe I/II. Nous avons par ailleurs logiquement observé que les enzymes acceptant les deux substrats linéaires AOP et AOH sont aussi actives avec le MTOB précurseur de Met. Enfin, force est de constater que le cétoacide tert-butyle DMOB n'est accepté que par quelques BCAT de Classe IV avec des activités faibles ( $\leq 0,15$  UI/mL) mais qui restent peut-être exploitables pour accéder à la *L-tert-leucine*.

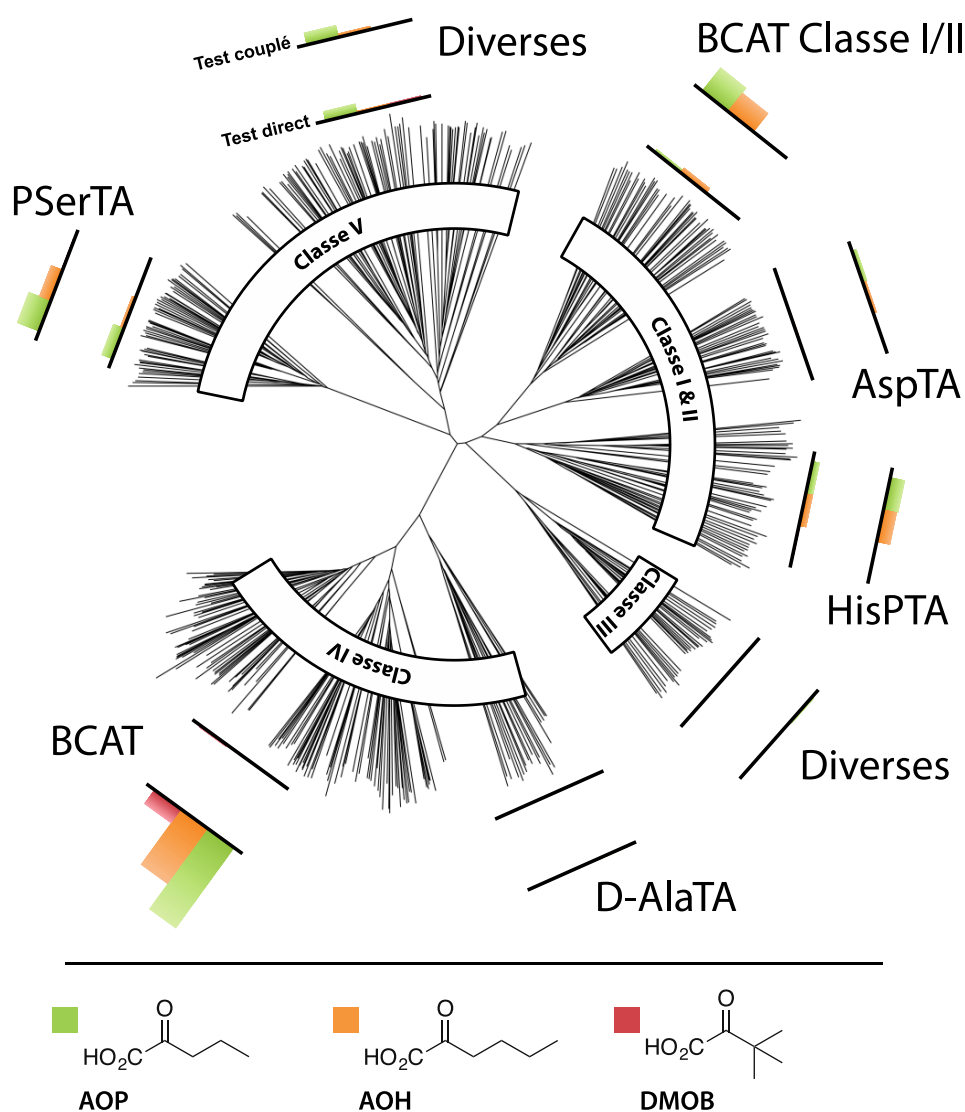
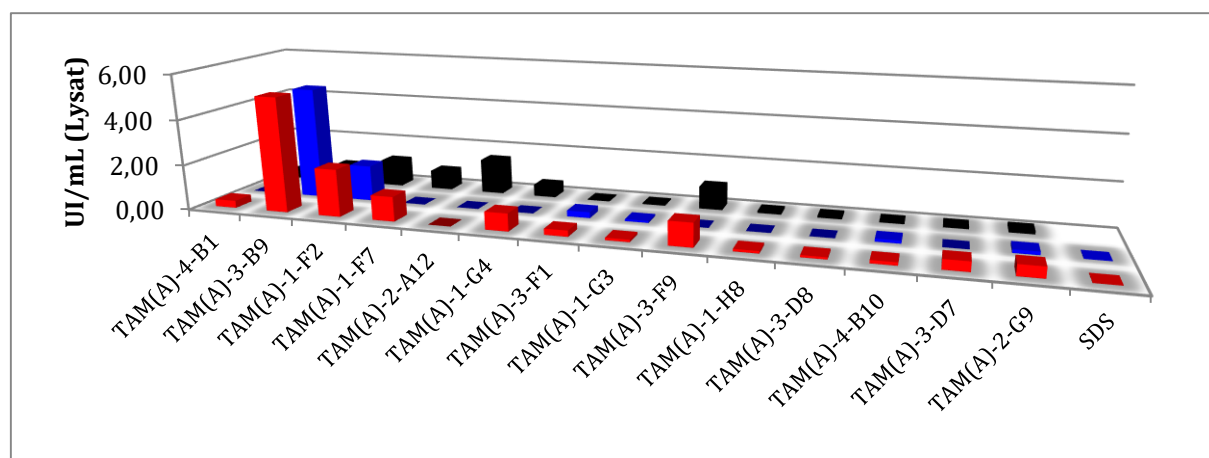


Figure 38 : Répartition au sein de TAM(A) des hits obtenus avec les cétoacides du groupe 3 en utilisant le L-ACS dans les tests direct (plus près du centre) et couplé (à l'extérieur). Tous les histogrammes sont à la même échelle. La barre la plus importante (AOP, BCAT) représente 80 hits.

En conclusion, de très bonnes activités ont été mesurées avec les substrats AOP et AOH précurseurs de la Norvaline et de la Norleucine et nous disposons donc de nouveaux outils utilisables pour la synthèse de ces amino acides non canoniques. De façon intéressante les meilleurs hits sont des BCAT de Classe I/II dont l'étude est par conséquent particulièrement prometteuse.

### 5.1.4.2 Criblage en série D

Le Graphique 27 présente les activités mesurées pour les différents hits obtenus avec les 2 cétoacides AOP et AOH lors du criblage avec le D-ACS (test direct). Aucun hit n'a été détecté avec le cétoacide tert-butylique DMOB. Les activités mesurées avec les deux cétoacides linéaires sont très proches de celles mesurées avec le cétoacide soufré MTOB.



Graphique 27 : Activités des hits détectés avec le D-ACS dans le test direct avec les cétoacides AOP et AOH.

Ces résultats confirment le fait que plusieurs D- $\alpha$ -TA présentent dans TAM(A) tolèrent bien des substrats aliphatiques non ramifiées. Certaines d'entre elles comme la A3B9, seront très certainement utilisables pour la synthèse de la D-norleucine et de la D-norvaline.



### 5.1.5 Criblage de TAM(A) avec les accepteurs du groupe 4

Le groupe 4 est constitué de deux cétoacides aromatiques, l'OPA et OPBA précurseurs de la phénylglycine et de l'homophénylalanine (Figure 39). La découverte de TA permettant d'accéder à ces aminoacides ou à des analogues de façon efficace est d'un intérêt majeur compte tenu du grand nombre de molécules bioactives intégrant ce type de structures.

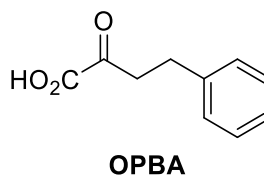
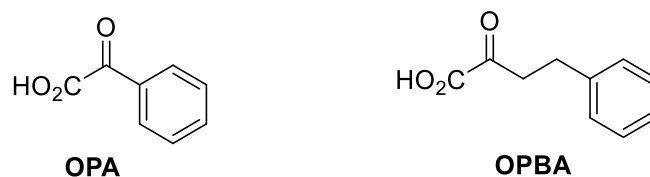
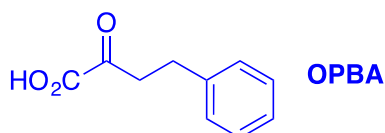
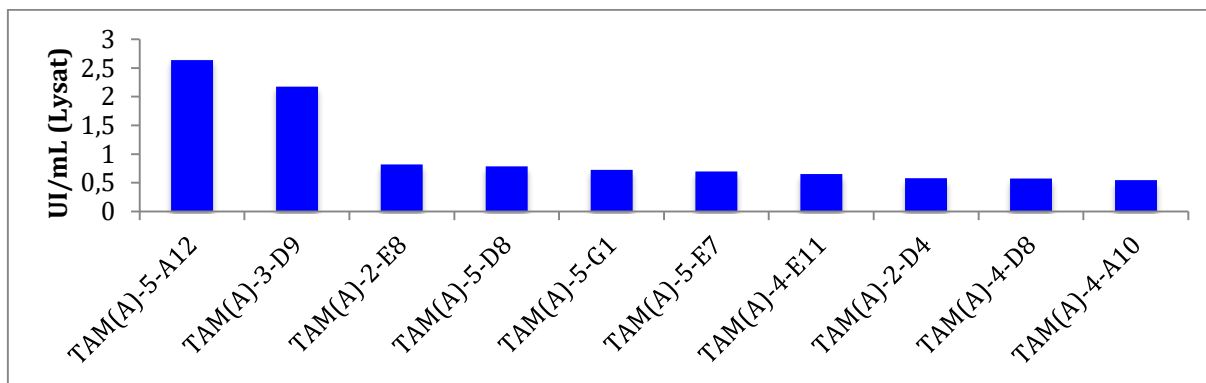


Figure 39 : Cétoacides aromatiques constituant le groupe 4.

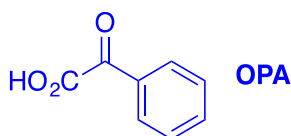
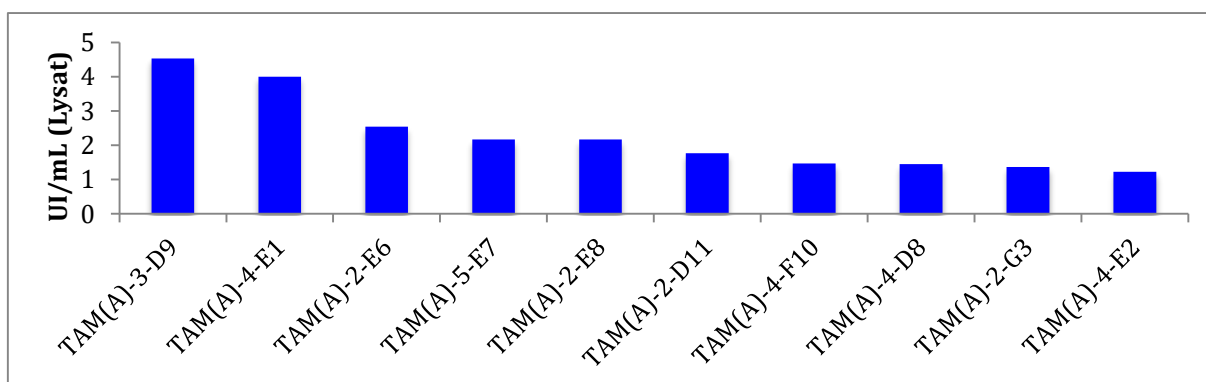
#### 5.1.5.1 Criblage en série L

Le test direct avec le L-ACS et ces 2 substrats aromatiques n'a permis de détecter qu'un seul hit présentant une activité supérieure à 0,1 UI/mL. Il s'agit de la TA A4A10, une TA annotée dans la Classe V pour laquelle une activité de 0,42 UI/mL a été mesurée en présence du substrat OPBA. Le test couplé utilisant le L-Glu a donné de bien meilleurs résultats. En effet, 12 hits supplémentaires ont été détectés avec des activités supérieures à 0,42 UI/mL en présence de l'OPBA (Graphique 28). De manière intéressante, l'activité du hit A4A10 n'a pas augmenté lors du test couplé, ce qui suggère que le « substrat limitant » pour l'activité de cette enzyme est l'OPBA et non l'ACS.



Graphique 28 : Classement des 10 meilleurs hits obtenus avec le test couplé et l'OPBA.

Dans le cas du substrat OPA, plus d'une cinquantaine de hits a été mise en évidence avec le test couplé dont une douzaine présentant des activités  $\geq 1$  UI/mL (Graphique 29). La quasi-totalité des hits obtenus avec l'OPA appartiennent à la famille des BCAT de Classe IV ou I/II.



Graphique 29 : Classement des 10 meilleurs hits obtenus avec le test couplé et l'OPA.

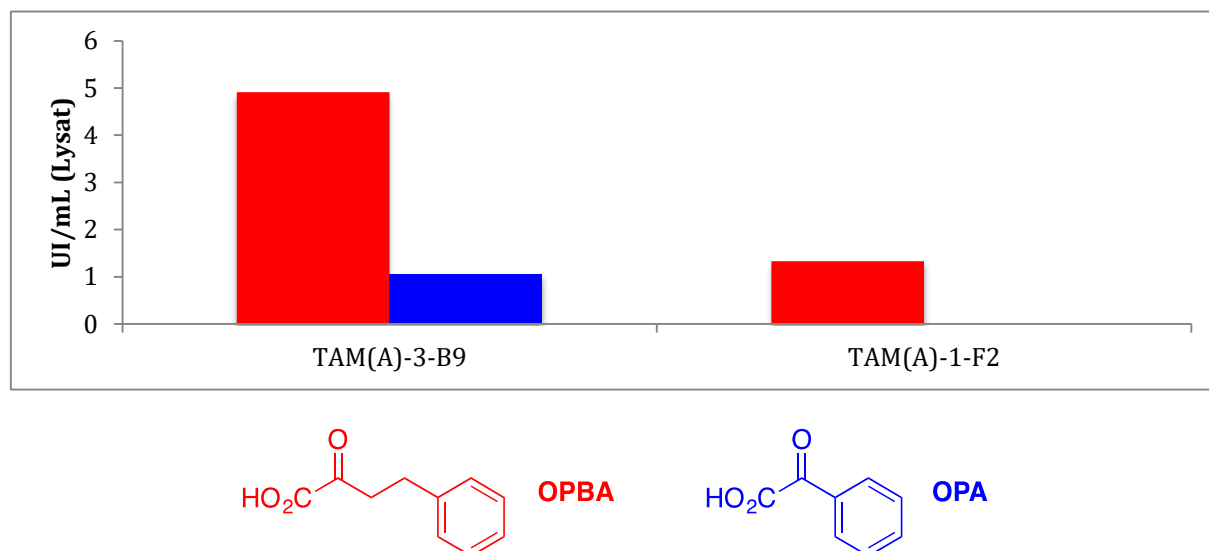
On peut remarquer que le meilleur hit détecté avec l'OPA (A3D9, 4,53 UI/mL) qui est aussi le second meilleur hit détecté avec l'OPBA (2,17 UI/mL) est une TA de Classe I sans annotation précise dans Uniprot. Il s'agit donc d'une TA présentant de fortes potentialités pour des applications synthétiques.

### 5.1.5.2 Criblage en série D

Le criblage avec le test direct utilisant le D-ACS n'a permis de détecter que 2 hits avec les 2 substrats aromatiques (Graphique 30).

Les activités mesurées dans les deux cas sont tout à fait correctes ( $\geq 1$  UI/mL) ce qui fait de ces TA des outils potentiels pour préparer la D-Phénylglycine, la D-HPhe ou des analogues de ces deux composés.

Nous disposons donc désormais de plusieurs TA permettant de préparer l'HPhe et la phénylglycine en série L et D. Nous ne pourrions cependant pas nous servir de l'ACS pour le déplacement d'équilibre avec ces enzymes puisque les quelques  $\beta$ ASTA faisant partie des hits acceptent aussi le Pyr. Il conviendra par conséquent de mettre en œuvre une autre stratégie de déplacement d'équilibre pour valoriser ces nouvelles TA.



Graphique 30 : Classement des hits obtenus avec l'OPBA (en bleu) et l'OPA (en rouge) en utilisant le test direct avec le D-ACS.

### 5.1.6 Criblage de TAM(A) avec les accepteurs hydroxylés du groupe 5

La Figure 40 rappelle la structure des cétoacides  $\beta$ - et  $\gamma$ -hydroxylés constituant le groupe 5.

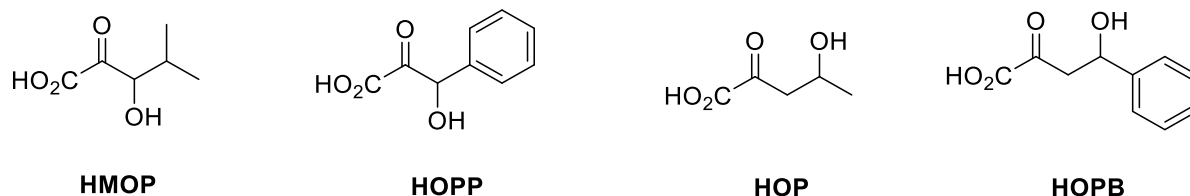


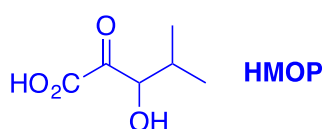
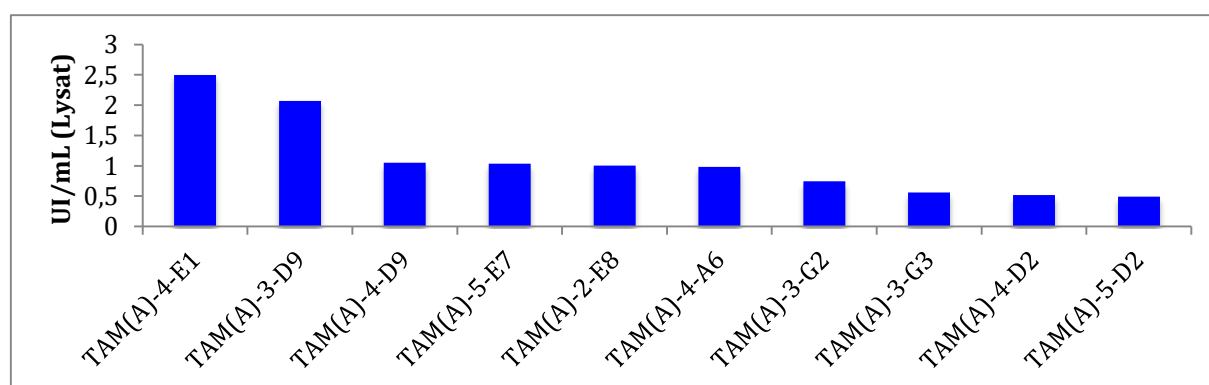
Figure 40 : Cétoacides hydroxylés constituant le groupe 5.

Ces substrats peuvent être considérés comme les précurseurs de divers analogues hydroxylés d'acides aminés canoniques (Ser, Leu, Phe) ou non canoniques (NVal, HPhe). La découverte de TA permettant d'accéder à ces acides aminés est donc très intéressante.

#### 5.1.6.1 Criblage avec les cétoacides $\beta$ -hydroxylés

Les tests directs utilisant le L- ou le D-ACS n'ont pas permis de détecter de hits. En revanche, le test couplé utilisant le L-Glu a permis de détecter de très nombreux hits avec les 2 substrats  $\beta$ -hydroxylés (HMOP et HOPP).

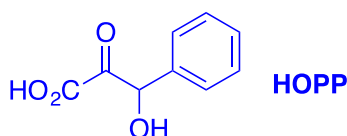
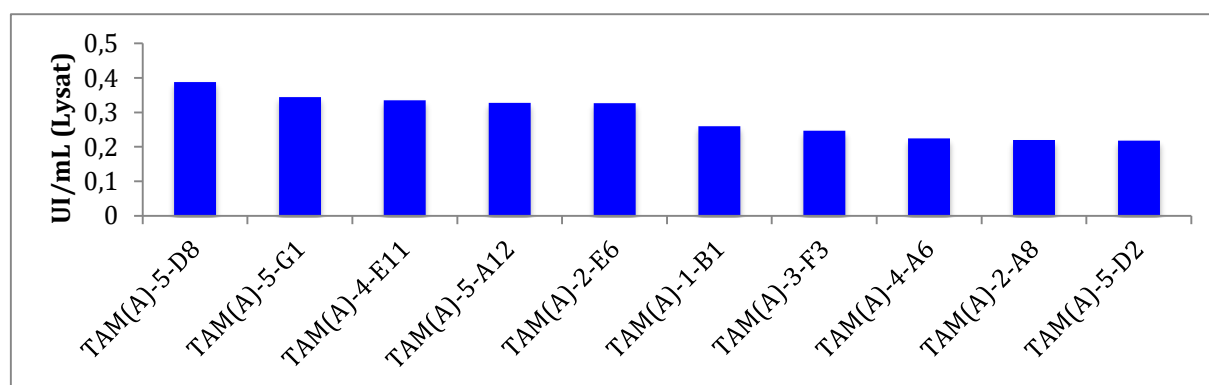
Dans le cas du dérivé HMOP, 6 enzymes ont montré une bonne activité ( $\geq 1$  UI/mL) (Graphique 31).



Graphique 31 : Classement des 10 meilleurs hits obtenus avec le test couplé et HMOP.

Ces enzymes appartiennent de nouveau à la famille des BCAT (Classe IV et I/II) ce qui paraît cohérent avec l'analogie structurale entre le HMOP et le MOPA, précurseur de Leu. Par contre aucun hit n'a été détecté au sein des TA de Classe V acceptant les 2 cétoacides  $\beta$ -hydroxylés (HPA et HOBA) précurseurs de Ser et Thr. Ces résultats confirment encore la préférence des TA de Classe V pour les substrats non ramifiés de petite taille.

En ce qui concerne le substrat aromatique HOPP, des résultats similaires ont été obtenus en terme de nombre de hits, avec cependant des activités plus faibles ne dépassant pas 0,4 UI/mL (Graphique 32). Dans ce cas, en plus des BCAT de Classe IV, on trouve parmi les meilleurs hits des enzymes annotées HispTA. Cette observation peut-être rationalisée si l'on considère que l'His présente également un noyau aromatique.



Graphique 32 : Classement des 10 meilleurs hits obtenus avec le test couplé et HOPP.

### 5.1.6.2 Criblage avec les cétoacides $\gamma$ -hydroxylés

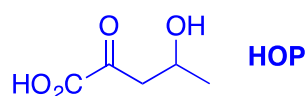
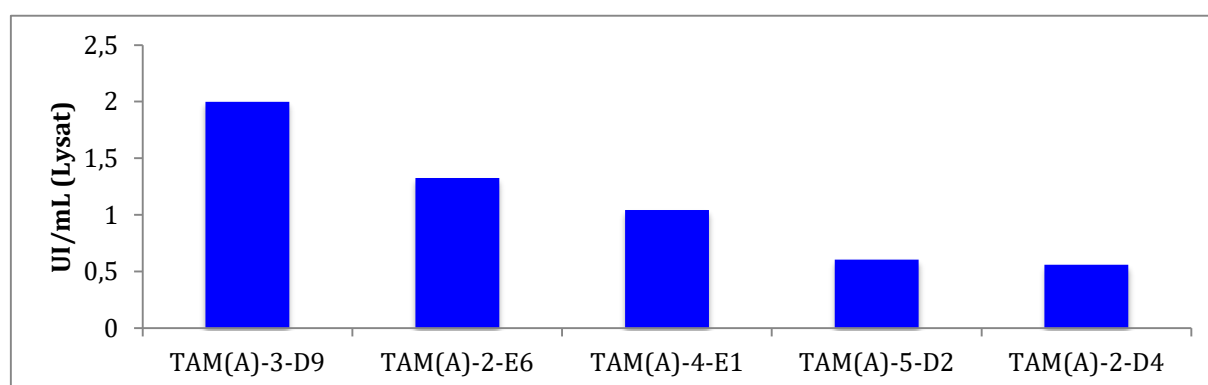
Les résultats obtenus avec les 2 cétoacides  $\gamma$ -hydroxylés doivent être analysés avec précaution dans la mesure où les 2 substrats HOP et HOPB sont tous deux contaminés par du Pyr (16 et 25 % molaire). Ainsi, bien que nous ayons détecté plus de 100 hits avec chacun des 2 substrats, un grand nombre d'entre eux peuvent correspondre à des faux positifs qui sont en réalité actifs avec le Pyr (Tableau 26).

Tableau 26 : Résultats obtenus pour les deux criblages de la banque TAM(A) effectués en série L avec les cétoacides  $\gamma$ -hydroxylés HOP et HOPB.

Cétoacides	SDS (UI/mL de lysat)		Nombre de hits		Activité maximale mesurée (UI/mL de lysat)	
	L-ACS (direct)	L-Glu (couplé)	L-ACS (direct)	L-Glu (couplé)	L-ACS (direct)	L-Glu (couplé) <sup>a</sup>
HOP	0,015	0,047	56	109	0,241	2,000
HOPB	0,020	0,087	94	101	0,807	2,366

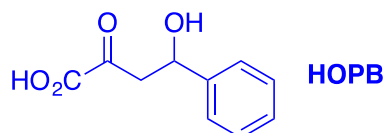
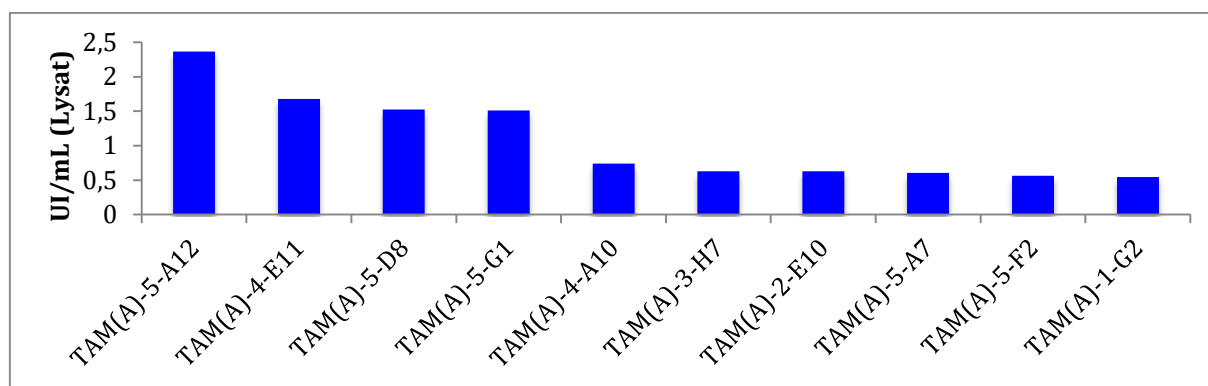
<sup>a</sup> Les activités mesurées dans le cadre du test couplé sont sous-estimées au-dessus de 0,5 UI/mL de lysat à cause de l'utilisation de 20 mUI/puits d'AspTA comme enzyme auxiliaire. <sup>b</sup> Sat. = l'activité ne peut être mesurée précisément car elle dépasse 8 UI/mL de lysat et entraîne la saturation du spectrophotomètre.

Si les activités des hits détectées avec le test direct sont assez modestes en particulier pour le HOP, celles détectées avec le test couplé sont  $\geq 2$  UI/mL avec les deux accepteurs. Ainsi dans le cas du HOP, 5 hits appartenant de nouveau à la famille des BCAT (Classe IV et Classe I/II) présentent une activité supérieure à 0,5 UI/mL (Graphique 33). Ici encore, l'analogie structurale entre HOP et MOPA pourrait expliquer l'activité des BCAT vis-à-vis du HOP.



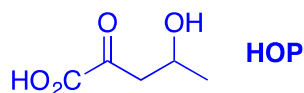
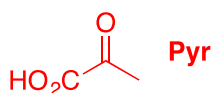
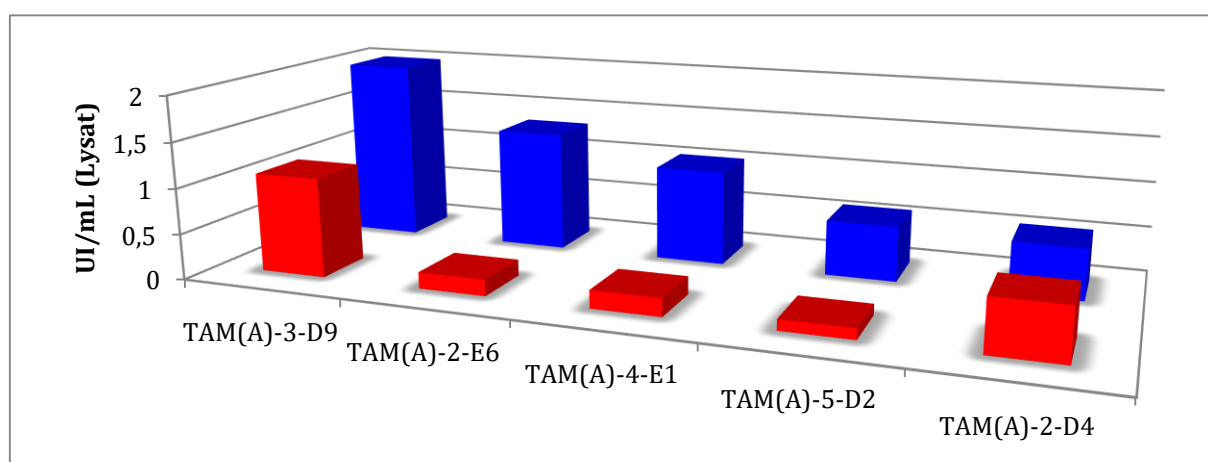
Graphique 33 : Classement des 5 meilleurs hits obtenus avec le test couplé et HOP.

Il est intéressant de noter que la A3D9 et la A4E1 font une fois de plus partie des meilleurs hits. Dans le cas du HOPB 11 hits présentent des activités supérieures à 0,5 UI/mL (Graphique 34).

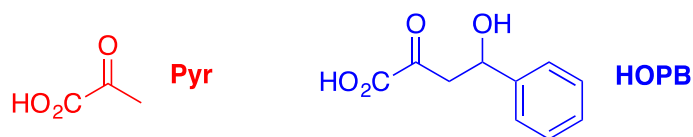
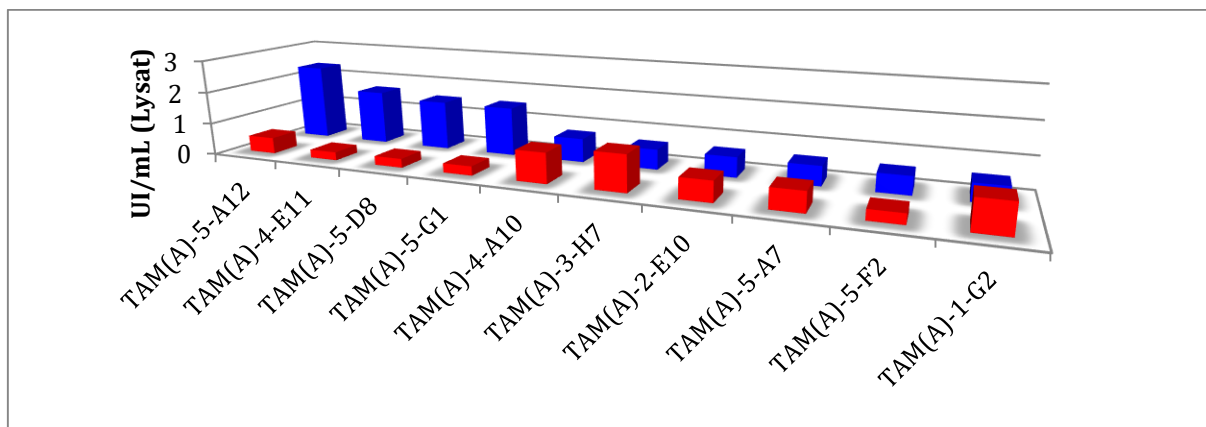


Graphique 34 : Classement des 11 meilleurs hits obtenus avec le test couplé et HOPB.

Afin d'appliquer un filtre et d'éliminer d'éventuels faux positifs, nous avons comparé, pour chacun des hits, les activités mesurées avec le substrat  $\gamma$ -hydroxylé avec l'activité mesurée avec le Pyr qui rappelle le, contamine les deux substrats à hauteur de 12 et 25 % molaire. Le Graphique 35 et le Graphique 36 présentent ces comparaisons pour les deux séries de hits obtenus avec HOP et HOPB.



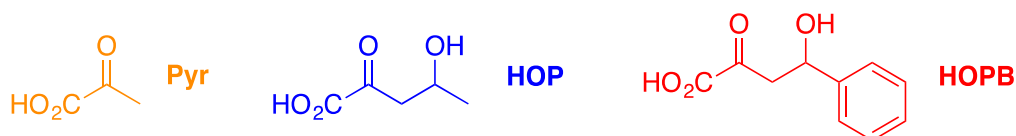
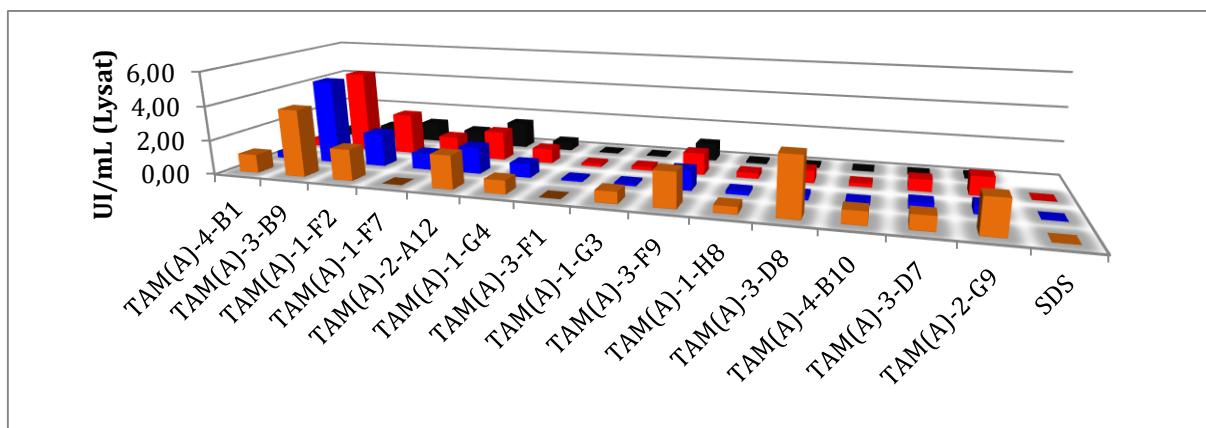
Graphique 35 : Comparaison des activités mesurées avec HOP et Pyr pour les des 5 meilleurs hits détectés avec le test couplé et HOP.



Graphique 36 : Comparaison des activités mesurées avec HOPB et Pyr pour les 10 meilleurs hits détectés avec le test couplé et HOPB.

Dans les 2 cas, on peut raisonnablement penser que les 4 meilleurs hits ne sont pas des faux positifs, compte-tenu de l'activité nettement plus grande mesurée avec HOP et HOPB.

Le criblage en série D, utilisant le test direct avec le D-ACS a permis de détecter 4 hits communs aux deux substrats, pour lesquels l'activité mesurée avec le HOP et le HOPB est supérieure à celle mesurée avec le Pyr : A3B9, A1F2, A1F7 et A1G4. (Graphique 37).



Graphique 37 : Activités des D-α-TA de TAM(A) pour le Pyr, le HOP et le HOPB. Le SDV pour chaque enzyme est représenté en noir.



Pour finir, la Figure 41 résume la répartition des hits obtenus lors des criblages de TAM(A) avec les cétoacides hydroxylés du groupe 5.

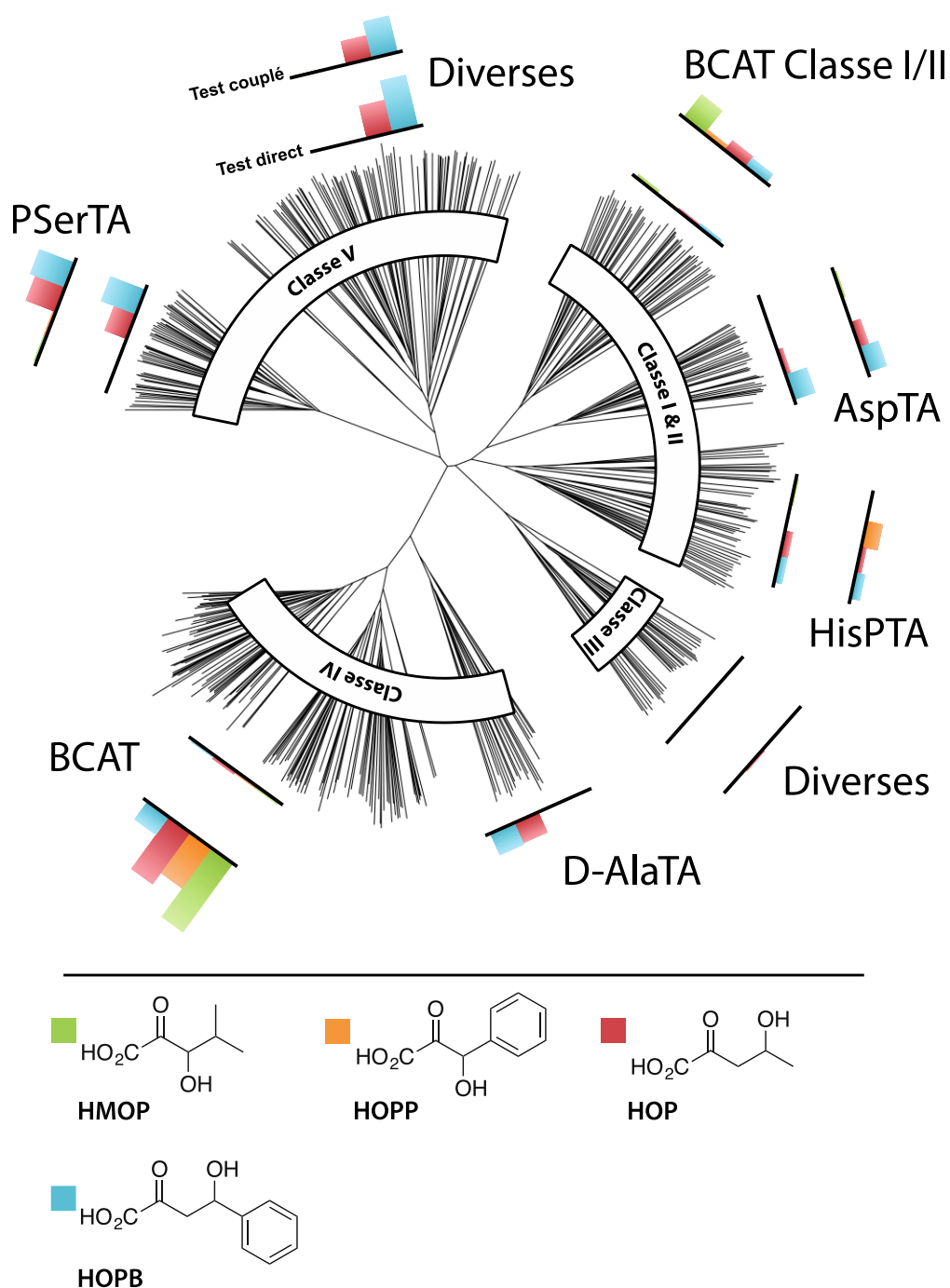


Figure 41 : Répartition au sein de TAM(A) des hits obtenus avec les cétoacides du groupe 5 en utilisant l'ACS dans les tests directs (plus près du centre) et couplé (à l'extérieur). Tous les histogrammes sont à la même échelle. La barre la plus importante (HMOP, BCAT) représente 61 hits.

Nous disposons donc à présent d'un petit groupe de TA qui devraient permettre d'accéder à des aminoacides hydroxylés en série D ou L. Cependant dans le cas des dérivés  $\gamma$ -hydroxylés, ces activités devront être confirmées avant d'envisager des applications synthétiques.

### 5.1.7 Criblages avec le KDG et le DMOP (Groupe 6)

Dans la série des criblages de la banque TAM(A), nous avons enfin recherché des TA actives avec les 2 cétoacides du groupe 6 précurseurs d'un aminosucre et d'un analogue du Glu (Figure 42).

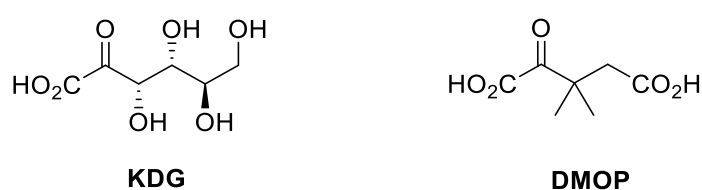


Figure 42 : Cétoacides constituant le groupe 6.

Malheureusement, ni les tests directs avec le L-ou D-ACS ni le test couplé avec le L-Glu comme donneur n'ont permis de détecter des hits. Dans le cas du KDG, ceci peut être dû au caractère majoritairement cyclique (hémiacétalique) en solution, peu propice à la transamination. Il est aussi possible que la stéréochimie fixée du KDG ait imposé une trop forte contrainte. Il est enfin probable qu'aucune TA de la banque TAM(A) n'accorde des chaînes polyhydroxylées dans son site actif. Pour identifier ce type de TA, il serait sans doute intéressant de construire une nouvelle banque (TAM(E)) incluant des enzymes de Classes VI et VII qui contiennent des enzymes acceptant divers aminosucres. En ce qui concerne le DMOP, l'absence de hit est cohérent avec les résultats obtenus avec le cétoacide tert-butylique DMOB et confirme la très forte contrainte imposée par la présence d'un carbone quaternaire en  $\alpha$  du groupement carbonyle.

## 5.2 Criblage de TAM(C) à la recherche de nouvelles D- $\alpha$ -TA

Au regard du faible nombre de représentants de la famille des D- $\alpha$ -TA dans la banque TAM(A), nous avons décidé de construire et de cribler la banque TAM(C) qui contient exclusivement des TA de Classe IV généralement annotées BCAT ou D- $\alpha$ -TA.

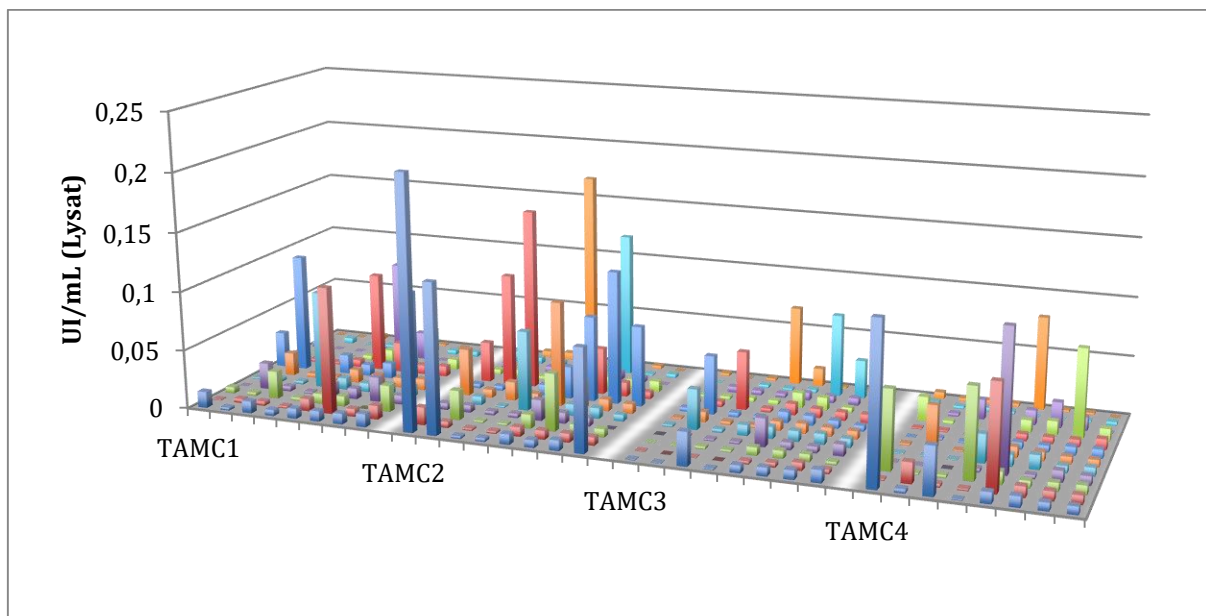
En raison du coût très élevé de la D-cystine, nécessaire à la préparation du D-ACS, nous avons choisi dans ce cas d'appliquer uniquement le test couplé utilisant le D-Glu comme donneur primaire et le L-ACS dans la réaction auxiliaire catalysée par l'AspTA. Ce choix nous a paru pertinent car toutes les D- $\alpha$ -TA décrites à ce jour (incluant les hits détectés dans TAM(A)) ont montré une activité non négligeable avec le couple KG/D-Glu. Le Tableau 27 regroupe les 10 cétoacides qui ont été testés.

Tableau 27 : Cétoacides testés lors du criblage de TAM(C).

Catégorie	Groupe	abréviation	structure
II	2 Précurseurs d'acides aminoacides canoniques	Pyr	
		HPA	
V : précurseurs d'acides aminoacides non canoniques valorisables	3 Cétoacides alkylés	AOP	
		DMOB	
	4 Cétoacides aromatiques	OPA	
		OPBA	
	5 Cétoacides $\beta$ - ou $\gamma$ -hydroxylés	HMOP	
		HOPP	
		HOP	
		HOPB	

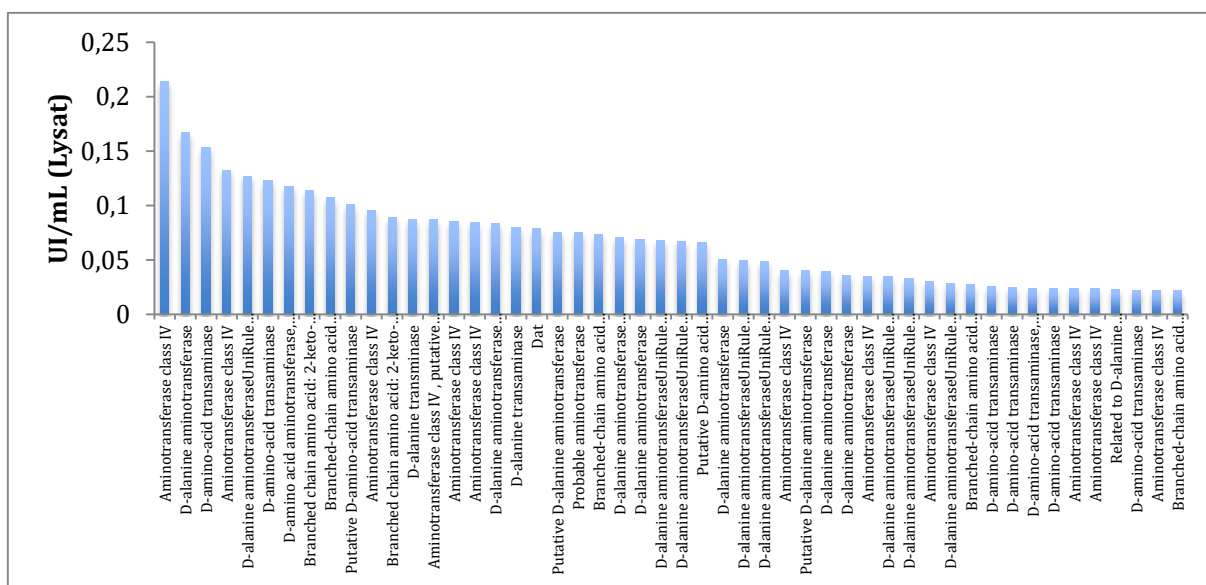
### 5.2.1 Détermination des seuils de validation (SDV)

Le Graphique 38 regroupe l'ensemble des activités mesurées avec les 4 plaques de la banque TAM(C) dans les conditions du test couplé (D-Glu et L-ACS comme donneurs) en absence de substrat accepteur (A<sub>0</sub>).



Graphique 38 : Activités mesurées sans cétoacide pour toutes les enzymes de TAM(C).

Les activités mesurées sont globalement moins élevées que celles mesurées lors du criblage de TAM(A) avec le test direct utilisant le D-ACS. Elles sont cependant du même ordre que celles obtenues pour les D-TA de TAM(A) avec le test direct utilisant le L-ACS. Ces activités confirment l'existence d'une réaction de « désulfination » de l'ACS, catalysée par de nombreuses D- $\alpha$ -TA. Ainsi, 90 % des 50 TA présentant l'activité la plus forte sont annotées D- $\alpha$ -TA dans Uniprot (Graphique 39).



Graphique 39 : Annotations dans Uniprot des 50 TA de TAM(C) présentant la plus forte activité A<sub>0</sub>.

Comme pour la banque TAM(A) nous avons donc décidé d'appliquer un seuil de validation  $SDV = 4 \cdot A_0$  afin d'écarter les faux positifs.

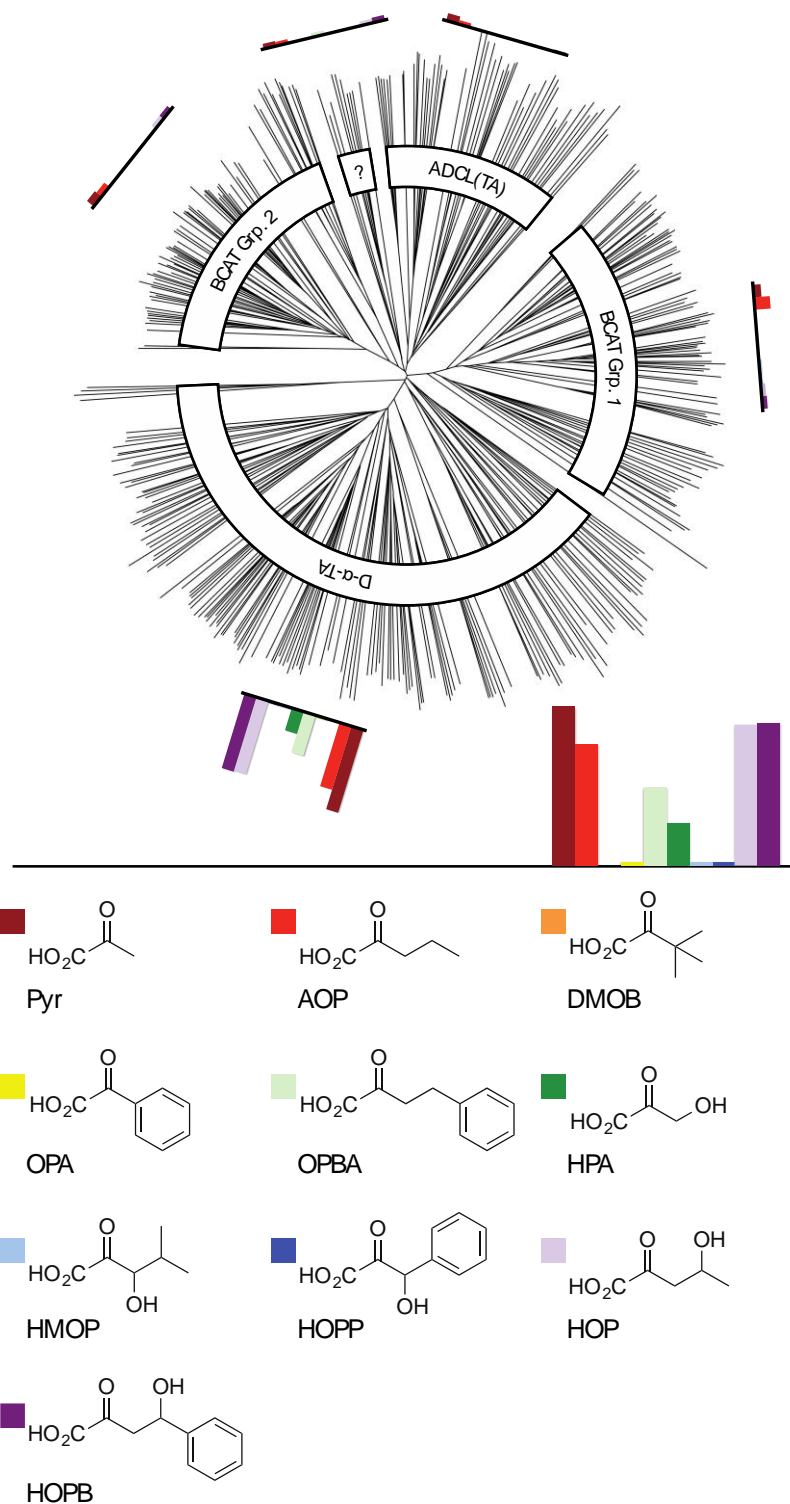
## 5.2.2 Résultats du criblage

Le Tableau 28 et la Figure 43 résument l'ensemble des résultats obtenus lors du criblage de TAM(C) avec le test couplé utilisant le D-Glu comme donneur primaire. On constate, de façon générale, que la très grande majorité des hits est située dans le groupe d'enzymes annotées D- $\alpha$ -TA. Avec cependant quelques hits présentant des activités non négligeables dans d'autres groupes d'enzymes de la Classe IV. Cela pourrait indiquer la présence d'autres TA acceptant le D-Glu en dehors du groupe bien identifié des D- $\alpha$ -TA. Il convient cependant d'être prudent car il est possible que ces activités correspondent en fait à des L- $\alpha$ -TA actives avec le L-ACS que nous utilisons dans la réaction auxiliaire. Il faudra donc attendre les résultats du criblage avec le test direct utilisant le L-ACS avant de confirmer ou d'écarter cette possibilité.

Tableau 28 : Résultats obtenus lors du criblages de la banque TAM(C) en utilisant le test couplé avec le D-Glu.

Cétoacides	SDS (UI/mL de lysat)	Nombre de hits	Activité maximale mesurée (UI/mL de lysat) <sup>a</sup>
Pyr	0,044	108	8,000 <sup>b</sup>
HPA	0,010	22	5,800
AOP	0,018	91	4,587
DMOB	0,018	0	---
OPA	0,016	3	0,281
OPBA	0,076	46	4,136
HMOP	0,013	6	0,186
HOPP	0,014	5	0,240
HOP	0,039	86	3,395
HOPB	0,075	90	8,000 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Les activités mesurées dans le cadre du test couplé sont sous-estimées au dessus de 0,5 UI/mL de lysat à cause de l'utilisation de 20 mUI/puits d'AspTA comme enzyme auxiliaire. <sup>b</sup> Sat. = l'activité ne peut être mesurée précisément car elle dépasse 8 UI/mL de lysat et entraîne la saturation du spectrophotomètre



*ADCL(TA) = Aminodéoxychorismate Lyase (Transaminase).*

Figure 43 : Répartition au sein de TAM(C) des hits obtenus en utilisant le D-Glu et le L-ACS dans le test couplé. Tous les histogrammes sont à la même échelle. La barre la plus importante (Pyr, D- $\alpha$ -TA) représente 81 hits.

Plus d'une centaine de hits ont été obtenus avec le Pyr, dont plus de 80 dans le groupe de TA annotées D- $\alpha$ -TA. On note également la présence de quelques hits annotés BCAT (groupes 1 et 2) dont l'activité dépasse les 1 UI/mL. Compte tenu du spectre de substrats classique des BCAT, qui n'acceptent ni le Pyr, ni le L-ACS, il est peu probable que ces hits correspondent à des L- $\alpha$ -TA. Et si c'est effectivement le cas, de telles enzymes mériteraient toute notre attention compte tenu de leurs propriétés inédites. De façon tout aussi intéressante, plusieurs hits avec de bonnes activités (jusqu'à environ 3 UI/mL) ont été détectés dans le groupe d'enzymes sans annotation précise (« ? »). Ce groupe serait donc peut-être bien composé par des D-TA, qui seraient alors assez différentes de celles du groupe établi des D- $\alpha$ -TA. Nous avons par ailleurs mesuré pour les TA de ce nouveau groupe des valeurs de  $A_0$  très faibles (0,06 UI/mL en moyenne). Ces TA ne présentent donc pas l'activité « désulfinate » communément rencontré dans le groupe des D- $\alpha$ -TA. Compte-tenu de leur position dans l'arbre d'identité, ce groupe sans annotations précises pourrait contenir des (*R*)-amine-TA capables d'accepter le D-Glu. Le criblage prochain de TAM(C) avec une variété de substrats carbonylés et l'étude approfondie de ces hits devrait permettre de vérifier ces hypothèses.

Alors qu'une seule TA acceptant le HPA avait été identifiée dans TAM(A), nous avons détecté une vingtaine de hits dans TAM(C) avec de bonnes activités (maximum de 5,8 U/mL).

Dans le cas des substrats alkylés et aromatiques des groupes 3 et 4, de très nombreux hits avec de bonnes activités ont aussi été obtenus avec l'AOP et l'OPBA précurseurs de norvaline et d'HPhe. Par contre, peu de hits ont été détectés avec l'OPA précurseur de Phénylglycine (maximum de 0,28 UI/mL), et de nouveau aucun avec le cétoacide tert-butylque DMOB.

En ce qui concerne les cétoacides du groupe 5 très peu de hits ont été trouvés avec les cétoacides hydroxylés en position  $\beta$ . De plus, les activités mesurées avec ces derniers sont faibles (maximum de 0,24 UI/mL). Malgré l'élargissement du nombre de candidats en passant de TAM(A) à TAM(C) nous n'avons donc pas pu identifier de D- $\alpha$ -TA efficace pour ce type de dérivés. Dans le cas des substrats  $\gamma$ -hydroxylés, si un grand nombre de hits a pu être mis en exergue pour les deux substrats, nous n'avons pas pu confirmer leur véracité car leur activité pour le pyruvate était systématiquement supérieure. Ceci semble cependant logique dans la mesure où toutes ces enzymes sont annotées D-AlaTA.

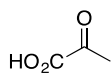
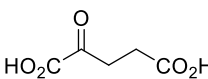
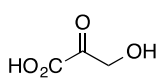



Il sera donc essentiel de confirmer ou d'infirmar ces activités une fois que les meilleurs hits auront été purifiés.

En conclusion, bien que certains substrats n'aient pas conduit à l'identification de TA très actives, le criblage de la banque TAM(C) nous a permis de compléter notre boîte à outil enzymatique. De nombreuses TA potentiellement très intéressantes ont été repérées et seront caractérisées plus avant. Elles devraient offrir un accès à une variété d'acides aminés valorisables de la série D.

### 5.3 Criblage de TAM(D) à la recherche d'Hypotaurotransaminases (HypoTA)

Dans le cadre de cette thèse, nous n'avons pu mener pour l'instant qu'un seul criblage de la banque TAM(D). Nous avons ainsi mis en oeuvre le test direct utilisant l'HPT. Cette première étude avait notamment pour objectif l'identification d'une enzyme auxiliaire bien adaptée pour finir la mise au point du test couplé utilisant l'HPT dans la réaction auxiliaire catalysée par une HypoTA. Afin d'optimiser nos chances de découverte de nouvelles HypoTA, nous avons testé plusieurs substrats accepteurs qui sont présentés dans le Tableau 29.

Tableau 29 : Substrats accepteurs testés lors du criblage de TAM(D) avec le test direct utilisant l'HPT.

Catégorie	abréviation	structure
I et II Cétoacides Substrats communs des TA	Pyr	
	KG	
	HPA	
IV : Précurseurs de donneurs d'amine simple des Amine-TA	Butanal	
	Acétone	
	Acétaldéhyde	

Nous avons ainsi choisi en plus du Pyr, substrat commun des amine-TA, des substrats qui ont montré une bonne activité avec les amine-TA lors de la mise au point



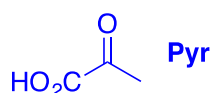
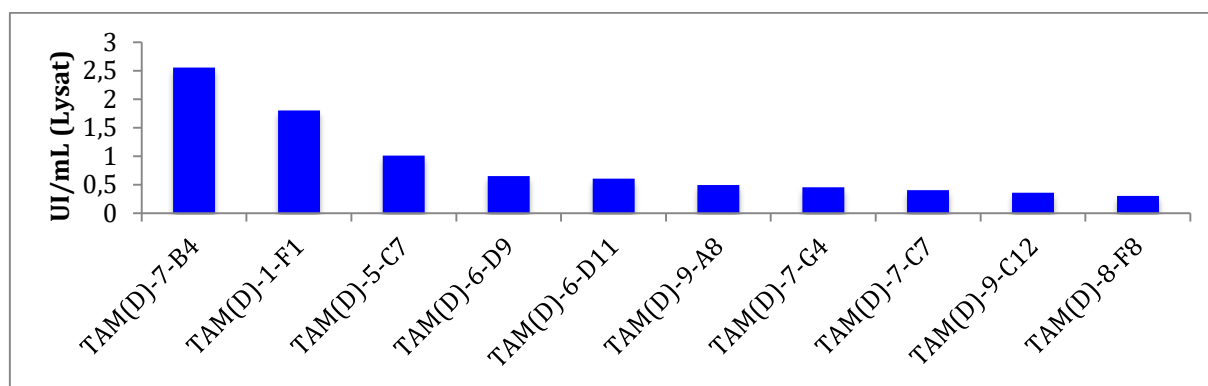
des tests de criblage, comme le butanal, ou qui sont décrits dans la littérature pour être des accepteurs de plusieurs de ces enzymes (KG, HPA, acétone). A cette série, nous avons ajouté l'acétaldéhyde afin d'évaluer les possibilités de déplacement d'équilibre en utilisant l'HPT. En effet, la décomposition de l'acide  $\beta$ -oxosulfonique produit à partir de l'HPT conduit à la formation d'acétaldéhyde. Si ce dernier est un substrat de l'HypoTA utilisée, alors il n'y aura pas de déplacement d'équilibre. Ainsi dans l'optique de la mise au point d'un test couplé pour les amine-TA, un HypoTA inactive avec l'acétaldéhyde offrira un test analogue à celui mis au point pour les  $\alpha$ -TA (avec l'ACS et l'AspTA). Par contre, un HypoTA acceptant l'acétaldéhyde devrait permettre la mise au point d'un test couplé avec amplification (comme celui présenté précédemment utilisant une PyrASTA).

La mesure des activités en absence d'accepteur ( $A_0$ ) a permis de constater qu'aucune TA de la banque TAM(D) ne catalyse la réaction de désulfuration de l'HPT. Dans tous les cas la valeur de SDV calculée s'est révélée inférieure à la valeur du seuil de sélection (SDS). Les résultats obtenus avec les 6 accepteurs sont présentés dans le Tableau 30.

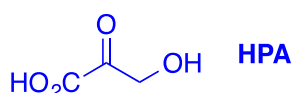
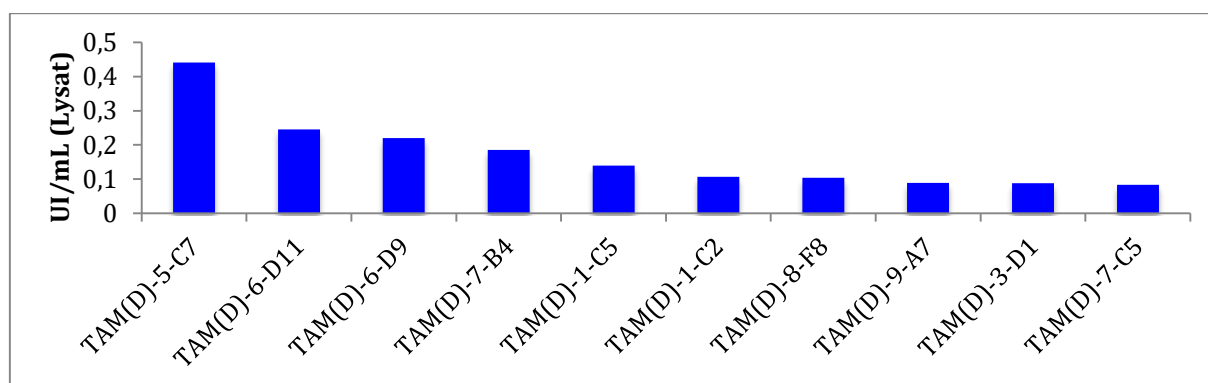
Tableau 30 : Résultats du criblage de la banque TAM(D) avec le test direct utilisant l'HPT.

Cétoacides	SDS (UI/mL de lysat)	Nombre de hits	Activité maximale mesurée (UI/mL de lysat) <sup>a</sup>
Pyr	0,010	65	2,555
KG	0,010	23	0,141
HPA	0,007	35	0,441
Butanal	0,007	18	0,099
Acétone	0,008	3	0,047
Acétaldéhyde	0,008	7	0,040

Plusieurs HypoTA ont pu être identifiées. Les meilleurs hits ont été trouvés avec le Pyr (Graphique 40) avec des activités allant jusqu'à 2,5 UI/mL. Le HPA a également permis d'obtenir plusieurs hits avec des activités plus modestes (Graphique 41). On peut noter que 6 hits sont communs aux listes des 10 meilleurs hits obtenus avec ces 2 substrats.



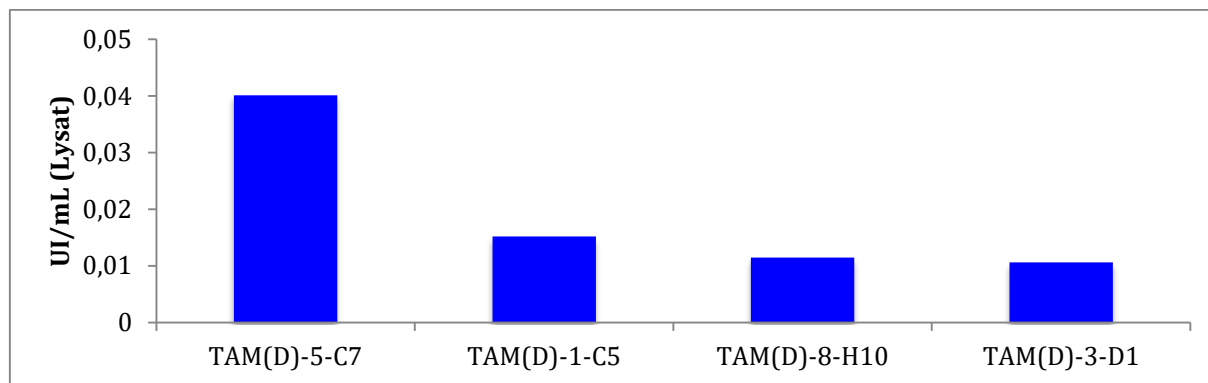
Graphique 40 : Classement des 10 meilleurs hits obtenus avec le test direct utilisant l'HPT et le Pyr.



Graphique 41 : Classement des 10 meilleurs hits obtenus avec le test direct utilisant l'HPT et le HPA.

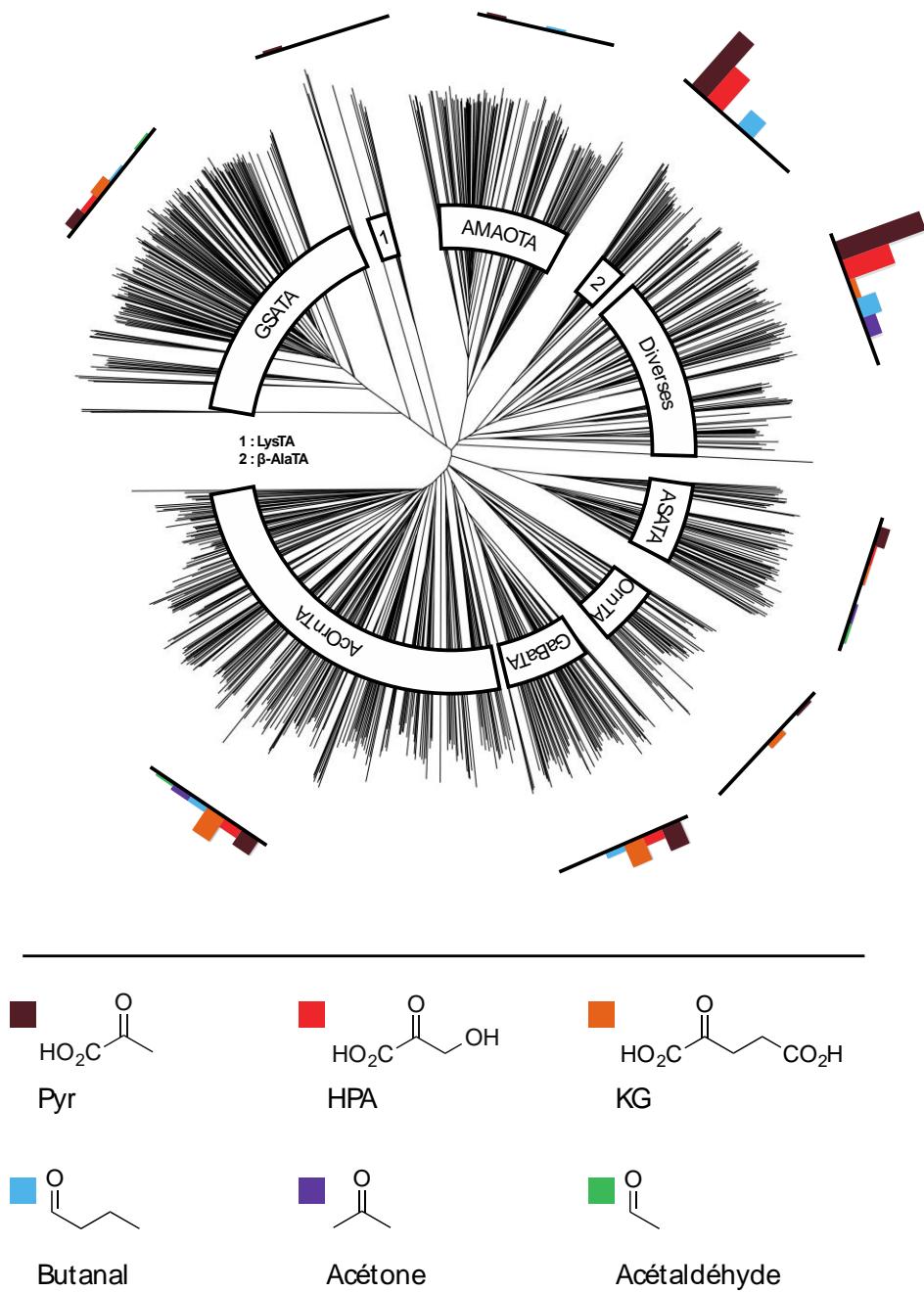
Quelques hits ont aussi été décelés avec le KG et le butanal, mais avec des activités plus faibles, aux alentours de 0,1 UI/mL. Bien que 3 hits aient été détectés avec l'acétone, les activités mesurées restent à la limite du SDS.

Enfin, l'acétaldéhyde a permis de mettre en évidence quatre hits avec de très faibles activités (Graphique 42). Parmi eux 3 font partie de la liste des meilleurs hits identifiés avec Le Pyr ou HPA.



Graphique 42 : Hits obtenus avec l'acétaldéhyde lors du criblage avec le test direct à l'HPT.

La Figure 44 montre que la grande majorité des hits détectés avec les différents accepteurs se trouve dans les groupes d'enzymes annotées  $\beta$ -alanine-TA ou « Diverses ». Ceci paraît tout à fait logique, d'autant plus que les enzymes du groupe « Diverses » qui sont ressorties sont, en grande partie, annotées taurine-TA. Toutes ces enzymes ont par ailleurs un profil d'activité commun, acceptant le Pyr et le HPA principalement, ainsi que le butanal dans une moindre mesure, et regroupent les meilleures activités découvertes.



*GSAlTA = Glutamate-1-semialdéhyde-TA, LysTA = L-Lysine-6-TA, DaPaTA = Diaminopélargonate-TA, β-AlaTA = β-Alanine-TA, ASAlTA = Aspartate-semialdéhyde-TA, OrnTA = Ornithine-TA, GaBaTA = 4-Aminobutyrate-TA, AcOrnTA = Acétylornithine-TA.*

Figure 44 : Répartition au sein de TAM(D) des hits obtenus en utilisant l'HPT dans le test direct. Tous les histogrammes sont à la même échelle. La barre la plus importante (Pyr, Diverses) représente 25 hits.

Ce qui apparaît, en revanche, plus étonnant c'est l'existence de quelques hits parmi les GaBaTA et AcOrnTA. Bien que les activités soient généralement beaucoup plus faibles (0,14 UI/mL au maximum), leur spectre de substrats est suffisamment particulier pour être souligné. Elles acceptent en effet, en plus du Pyr, le KG, avec des activités équivalentes pour ces deux substrats ce qui reste assez inédit chez les amine-TA.

Nous disposons donc à présent de plusieurs HypoTA qui devraient permettre de catalyser des réactions de transamination irréversibles avec des substrats diverses et qui pourront par conséquent être utilisées pour l'optimisation des tests couplés pour les amine-TA.

## **6 Caractérisation des hits et premières applications**

A la suite des criblages de la banque TAM(A), nous avons commencé à étudier une partie des TA nouvellement découvertes. Nous avons ainsi sélectionné 24 hits détectés avec les différents substrats utilisés dans les tests direct et couplé. Un ensemble de 19 hits ont été sélectionnés en vue de diverses applications synthétiques tandis que 5 hits correspondant à des PyrASTA ont été choisis pour identifier le meilleur candidat pour le développement d'un test couplé pour les amine-TA. Les Tableau 31, Tableau 32 et Tableau 33 rassemblent les activités des 24 hits sélectionnés, leurs annotations dans Uniprot ainsi que les concentrations protéiques mesurées dans le lysat. Ces concentrations correspondent aux protéines totales du lysat et ne sont donc pas forcément représentatives de la concentration de la TA surexprimée.

Tableau 31 : Activités (UI/mL de Lysat) des 24 hits sélectionnés, mesurées avec le test direct utilisant le L-ACS.

	Référence	Annotation UniProt	Classe	Bradford (mg/mL)	Pyr	AOP	AOH	DMOB	OPA	OPBA	HPA	HOBA	HMOP	HOPP	HOP	HOPB	KG	A0	
					Activité (UI/mL)														
Hits sélectionnés pour la synthèse	A3D9	AT	I/II (BCAT)	2,926	0,05	0,05	0,05		0,05			0,05	0,04		0,06		0,80	0,01	
	A4D9	TranscripRegul.	I/II (BCAT)	4,967	0,02		0,02							0,02				1,84	0,00
	A4E1	TranscripRegul.	I/II (BCAT)	1,52	0,05	0,05	0,04		0,04					0,05		0,04		1,39	0,01
	A4G4	Class I & II	I/II	3,786	0,03												0,21	8,00	0,01
	A3E7	Asp/Tyr/AroTA	I/II	2,898	0,03										0,02	0,21	8,00	0,01	
	A4E11	HisPTA	I/II	3,885	0,32	0,22	0,30	0,01		0,06	0,01	0,01	0,01		0,10	0,22	2,85	0,00	
	A5A12	Phe-AlaTA	I/II	4,332	0,10	0,05	0,06			0,03		0,03	0,03		0,05	0,06	2,22	0,01	
	A5D8	HisPTA	I/II	4,81	0,40	0,26	0,32			0,07					0,11	0,18	2,11	0,01	
	A5G1	HisPTA	I/II	4,067	0,24	0,15	0,16			0,03				0,21	0,09	0,11	2,05	0,01	
	A2E6	BCAT	IV	3,105														0,73	0,01
	A2E8	BCAT	IV	5,659														1,22	0,01
	A3G3	BCAT	IV	2,556														0,51	0,01
	A5D2	BCAT	IV	5,908	0,01		0,01	0,01		0,01				0,01	0,01	0,01	0,01	1,47	0,00
	A5E7	BCAT	IV	5,232	0,02									0,02				1,50	0,00
	A1F2	D-AlaTA	IV	1,889														0,41	0,02
	A3B9	D-AlaTA	IV	2,323														0,42	0,03
A2E10	Class V	V	2,879	0,58	0,04					1,39				0,12	0,81	4,70	0,01		
A3C9	Serine-GlyoxTA	V	2,393	0,19	0,05					0,60	0,05			0,06	0,42	2,54	0,00		
A3C11	Serine-GlyoxTA	V	1,471	0,04						0,05	0,05			0,05	0,29	1,23	0,00		
PyrASTA	A4E3	PSerTA	V	4,214	0,60									0,07	0,28	2,22	0,01		
	A5F2	Class V	V	4,244	0,57	0,05	0,03			0,04	0,05	0,03		0,08	0,38	8,00	0,01		
	A5A7	Class V	V	8,368	1,13	0,08				0,05	0,27	0,03		0,10	0,42	8,00	0,01		
	A4A10	SolHydrogenase	V	4,456	0,93	0,43	0,06			0,42	0,35	0,13		0,24	0,74	8,00	0,01		
	A4C2	Serine-GlyoxTA	V	4,69	0,78	0,07				0,07	2,06	0,05		0,10	0,43	8,00	0,01		

Tableau 32 : Activités (UI/mL de Lysat) des 24 hits sélectionnés, mesurées avec le test couplé utilisant le L-Glu.

	Référence	Annotation UniProt	Classe	Bradford (mg/mL)	Pyr	AOP	AOH	DMOB	OPA	OPBA	HPA	HOBA	HMOP	HOPP	HOP	HOPB	KG	A0
					Activité (UI/mL)													
Hits sélectionnés pour la synthèse	A3D9	AT	I/II (BCAT)	2,926	1,09	5,52	5,74		4,53	2,17		0,76	2,07	0,07	2,00	0,49	---	0,01
	A4D9	TranscripRegul.	I/II (BCAT)	4,967	0,11	4,67	5,07		0,21	0,06			1,05		0,04	0,04	---	0,01
	A4E1	TranscripRegul.	I/II (BCAT)	1,52	0,20	8,00	8,00		4,00	0,33	0,09	0,08	2,49	0,05	1,04	0,14	---	0,01
	A4G4	Class I & II	I/II	3,786	0,08		0,07			0,06					0,04	0,22	---	0,01
	A3E7	Asp/Tyr/AroTA	I/II	2,898	0,09		0,06			0,05						0,22	---	0,01
	A4E11	HisPTA	I/II	3,885	0,26	0,28	0,97			0,65				0,33	0,08	1,68	---	0,01
	A5A12	Phe-AlaTA	I/II	4,332	0,50	0,40	1,28			2,64		0,04		0,33	0,18	2,37	---	0,01
	A5D8	HisPTA	I/II	4,81	0,28	0,33	1,61			0,79				0,39	0,06	1,52	---	0,01
	A5G1	HisPTA	I/II	4,067	0,29	0,47	2,10			0,72				0,34	0,08	1,51	---	0,01
	A2E6	BCAT	IV	3,105	0,18	3,73	0,77		2,54	0,32		0,29	0,45	0,33	1,33	0,30	---	0,01
	A2E8	BCAT	IV	5,659	0,07	3,76	3,46	0,07	2,17	0,82		0,09	1,00	0,17	0,21	0,13	---	0,01
	A3G3	BCAT	IV	2,556	0,07	1,79	1,60		0,98	0,13		0,06	0,56	0,10	0,46	0,09	---	0,01
	A5D2	BCAT	IV	5,908	0,12	0,50	0,22	0,04	0,50	0,25		0,28	0,49	0,22	0,61	0,13	---	0,01
	A5E7	BCAT	IV	5,232	0,15	2,80	3,15		2,17	0,70		0,07	1,04	0,20	0,30	0,29	---	0,01
	A1F2	D-AlaTA	IV	1,889													---	0,05
	A3B9	D-AlaTA	IV	2,323	0,27												---	0,06
A2E10	Class V	V	2,879	0,63		0,10			0,07	1,50				0,13	0,63	---	0,02	
A3C9	Serine-GlyoxTA	V	2,393	0,24	0,07	0,07			0,06	0,93	0,04			0,10	0,51	---	0,01	
A3C11	Serine-GlyoxTA	V	1,471	0,08		0,05			0,05	0,10	0,04			0,07	0,31	---	0,01	
PyrASTA	A4E3	PSerTA	V	4,214	0,98		0,07		0,07	0,07				0,11	0,37	---	0,01	
	A5F2	Class V	V	4,244	0,31	0,06	0,07			0,08	0,06			0,11	0,56	---	0,01	
	A5A7	Class V	V	8,368	0,62	0,10	0,07			0,10	0,36			0,14	0,61	---	0,01	
	A4A10	SolHydrogenase	V	4,456	0,93	0,53	0,12			0,55	0,59	0,14		0,28	0,74	---	0,01	
	A4C2	Serine-GlyoxTA	V	4,69	0,67	0,09	0,07			0,12	2,24	0,05		0,11	0,45	---	0,01	

Tableau 33 : Activités (UI/mL de Lysat) des 24 hits sélectionnés, mesurées avec le test direct utilisant le D-ACS.

	Référence	Annotation UniProt	Classe	Bradford (mg/mL)	Pyr	AOP	AOH	DMOB	OPA	OPBA	HPA	HOBA	HMOP	HOPP	HOP	HOPB	KG	A0	
					Activité (UI/mL)														
Hits sélectionnés pour la synthèse	A3D9	AT	I/II (BCAT)	2,926														0,00	
	A4D9	TranscripRegul.	I/II (BCAT)	4,967														0,00	
	A4E1	TranscripRegul.	I/II (BCAT)	1,52														0,01	
	A4G4	Class I & II	I/II	3,786	0,03													0,02	0,00
	A3E7	Asp/Tyr/AroTA	I/II	2,898															0,01
	A4E11	HisPTA	I/II	3,885															0,00
	A5A12	Phe-AlaTA	I/II	4,332															0,00
	A5D8	HisPTA	I/II	4,81															0,00
	A5G1	HisPTA	I/II	4,067															0,01
	A2E6	BCAT	IV	3,105															0,00
	A2E8	BCAT	IV	5,659															0,00
	A3G3	BCAT	IV	2,556															0,00
	A5D2	BCAT	IV	5,908															0,00
	A5E7	BCAT	IV	5,232															0,00
	A1F2	D-AlaTA	IV	1,889	1,82	2,09	1,58			1,33		2,00			1,95	2,40	1,40		0,29
	A3B9	D-AlaTA	IV	2,323	3,89	5,08	4,94		1,06	4,91	2,55	3,50			4,92	4,85	2,83		0,19
	A2E10	Class V	V	2,879															0,01
	A3C9	Serine-GlyoxTA	V	2,393															0,00
A3C11	Serine-GlyoxTA	V	1,471															0,00	
PyrASTA	A4E3	PSerTA	V	4,214														0,01	
	A5F2	Class V	V	4,244														0,01	
	A5A7	Class V	V	8,368														0,00	
	A4A10	SolHydrogenase	V	4,456														0,00	
	A4C2	Serine-GlyoxTA	V	4,69	0,01													0,01	0,00

Ces 24 hits ont été reclés dans les laboratoires du génoscope en ajoutant un Tag 6-His, de préférence à l'extrémité N-terminale, afin de permettre leur purification par chromatographie d'affinité métallique (IMAC = Immobilized Metal Affinity Chromatography). Ces enzymes taguées ont ensuite été à nouveau surexprimées, puis purifiées afin de pouvoir étudier leurs propriétés de façon rigoureuse.

## 6.1 Etude du spectre de substrats des hits

Ce travail expérimental a été en partie effectué par Thomas Talbot dans le cadre de son stage de master de 2<sup>ème</sup> année.

### 6.1.1 Confirmation des activités vis-à-vis des substrats accepteurs

Nous avons commencé par mesurer de nouveau l'activité des 24 hits, afin d'une part de confirmer les résultats du criblage, et d'autre part de nous assurer que l'addition du tag 6-His ne perturbe pas de façon drastique l'activité des TA sélectionnées. Pour cela nous avons utilisé les tests directs utilisant le L- ou D-ACS et les tests couplés utilisant le L- ou D-Glu. Travaillant avec des enzymes purifiées, nous n'avons pas appliqué dans ce cas de seuil de sélection. Par contre, nous avons mesuré la valeur A<sub>0</sub> en absence d'accepteur afin de mettre en évidence une éventuelle activité de désulfination de l'ACS.



Pour faciliter la lecture, les activités inférieures à 0,05 UI/mL ne sont pas mentionnées (Tableau 34 et Tableau 35).

L'analyse des données montre que seule la TA A2E10 ne présente aucune activité quels que soient les substrats testés. Avec des activités proches de 1,5 UI/mL mesurées lors des criblages, il est fort peu probable qu'il s'agisse d'un faux positif. Cette enzyme n'a donc sûrement pas supporté l'addition du Tag. On peut aussi envisager un problème lié à la conservation des enzymes purifiées. En effet ces expériences ont été menées avec des enzymes qui ont été systématiquement congelées après la purification par IMAC. De plus, elles ont été conservées en présence d'une forte concentration d'imidazole utilisé pour décrocher l'enzyme du support chromatographique. Des expériences complémentaires sont donc nécessaires avant de conclure sur l'impact de l'addition du Tag sur l'activité des hits.

Tableau 34 : Activités des 24 hits tagués et purifiés mesurées avec les tests directs (L- ou D-ACS).

Référence	Annotation UniProt	Classe	Bradford (mg/mL)	Activités (UI/mL)																	
				Glyox	Pyr	AOP	AOH	MTOB	MOPA	DMOB	OPA	OPBA	HPA	HOBA	HMOP	HOPP	HOP	HOPB	2KOGA	DMOP	KG
A3D9	AT	I/II (BCAT)	2,6		0,10	0,09	0,09	0,11	0,07		0,10	0,06		0,11		0,09				0,12	0,02
A4D9	TranscripRegul.	I/II (BCAT)	0,5	0,08										0,08							0,00
A4E1	TranscripRegul.	I/II (BCAT)	3,1																		0,07
A4G4	Class I & II	I/II	1,6		0,33												0,60			16,12	0,00
A3E7	Asp/Tyr/AroTA	I/II	0,8		0,20			0,06				0,06				0,05	0,45			11,48	0,00
A4E11	HisPTA	I/II	4,1	0,22	0,53	0,52	0,78	0,76	0,24			0,73			0,60	0,19				0,77	0,15
A5A12	Phe-AlaTA	I/II	2,1	0,06	0,14	0,05	0,06	0,07	0,05					0,06	0,05	0,05	0,09			0,06	0,00
A5D8	HisPTA	I/II	1,2	0,19	0,39	0,42	0,89	0,85	0,18			0,77	0,08		0,51	0,16				0,91	0,01
A5G1	HisPTA	I/II	2,7	0,22	0,44	0,53	0,53	0,51	0,34			0,26			0,44	0,23	0,24			0,47	0,02
A2E6	BCAT	IV	0,9																		0,01
A2E8	BCAT	IV	1,1	0,05						0,08	0,08	0,05	0,07			0,05			0,05	0,12	0,04
A3G3	BCAT	IV	0,7	0,06	0,08					0,07	0,07		0,09			0,08					0,00
A5D2	BCAT	IV	0,7																		0,08
A5E7	BCAT	IV	1,0	0,10										0,09		0,15			0,14	0,11	0,00
A1F2	D-AlaTA	IV	1,0	0,79	0,72	0,74	0,52	0,63	0,36			0,64	0,28	0,49	0,11	0,62	0,56			2,70	0,08
A3B9	D-AlaTA	IV	2,7	1,38	2,11	1,77	1,84	1,57	1,49		0,18	2,37	0,43	1,14	0,71	1,87	1,81			3,79	0,14
A2E10	Class V	V	2,0																		0,01
A3C9	Serine-GlyoxTA	V	3,3	2,95	0,61	0,20		0,11					2,97	0,14		0,16	1,23			3,55	0,01
A3C11	Serine-GlyoxTA	V	1,2	0,39	0,15								1,20	0,15		0,14	0,44			2,44	0,00
A4E3	PSerTA	V	2,7	1,13	0,89			0,09				0,06			0,11	0,51				1,68	0,02
A5F2	Class V	V	1,7	0,31	0,23			0,06							0,07	0,58				3,46	0,00
A5A7	Class V	V	1,5	0,49	0,29			0,05							0,11	0,35				1,08	0,04
A4A10	SolHydrogenase	V	1,2	2,67	1,02	0,60		0,24				0,86	0,45	0,14		0,32	1,05			4,48	0,01
A4C2	Serine-GlyoxTA	V	1,1	1,34	0,27								0,18	0,14			0,11			3,87	0,00







## 6.1.2 Activités vis-à-vis des aminoacides canoniques

Afin de compléter les spectres de substrats des hits de type L- $\alpha$ -TA, nous avons mesuré leurs activités en présence de KG et des divers aminoacides protéinogènes (à l'exception de Glu et de Pro). Nous avons pour cela mis en oeuvre le test utilisant la GluDH comme enzyme auxiliaire associée au couple diaphorase-résazurine pour la régénération du NAD<sup>+</sup> (Schéma 83). Les activités spécifiques mesurées sont résumées dans le Tableau 38. L'activité témoin en l'absence de donneur est également reportée.

Tableau 38 : Activités spécifiques (UI/mg) des hits mesurés avec le test GluDH/NAD<sup>+</sup> avec les aminoacides protéinogènes.

Référence	Annotation UniProt	Classe	Bradford (mg/mL)	Activité (UI/mg)																	A0'		
				L-Gly	L-Ala	L-Val	L-Leu	L-Ile	L-Met	L-Phe	L-Tyr	L-Trp	L-Cys	L-Ser	L-Thr	L-Aen	L-Gln	L-Lys	L-Arg	L-His		L-Asp	
A3D9	AT	I/II (BCAT)	2,6		1,82	8,82	7,97	8,30	7,85	6,69			0,12	3,96		0,28	0,13	0,09		0,04		0,14	< 0,04
A4D9	TranscripRegul.	I/II (BCAT)	0,5	0,22	1,15	6,39		3,40	6,32	7,30			0,24	2,27		0,27		0,43		0,32	0,29	0,31	< 0,2
A4E1	TranscripRegul.	I/II (BCAT)	3,1	0,05	2,29	23,40	0,06	7,14	22,47	31,02	0,11	0,60	0,51	0,06	0,55	0,26	0,39	0,15	0,45	0,32	0,14	0,14	< 0,03
A4G4	Class I & II	I/II	1,6		0,07		0,07	0,07					0,06				0,10	0,09				9,97	< 0,06
A3E7	Asp/Tyr/AroTA	I/II	0,8		0,13																	13,09	< 0,13
A4E11	HisPTA	I/II	4,1		0,08		0,11		2,84	16,06	0,33	0,36					0,05				3,65	0,05	< 0,02
A5A12	Phe-AlaTA	I/II	2,1				0,18		0,71	10,80	0,33	0,54									0,27	0,08	< 0,05
A5D8	HisPTA	I/II	1,2		0,34	0,10	0,43		14,05	13,87	0,85	0,58					0,15				9,18	0,09	< 0,08
A5G1	HisPTA	I/II	2,7		0,15		0,19		6,25	6,16	0,38	0,26					0,07				4,08	0,04	< 0,04
A2E6	BCAT	IV	0,9			1,97	2,93	2,09	1,49	0,25	0,12					0,27							< 0,11
A2E8	BCAT	IV	1,1			4,19	6,14	4,41	1,82	2,30	0,12	0,14				0,28							< 0,09
A3G3	BCAT	IV	0,7	0,25		11,63	3,06	3,00	1,72												0,16		< 0,14
A5D2	BCAT	IV	0,7			0,63	0,43	0,47	0,17														< 0,14
A5E7	BCAT	IV	1,0	0,13		1,94	1,87	1,87	1,02	0,15						0,21							< 0,1
A1F2	D-AlaTA	IV	1,0																				---
A3B9	D-AlaTA	IV	2,7																				---
A2E10	Class V	V	2,0																				< 0,05
A3C9	Serine-GlyoxTA	V	3,3		0,32					0,09		0,06		0,57	0,37						0,04	1,88	< 0,03
A3C11	Serine-GlyoxTA	V	1,2											0,33	0,10							0,86	< 0,08
A4E3	PSerTA	V	2,7		0,70					0,04			0,13	0,07	0,04							0,18	< 0,04
A5F2	Class V	V	1,7		0,08								0,13									0,74	< 0,06
A5A7	Class V	V	1,5		0,24									0,08								0,74	< 0,07
A4A10	SoiHydrogenase	V	1,2		0,79				0,22		0,24	0,39	0,15	0,19	0,19							2,88	< 0,08
A4C2	Serine-GlyoxTA	V	1,1		1,78			0,14	0,19		0,19	0,26	1,23	2,18	0,20					0,35	7,16	< 0,09	

A0' = activité sans aminoacide.

De manière générale, les spectres de substrats donneurs sont cohérents avec les spectres de substrats accepteurs établis précédemment et avec les annotations de nos hits dans UniProt. Bien entendu, ce test étant basé sur l'utilisation du KG comme accepteur, on peut considérer que tous les hits acceptent le Glu. De plus, à l'exception des BCAT de Classe IV, toutes les enzymes ont montré une activité avec l'Asp, même si celle-ci est parfois très modeste (cas des hits annotés HisPTA), et tous sauf 1 sont actifs avec Ala. Les BCAT de Classe IV ont une nette préférence pour les aminoacides hydrophobes, tandis que les 3 « BCAT de Classe I/II » sont en fait actives avec quasiment tous les aminoacides. C'est notamment le cas de la TA A4E1 qui est le seul hit ayant montré une activité non négligeable avec la Lys. Les HisPTA acceptent plutôt, en plus de la Met, les aminoacides aromatiques (Phe, Tyr, Trp, His) ainsi que la Leu. Cette dernière propriété est un peu surprenante, vu que ces TA n'ont pas montré d'activité pour les

autres aminoacides hydrophobes branchés (Val et Ile). Les hits de Classe V présentent un spectre de substrat plus hétérocyte, acceptant à la fois des aminoacides à chaîne courte et polaire (Ala, Ser, Cys, Asn, Asp) mais aussi des substrats aromatiques (Phe, Trp, His). Les 2 enzymes annotées dans le groupe des AspTA (A4G4 et A3E7) sont bel et bien très sélectives. Les rapports entre l'activité mesurée avec Asp et avec tous les autres aminoacides n'excède pas 1 %. On peut enfin constater que la glycine apparaît comme un mauvais substrat donneur pour la plupart des Hits et ce même pour les TA de Classe V ayant montré une bonne activité avec le couple Glyox-L-ACS dans le test direct (tableau 32).

En vue des applications synthétiques, le très large spectre des BCAT de Classe I apparaît particulièrement prometteur pour accéder à une variété d'acides aminés rares et non naturels analogues des aminoacides protéinogènes. L'activité pour la Lys de la TA A4E1 permet en outre d'envisager un déplacement d'équilibre via la cyclisation du cétoacide formé à partir de Lys. De plus, comme nous le verrons dans la suite, l'activité vis-à-vis de la Gln permet d'envisager le même type de déplacement d'équilibre.

## 6.2 Etude de la PyrASTA A4A10 pour la mise au point du test couplé pour les amine-TA

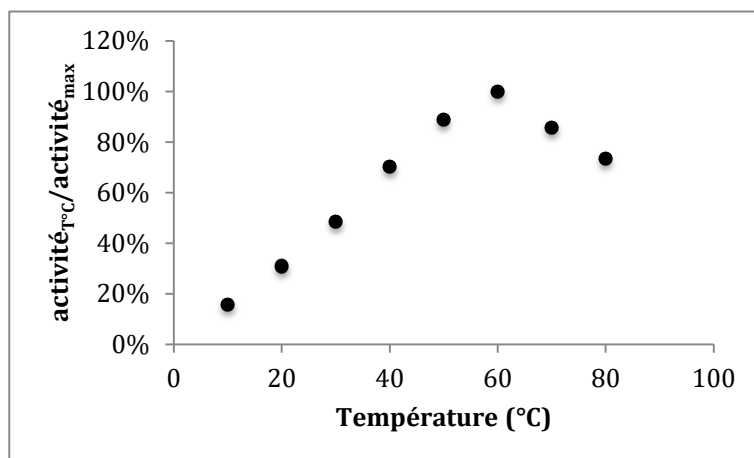
Parmi les 5 hits sélectionnés pour leur activité PyrASTA (Pyr + L-ACS), la TA A4A10 a montré la meilleure activité avec le test direct utilisant Pyr et L-ACS. C'est donc cette enzyme que nous avons initialement choisie pour une étude approfondie en vue de la mise au point du test couplé pour les amine-TA. La première étape de cette étude a consisté à déterminer les paramètres cinétiques pour le Pyr et le L-ACS. Nous avons pour cela fait varier la concentration des 2 substrats pour accéder aux paramètres cinétiques réels de la réaction (Tableau 39).

Tableau 39 : Paramètres cinétiques de la TA A4A10 pour la réaction entre Pyr et L-ACS.

$K_{m_{ACS}}$ (mM)	$K_{m_{Pyr}}$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	Activité Spécifique (UI/mg)
7,1 ± 1,0	0,6 ± 0,1	4,5.10 <sup>-3</sup> ± 0,8 .10 <sup>-3</sup>	11,1 ± 2,0

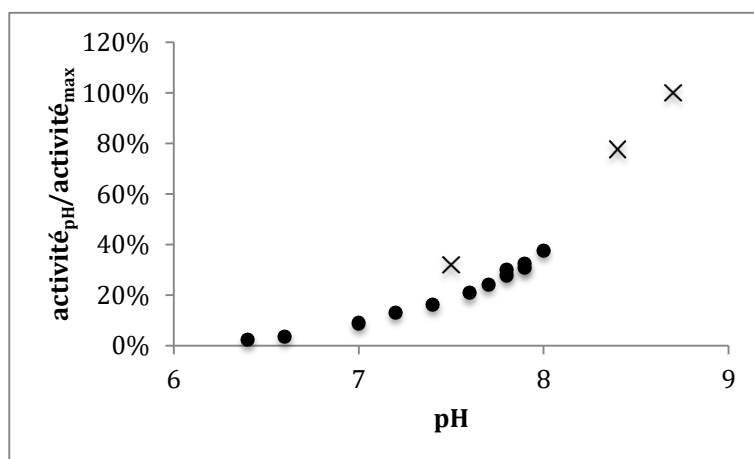
Nous avons ensuite étudié la thermoactivité et la thermostabilité de cette enzyme pour vérifier sa stabilité à 30 °C durant toute la durée du test (Graphique 43). L'activité maximale a été mesurée à 60 °C. De plus, aucune perte d'activité n'a été constatée

pendant 8 h d'incubation à 30 ou à 60°C. On peut donc considérer la TA A4A10 comme une enzyme thermo-résistante.



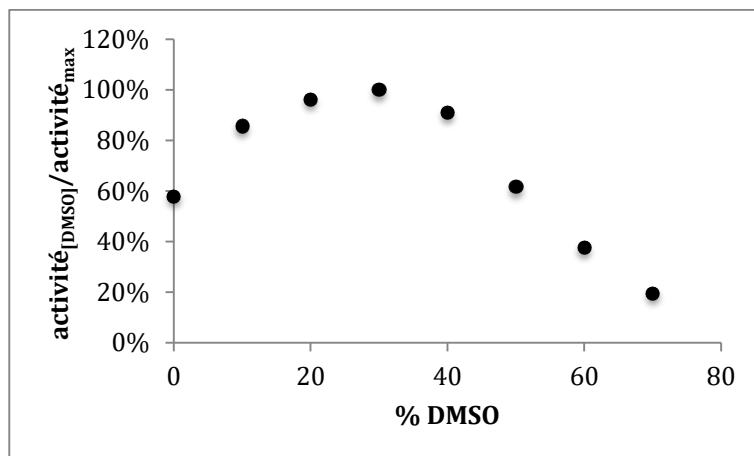
Graphique 43 : Profil d'activité de la A4A10 en fonction de la température.

Nous avons par ailleurs étudié l'influence du pH sur l'activité de la TA A4A10 (Graphique 44). Nous avons pour cela utilisé le test direct utilisant le DTNB, après avoir vérifié que le DTNB en présence d'ACS et en absence d'enzyme était stable jusqu'à pH = 9. Nous avons ainsi pu constater une préférence pour les pH alcalins.



Graphique 44 : Influence du pH sur l'activité de la TA A4A10 avec le tampon phosphate (●) et Tris (x).

Enfin, la tolérance de cette enzyme au DMSO a aussi été évaluée, afin de connaître la concentration maximale de solvant utilisable pour la dissolution des accepteurs hydrophobes (Graphique 45).



Graphique 45 : Influence du pourcentage volumique de DMSO sur l'activité de la TA A4A10.

Après avoir vérifié que la présence de DMSO n'impactait pas le dosage des sulfites par le DTNB, nous avons pu constater, de façon surprenante que l'activité de la TA A4A10 augmente jusqu'à 30 % de DMSO. De plus, pour chaque concentration en DMSO, une vitesse constante a été mesurée sur un période de 30 min montrant qu'il n'y a pas d'inhibition lente de l'enzyme due au solvant. Cette enzyme est donc apparue parfaitement adaptée pour la mise au point du test couplé destiné à la découverte d'amine-TA.

### 6.3 Etude de l'activité désulfinase de la D- $\alpha$ -TA A3B9

Nous avons mené une série d'expériences dans le but de mieux comprendre l'origine du bruit de fond très important observé avec le test direct pour plusieurs D- $\alpha$ -TA en absence d'accepteur ( $A_0$ ). Ces expériences ont été menées avec la TA A3B9 purifiée, que nous avons donc mise en présence de L- ou D-ACS (20 mM), de PLP (50  $\mu$ M) et en absence d'accepteur. Nous avons alors effectué un suivi par RMN  $^1\text{H}$  de l'évolution de la composition du milieu réactionnel (Figure 45 et Figure 46).

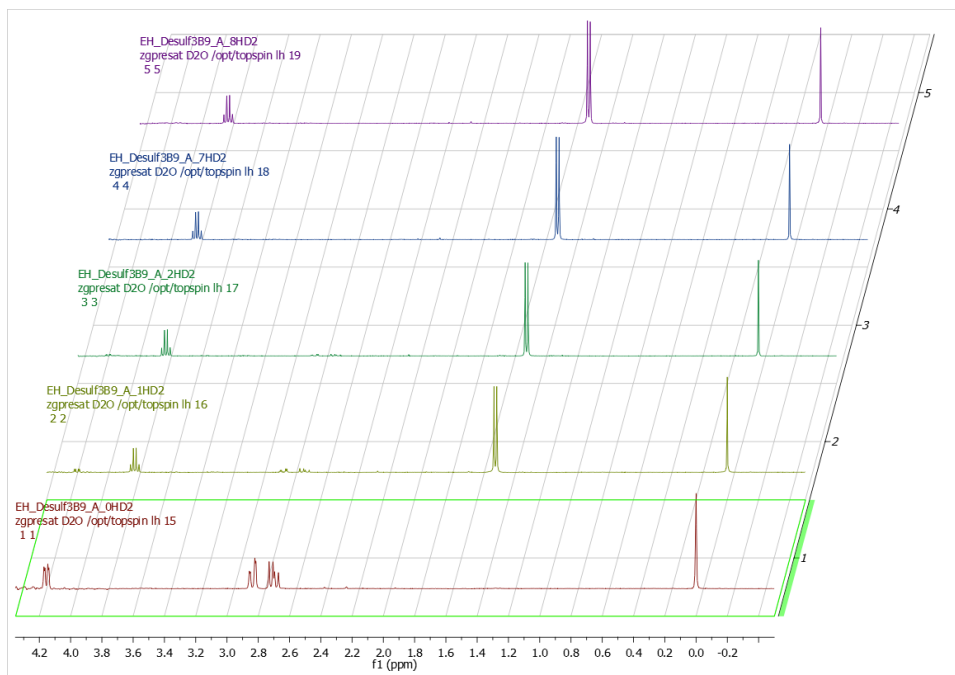


Figure 45 : Suivi RMN<sup>1</sup>H de la conversion du D-CSA en Ala catalysée par la TA A3B9 après 0 (1), 1 (2), 2 (3), 7 (4) et 8 h (5) de réaction. (ACS :  $\delta$  2,80 (2H, m),  $\delta$  4,19 (1H, dd) ; Ala :  $\delta$  1,56 (3H, d),  $\delta$  3,83 (1H, q)).

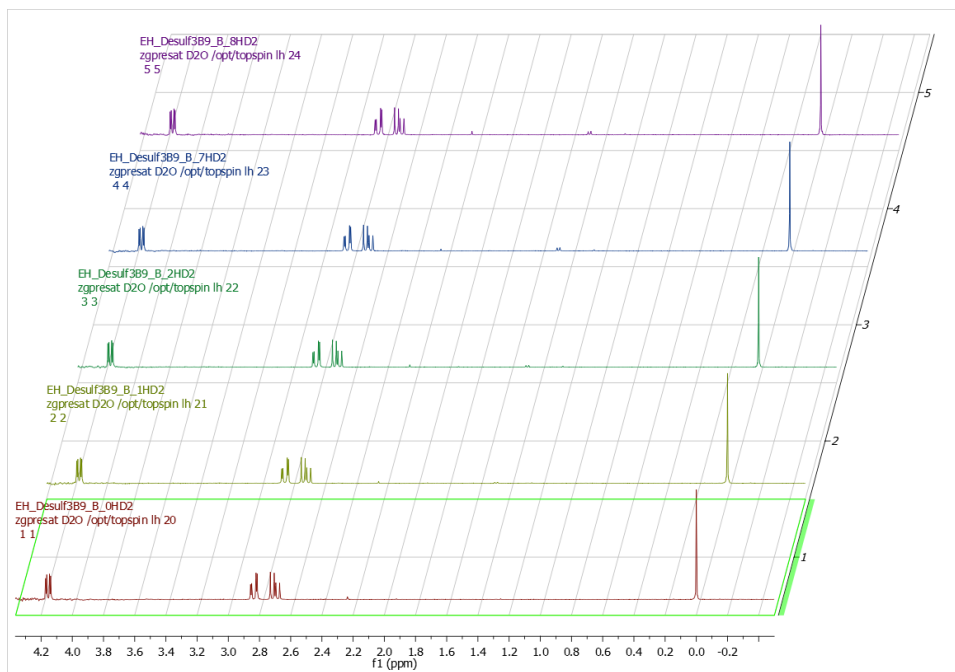
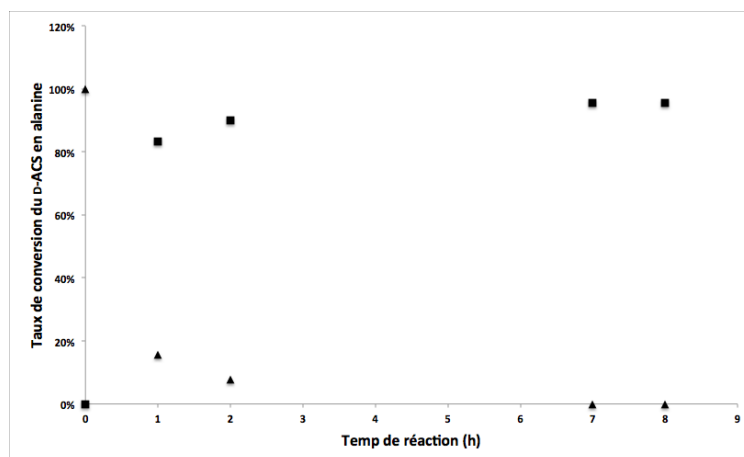
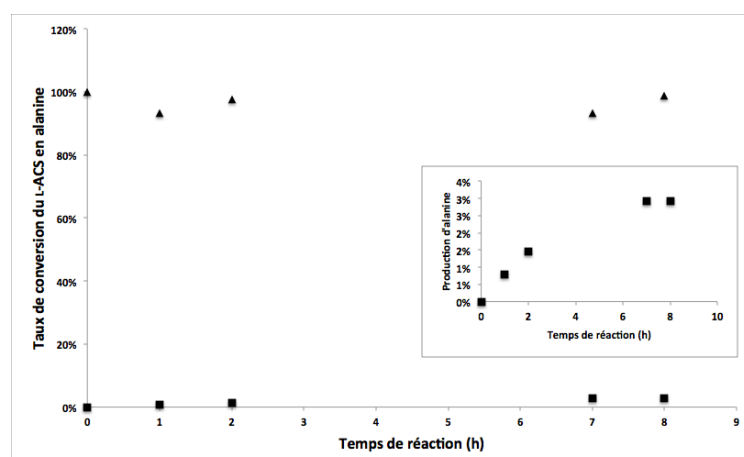


Figure 46 : Suivi RMN<sup>1</sup>H de la conversion du L-CSA en Ala catalysée par la TA A3B9 après 0 (1), 1 (2), 2 (3), 7 (4) et 8 h (5) de réaction. (ACS :  $\delta$  2,80 (2H, m),  $\delta$  4,19 (1H, dd) ; Ala :  $\delta$  1,56 (3H, d),  $\delta$  3,83 (1H, q)).

Cette analyse a permis de montrer que l'ACS est exclusivement converti en Ala et que cette conversion est beaucoup plus rapide dans le cas du D-ACS. Le Graphique 46 et le Graphique 47 ci-dessous représentent, respectivement les taux de conversions du D-ACS et du L-ACS en Ala mesuré au cours du temps.



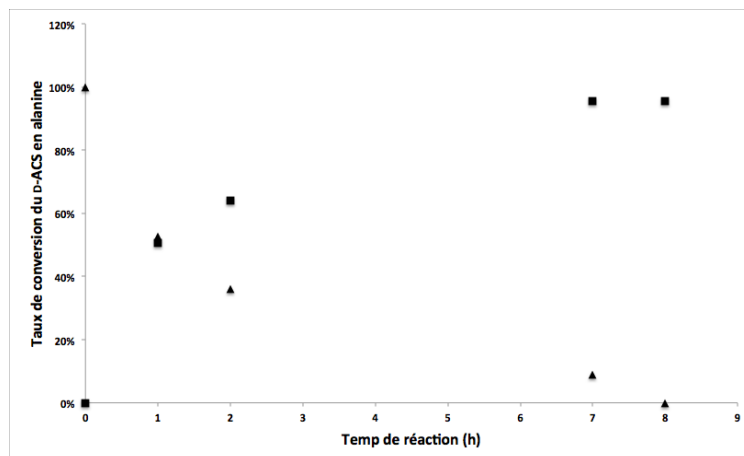
Graphique 46 : Conversion du D-ACS (▲) en Ala (■) catalysée par la TA A3B9 avec PLP 50 µM.



Graphique 47 : Conversion du L-ACS (▲) en Ala (■) catalysée par la TA A3B9 avec PLP 50 µM.

IL s'agit donc bien d'une réaction de désulfination énantiosélective de l'ACS avec un rapport de vitesse supérieur à 100 entre les 2 énantiomères. Nous avons par ailleurs remarqué, que cette activité désulfinase était fortement réduite en absence de cofacteur ajouté (Graphique 48).





Graphique 48 : Conversion du D-ACS (▲) en Ala (■) catalysée par la TA A3B9 sans addition de PLP.

Cette réaction de désulfuration peut résulter de 2 demi-réactions de transamination (Schéma 119). Ainsi la réaction entre le PLP présent dans le site actif et l'ACS conduit à la production de Pyr, de SO<sub>2</sub> et de PMP. La réaction consécutive entre le Pyr et le PMP produit l'Ala tout en régénérant le PLP.

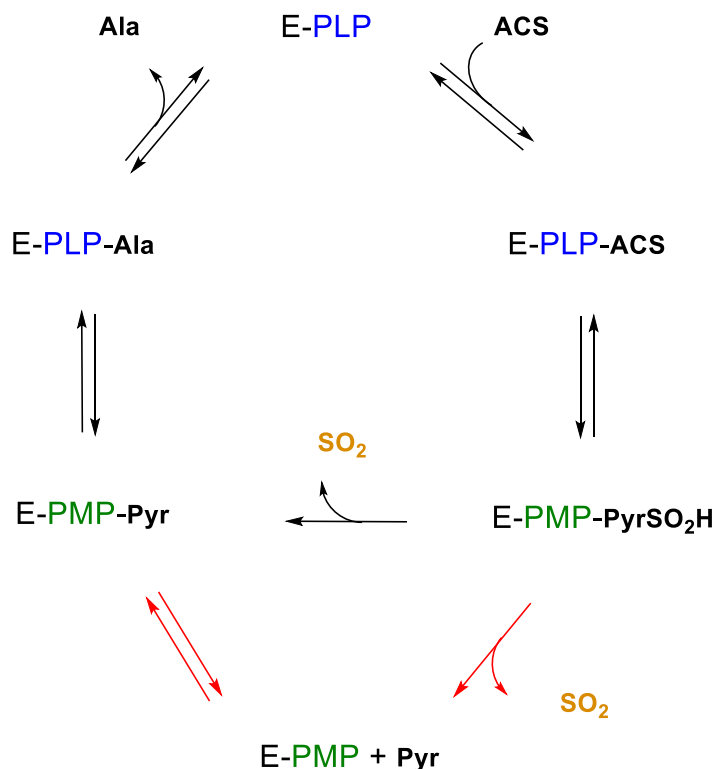


Schéma 119 : Proposition de mécanisme pour la réaction de désulfuration de l'ACS.

Cependant si l'on considère que le Pyr peut-être libéré du site actif (flèches rouges dans le Schéma 119), sa concentration en solution ne peut donc pas excéder la concentration en enzyme ce qui peut induire des vitesses très faibles pour la réaction de désulfination. Nous postulons que cela explique le fait que cette réaction ne soit pas observée avec la plupart des L- ou D-PyrASTA acceptant l'ACS et le Pyr. Pour les TA de série D présentant une activité désulfinase importante et dépendante de la quantité de PLP, nous pensons qu'elles sont capables de catalyser la réaction de transamination entre le PLP et l'ACS comme nous l'avons déjà envisagé lors de la mise au point du test couplé pour les amine-TA (cf. 1.1.2.3). C'est-à-dire que dans ce cas, la possibilité de libérer le PMP du site actif et de le remplacer par du PLP permet d'accumuler du Pyr dans le milieu jusqu'à atteindre une concentration maximale égale à celle du PLP initialement présent en solution. La transamination entre le Pyr et l'ACS permet alors de produire l'Ala et de régénérer le Pyr qui est donc en concentration stationnaire jusqu'à la consommation complète de l'ACS (Schéma 120).

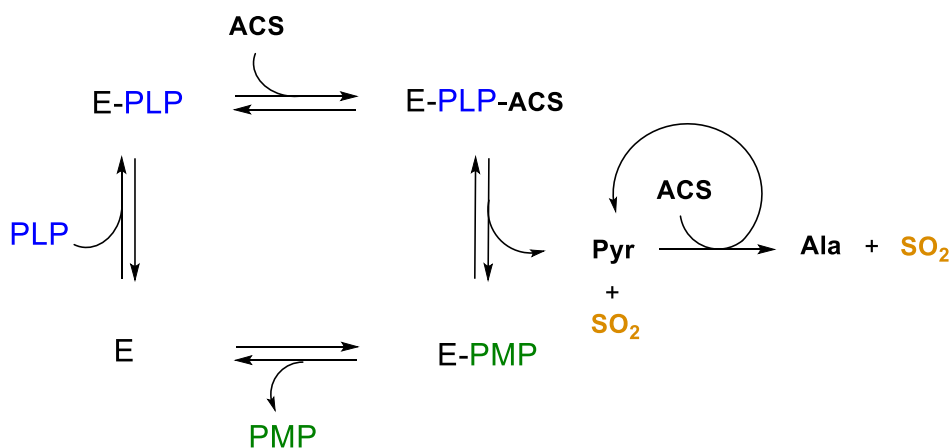


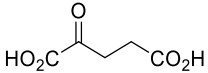
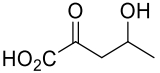
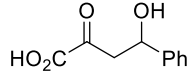
Schéma 120 : Mécanisme avec production de PMP pour la réaction de désulfination de l'ACS.

Si cette hypothèse est fondée, ces « ACS-désulfinase » seraient donc des PLP-TA permettant de convertir le PLP en PMP, et seraient donc des outils potentiellement très intéressants pour la production de ce coenzyme très coûteux. De prochaines expériences devraient permettre de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

## 6.4 Synthèse d'acides aminés $\gamma$ -hydroxylés avec les TA A3D9 et A3B9

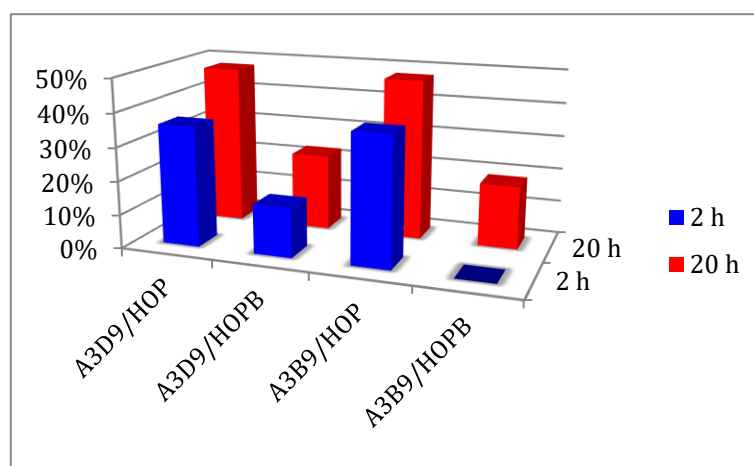
La présence de Pyr contaminant les 2 substrats  $\gamma$ -hydroxylés HOP et HOPB n'a pas permis de détecter avec certitude une activité avec ces 2 dérivés. Nous avons donc décidé de confirmer l'activité des 2 meilleurs hits en séries L et D : A3D9 et A3B9. L'activité de ces 2 enzymes purifiées a été mesurée dans des conditions permettant de s'affranchir de la contamination par le Pyr. Nous avons pour cela utilisé le test LDH/NADH en utilisant la L- ou D-Ala comme substrat donneur d'amine. La LDH et le NADH ont été additionnés au milieu réactionnel avant la TA, de façon à observer la réduction complète du Pyr contaminant le substrat. Ainsi après addition de la TA, la diminution linéaire de DO est exclusivement liée à la réaction de transamination entre le cétoacide hydroxylé et la L- ou D-Ala. Pour comparaison, nous avons mesuré en parallèle la vitesse de la réaction de transamination mettant en jeu le couple KG-Ala. Le Tableau 40 regroupe les résultats obtenus

Tableau 40 : Activités relatives des TA A3D9 et A3B9 pour le KG, le HOP et le HOPB.

	 <b>KG</b>	 <b>HOP</b>	 <b>HOPB</b>
<b>A3D9</b>	100 %	116 %	43 %
<b>A3B9</b>	100 %	86 %	11 %

Ces résultats permettent donc de confirmer l'activité de nos 2 meilleurs hits vis-à-vis des substrats  $\gamma$ -hydroxylés, même pour les cas où les activités mesurées lors du criblage étaient inférieures à celles mesurées avec le Pyr (Tableau 32, A3D9 et HOPB). Ces résultats confirment donc indirectement l'activité des autres hits vis-à-vis de ces 2 substrats. On peut par ailleurs constater que ces activités sont suffisantes (de 0,2 à 2 UI/mg) pour envisager des applications synthétiques. Nous avons donc mis en œuvre une expérience préliminaire de micro-synthèse avec les 2 substrats HOP et HOPB en utilisant les deux TA A3D9 et A3B9. Dans ce premier essai, la L- ou D-Ala a été utilisée comme substrat donneur en excès (4 eq.). L'avancement de la réaction a été contrôlé par dosage du Pyr formé à partir de l'Ala après 2 h et 20 h de réaction (Graphique 49). Bien que ces conditions ne soient clairement pas optimales pour obtenir un déplacement

d'équilibre, l'avancement des réactions est cohérent avec les vitesses relatives précédemment mesurées. De plus, l'analyse RMN  $^1\text{H}$  des milieux réactionnels a confirmé la formation des aminoacides  $\gamma$ -hydroxylés. Ces analyses nous ont aussi permis de constater qu'un mélange de diastéréoisomères *syn* et *anti* était obtenu avec les 2 substrats HOP et HOPB, et ceci dans les 2 séries L- et D- avec les 2 TA A3D9 et A3B9. Ces deux enzymes ne discriminent donc pas les deux énantiomères des cétoacides hydroxylés et elles permettent donc d'accéder aux 4 stéréoisomères de la 4-hydroxynorvaline et de la 4-hydroxy-homophénylalanine (Schéma 121).



Graphique 49 : Taux de conversion des réactions de transamination mettant en jeu HOP et HOPB avec la L- ou D-Ala et les 2 TA A3D9 et A3B9.

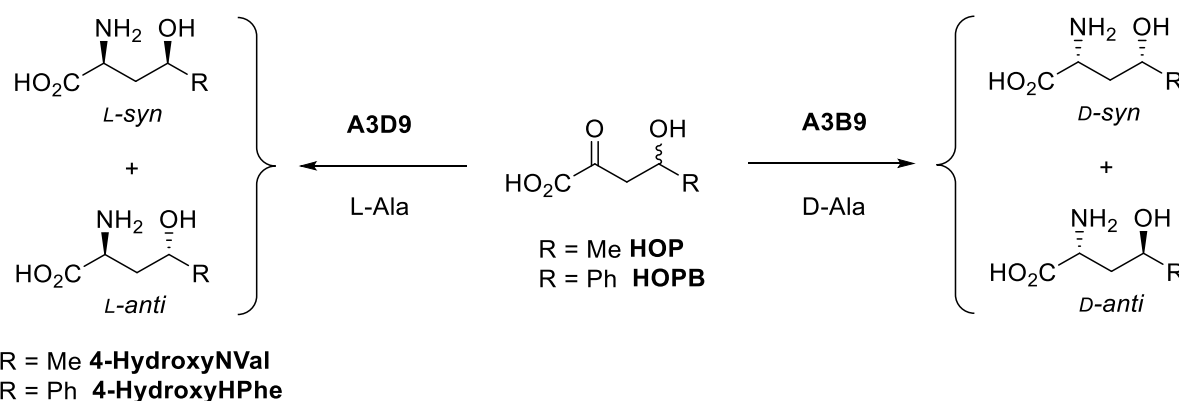


Schéma 121 : Accès aux 4 stéréoisomères d'aminoacides  $\gamma$ -hydroxylés avec les TA A3D9 et A3B9.

Ces deux TA qui acceptent à la fois les cétoacides  $\gamma$ -hydroxylés et le couple Pyr/Ala devraient aussi permettre de mettre en place des cascades enzymatiques originales par couplage avec des pyruvate-aldolases (AL) disponibles au laboratoire (Schéma 122). Les AL permettent la synthèse stéréosélective du  $\gamma$ -hydroxycétoacide qui est à son tour

converti en aminoacide hydroxylé de de série D- ou L- par action de la TA. De plus, dans cette boucle, le co-produit carbonylé formé à partir du donneur d'amine est le substrat donneur de l'aldolase, ce qui assure le déplacement de l'équilibre de la transamination ainsi qu'une économie d'atomes optimale.

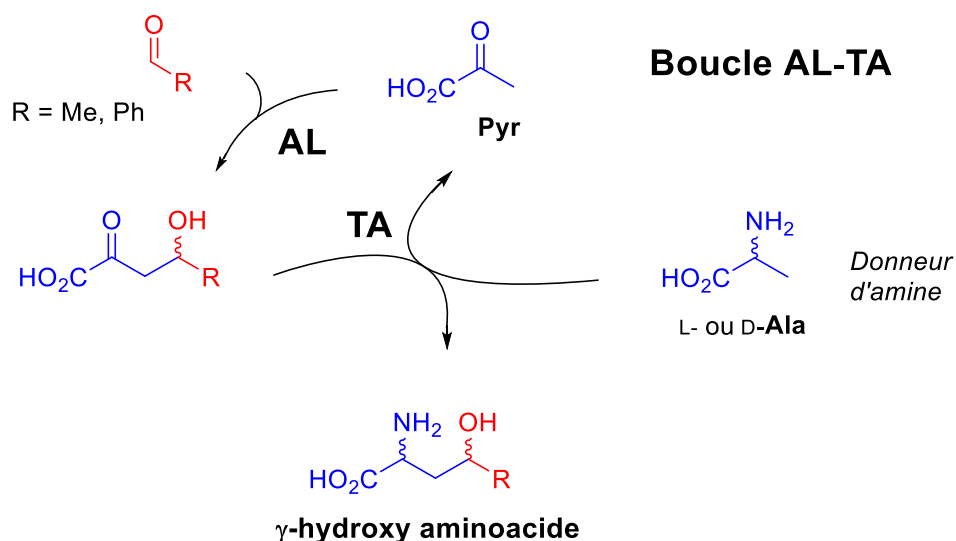


Schéma 122 : Principe des boucles AL-TA pour la synthèse d'acides aminés  $\gamma$ -hydroxylés.

## 6.5 Application des SerTA dans des cascades Transaminase-Transcétolase (TA-TK)

Plusieurs de nos hits ayant montré une activité notable vis-à-vis du couple Ser/HPA, nous avons envisagé de les utiliser pour la génération *in situ* du HPA à partir de Ser. En effet, le HPA étant particulièrement instable, il est fort intéressant de pouvoir le produire en continu dans des procédés au sein desquels il intervient. C'est par exemple le cas des réactions catalysées par la transcétolase (TK), une transférase pour laquelle il joue le rôle de donneur. Cette enzyme à Thiamine diphosphate (ThDP) catalyse la formation hautement stéréosélective d'une liaison C-C entre le groupement « céto » du HPA et un substrat accepteur aldéhydique pour former un cétose de configuration D-*thréo* (3*S*, 4*R*) (Schéma 123). Cette réaction présente l'avantage d'être irréversible grâce à la décarboxylation du HPA, ce qui offre de nombreuses opportunités pour la synthèse enzymatique de sucres et d'analogues de sucres.

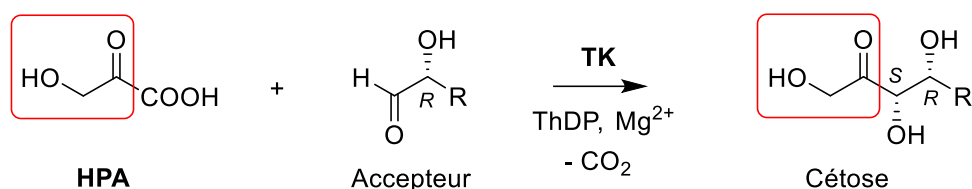


Schéma 123 : Réaction catalysée par la transcétolase.

Ces expérimentations ont été menées par Maxime De Sousa Lopez Moreira, étudiant de master 2 en collaboration avec le Pr. Hecquet dans le cadre d'un projet intitulé « Catalyseurs Nanostructurés en Système Non Conventionnels » (Nanocausys) financé par l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR). Un des objectifs de ce projet était de mettre au point plusieurs stratégies pour générer le HPA *in situ* tout au long de la réaction afin de réduire la perte de produit, de permettre une économie d'atome, et surtout d'éviter l'apparition d'impuretés. L'une de ces stratégies a donc consisté à utiliser une TA pour produire le HPA à partir de la Ser, un substrat disponible commercialement à faible coût (Schéma 124). Cette approche de couplage TK/TA avait déjà été envisagée par le passé mais en présence d'une transaminase mésophile non microbienne, extraite de feuilles d'épinard.<sup>278</sup>

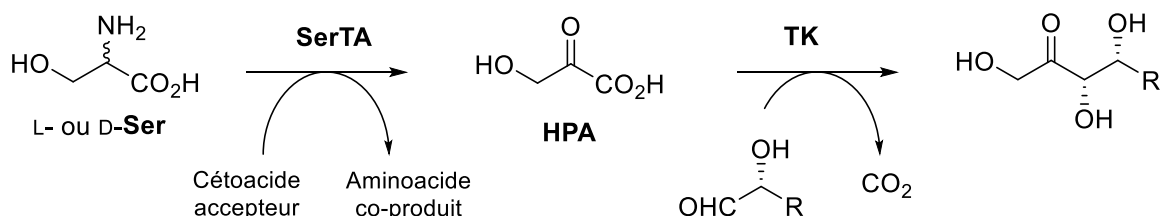


Schéma 124 : Couplage d'une TK et d'une SerTA pour la synthèse d'un cétose.

A l'issue du criblage de la banque TAM(A), 13 L- ou D-TA ont été sélectionnées pour la première étape qui a consisté à mesurer leur activité en présence de L ou D-Ser et de 3 accepteurs différents : Le KG, pour confirmer les résultats du criblage, ainsi que 2 accepteurs de structures plus simples, Pyr et Glyox. Les activités ont été mesurées en utilisant un test colorimétrique récemment décrit, basé sur l'utilisation d'un sel de tétrazolium, le WST-1, pour le dosage des composés  $\alpha$ -hydroxycarbonylés comme le HPA.<sup>279</sup> En réagissant avec ce dernier en milieu basique, le WST conduit à la formation d'un composé bleu qui absorbe très fortement à 600 nm (Schéma 125).

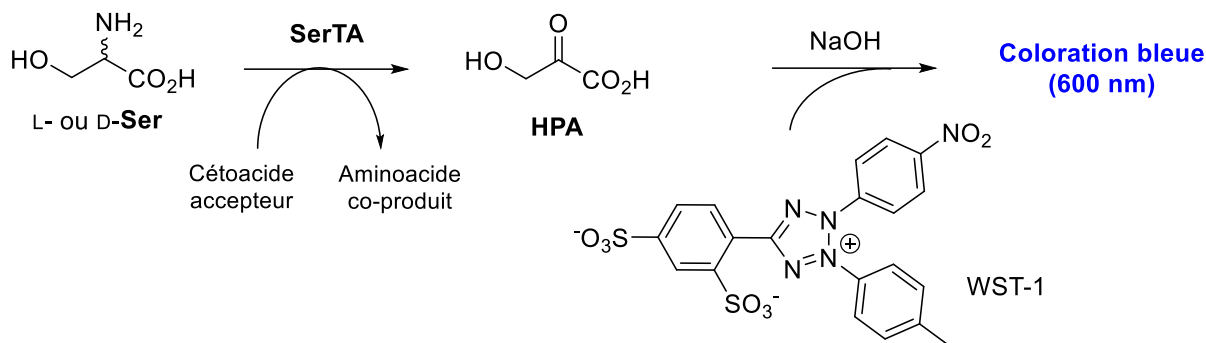
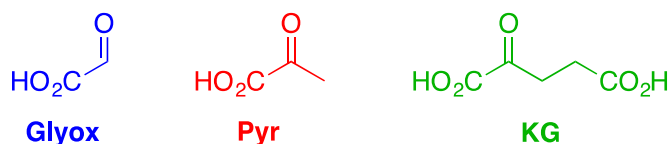
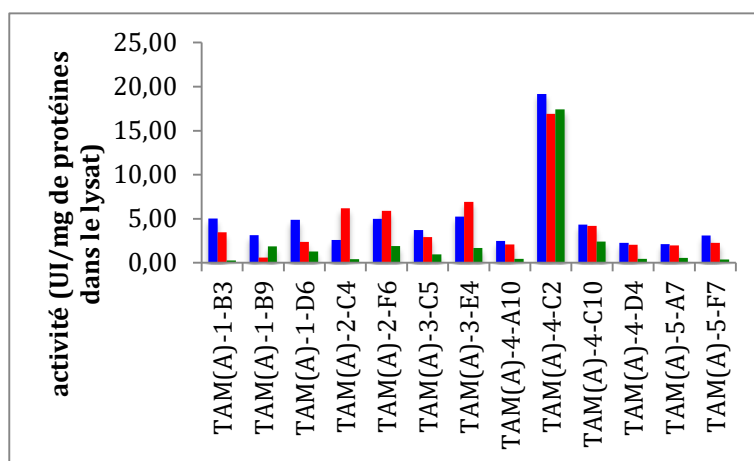


Schéma 125 : Mesure de l'activité des SerTA par dosage du HPA avec le Test au WST-1.

Le Graphique 50 présente les résultats obtenus avec les lysats cellulaires des 13 hits sélectionnés, dans la banque TAM(A).



Graphique 50 : Activité de 13 SerTA de TAM(A) en présence de Ser et de Pyr, Glyox ou KG.

On peut clairement remarquer que la TA A4C2 montre la plus forte activité (environ 20 UI/mg de protéines dans le lysat), quel que soit l'accepteur utilisé. Il est intéressant de constater qu'il s'agissait du meilleur hit pour le HPA lors de la validation des données du criblage de TAM(A) ce qui conforte ce résultat. L'enzyme A4C2 a donc été sélectionnée pour la suite du projet.

Avant de réaliser des essais de synthèse, cette enzyme a été caractérisée, afin de connaître ses performances et ses conditions optimales d'utilisation. Les valeurs de Km

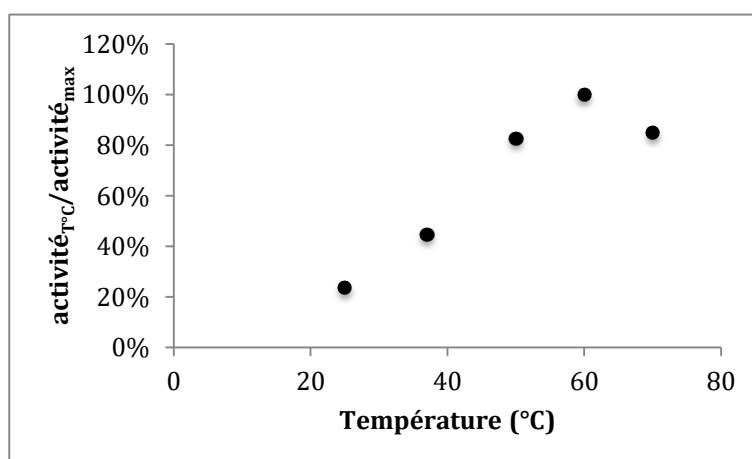
apparent ont été déterminées pour les 3 accepteurs en utilisant une concentration fixe de 20 mM de L-Ser (Tableau 41).

Tableau 41 : Km apparents déterminés pour Pyr, Glyox et KG avec A4C2 en présence de Ser 20mM.

Accepteur	Km <sup>app</sup> (mM)
Pyr	2,0 mM
Glyox	0,5 mM
KG	0,3 mM

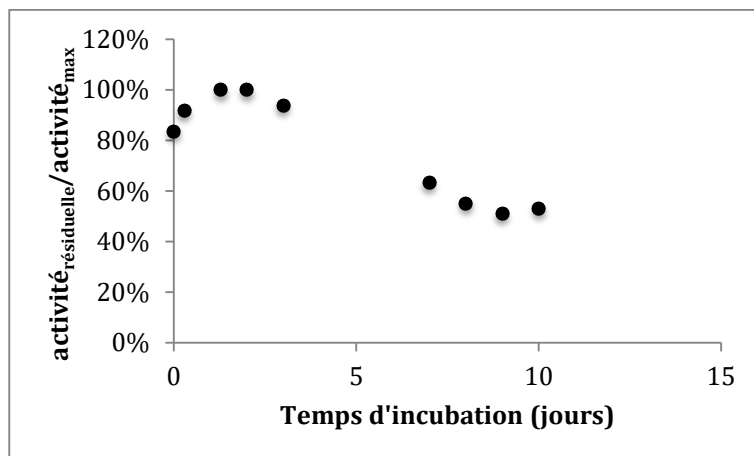
Au cours de cette étude nous avons pu déceler la présence d'un phénomène d'inhibition par excès de substrat pour le Glyox et le KG au dessus de 3 et 5 mM respectivement. Nous avons choisi, dans un premier temps le Pyr comme accepteur pour les expériences suivantes.

Ayant à notre disposition la TK de *Geobacillus stearothermophilus* (TK<sub>gst</sub>) étudiée par l'équipe du Pr. Hecquet et cette TK étant très active à 60 °C,<sup>280</sup> nous avons évalué la thermostabilité de la TA A4C2 (Graphique 51 et Graphique 52). Nous avons ainsi constaté une augmentation d'un facteur 5 entre 20 °C et 60 °C, ainsi qu'une stabilité sur plus de 48 h à 60 °C.



Graphique 51 : Activité de la TA A4C2 en fonction de la température.





Graphique 52 : Activité de la TA A4C2 en fonction du temps d'incubation à 60 °C.

Disposant donc d'une TA thermostable compatible avec la TK<sub>gst</sub>, nous avons par la suite réalisé deux premiers essais de synthèse à 60 °C en utilisant la Ser comme précurseur du HPA et le Pyr ou le Glyox comme substrat accepteur. Le Glyox présente l'intérêt d'offrir une plus grande économie d'atomes. Dans les deux cas nous avons utilisé le glycolaldéhyde comme accepteur de la TK<sub>gst</sub>. Cet aldéhyde constitue en effet un des meilleurs substrats non phosphorylé pour cette enzyme. Ces deux synthèses ont donc eu pour produits Ala ou Gly, ainsi que le L-érythrulose (Schéma 126).

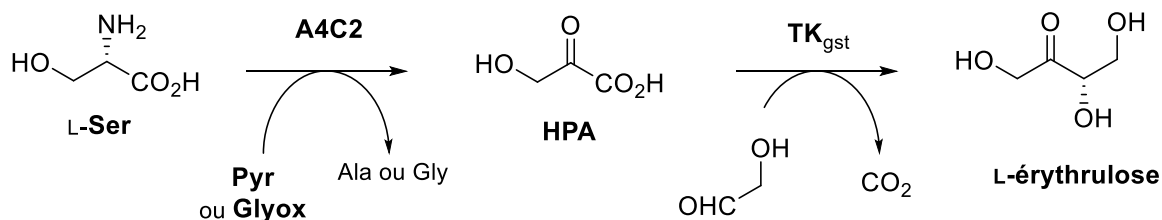


Schéma 126 : Synthèse du L-érythrulose par couplage de la TK<sub>gst</sub> avec la TA A4C2.

La L-Ser a été introduite en léger excès (1,5 équivalent) par rapport au cétoacide accepteur. L'analyse du milieu réactionnel par RMN <sup>1</sup>H a permis le suivi de la réaction et le calcul des rendements des 2 cascades enzymatiques. Ces rendements, ainsi que celui obtenu après purification du L-érythrulose sur silice, sont présentés dans le Tableau 42.

Tableau 42 : Rendements obtenus (%) pour la synthèse du L-érythrulose dans la cascade TA-TK.

Cétoacide accepteur utilisé	Rendement de la transamination	Rendement en L-érythrulose d'après la RMN	Rendement en L-érythrulose après purification
Pyr	Quant <sup>a</sup>	81	44
Glyox	Quant <sup>a</sup>	62	22

<sup>a</sup> Le Pyr ou le Glyox ne sont plus détectables par RMN <sup>1</sup>H

Ces rendements, bien que modestes après purification, démontrent la faisabilité de ce procédé, ainsi que l'efficacité de la TA A4C2 pour la génération *in situ* du HPA, y compris à haute température. Il conviendra donc d'optimiser les conditions réactionnelles et de purification pour accéder à des rendements satisfaisants en produit isolé.

## 6.6 Synthèse de l'Homophénylalanine avec les TA A4A10, A3D9 et A3B9

Enfin, nous avons pu, dans le cadre de ce travail de thèse, démontrer l'applicabilité de certains de nos hits pour la synthèse d'acides aminés non canoniques valorisables en préparant les 2 énantiomères de l'HPhe. Ce travail a été réalisé en partie dans le cadre du stage de master 2 de Thomas Talbot et du stage de Master 1 de Charlotte Blier.

### 6.6.1 Synthèse de la L-HPhe avec la TA A4A10

Nos premiers essais ont été effectués avec la TA A4A10, pour laquelle une activité non négligeable avait été mise en évidence avec le test direct en utilisant le couple L-ACS – OPBA et qui, comme nous l'avons présenté, est une enzyme très stable, résistante à des températures élevées et à la présence de DMSO. Afin de choisir un substrat donneur pour la synthèse de la L-HPhe, nous avons, tout d'abord, mesuré les activités de l'enzyme dans des conditions standardisées en présence d'OPBA (2 mM) et de 4 aminoacides (20 mM) : Glu, Ala, L-ACS et Asp. Pour comparaison, nous avons aussi mesuré dans les mêmes conditions les activités avec les 2 accepteurs Pyr et KG et la même série de donneurs (Tableau 43). Toutes ces activités ont été mesurées en utilisant 3 tests similaires basés sur l'utilisation d'une déshydrogénase auxiliaire (LDH, GluDH ou MDH) catalysant, en présence de NADH la réduction du co-produit carbonyle (Pyr, KG ou OA) formé à partir de l'acide aminé donneur (Schéma 127).

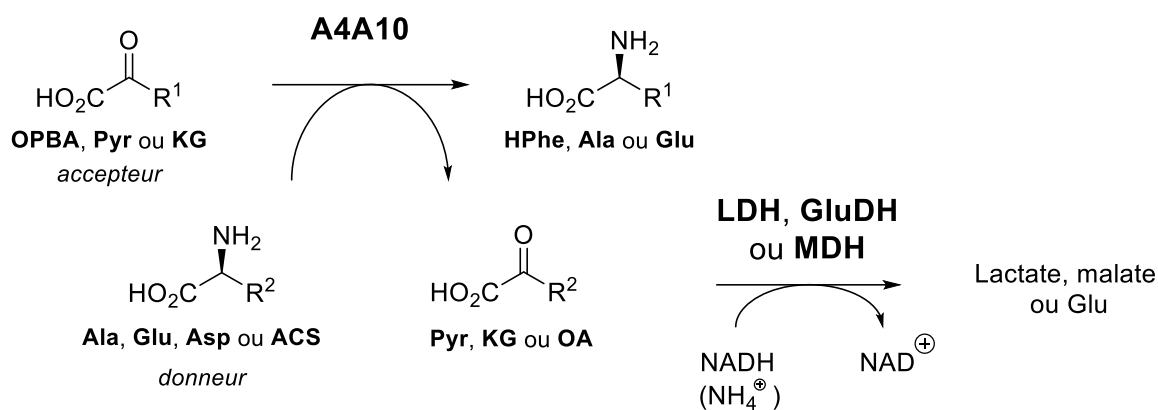


Schéma 127 : Mesure de l'activité de la TA A4A10 avec différents couples de substrats.

Tableau 43 : Activités (UI/mg) de la TA A4A10 mesurées avec différents couples donneur (20mM) – accepteur (2 mM). Entre parenthèse, activités relatives (%) par rapport à l'activité maximale mesurée avec le couple KG – L-ACS.

Donneur	Ala	Glu	Asp	L-ACS
DH auxiliaire	LDH	GluDH	MDH	LDH
Accepteur				
OPBA	0,17 (5)	0,17 (5)	0,35 (10)	0,35 (10)
Pyr	---	0,44 (12)	0,61 (17)	---
KG	0,2 (6)	---	1,3 (35)	3,7 (100)

Ces résultats confirment l'activité de la TA A4A10 vis-à-vis de l'OPBA et des différents donneurs. En présence d'Asp ou d'ACS, cette activité représente environ 10 % de l'activité maximale mesurée avec le KG. Ces 2 donneurs apparaissent donc a priori, comme les plus appropriés pour la synthèse de la L-HPhe.

Nous avons donc mené un premier essai en utilisant une concentration en OPBA de 7,2 mM et un excès d'Asp (5 équivalents) afin de déplacer l'équilibre. A l'issue de la réaction, nous avons observé par RMN <sup>1</sup>H la formation de l'HPhe, ainsi que d'une quantité importante d'Ala. Cette dernière est formée par transamination à partir du Pyr, lui-même formé par décarboxylation de l'OA, lui-même formé à partir d'Asp (Schéma 128).

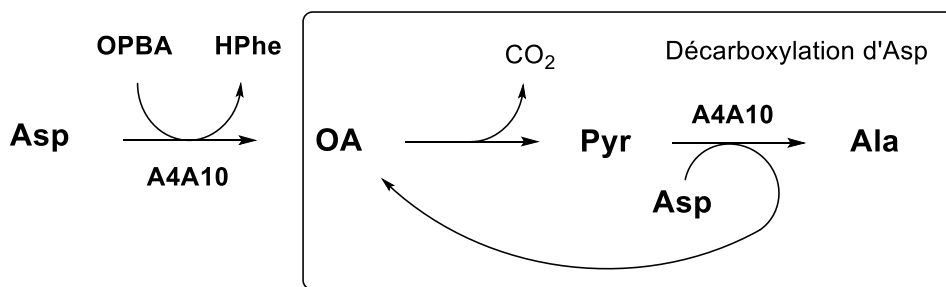
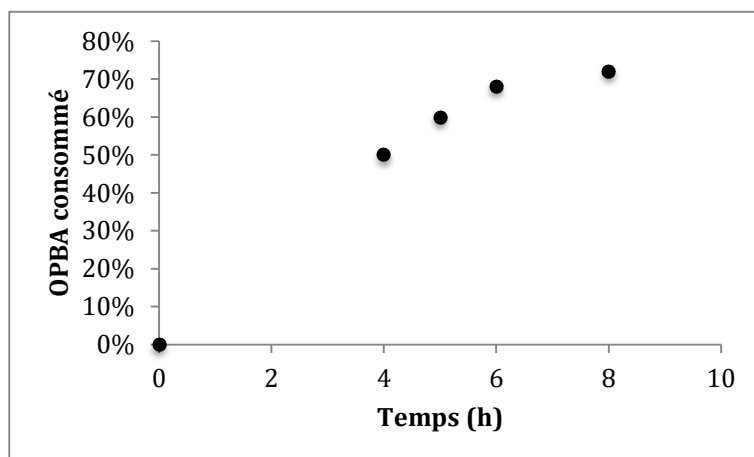


Schéma 128 : Formation d'Ala à partir d'Asp catalysée par la TA A4A10.

Nous avons ensuite opté pour l'utilisation du Glu comme donneur en excès (5 équivalents). La quantité de KG formée au cours de la réaction a été dosée en utilisant le couple GluDH-NADH, ce qui nous a permis de suivre l'avancement de la réaction (Graphique 53).



Graphique 53 : Conversion de l'OPBA (7,2 mM) en HPhe en présence de A4A10 et de Glu.

Après 9 h de réaction, un plateau à 72 % de conversion a été atteint. Cet avancement a été confirmé par l'analyse RMN du mélange réactionnel obtenu. L'HPhe a ensuite été purifiée en enchaînant 2 étapes chromatographiques. Le passage du milieu réactionnel sur résine échangeuse de cations a permis, dans un premier temps, d'isoler les aminoacides présents dans le mélange (Glu et L-HPhe) par adsorption puis décrochage avec une solution d'ammoniaque. Un passage du mélange sur une résine basique, échangeuse d'anions, a ensuite permis une adsorption sélective du Glu. L'HPhe a pu ainsi être isolée avec un rendement modeste de seulement 33 % résultant vraisemblablement de la perte du produit sur les colonnes à cause de son caractère fortement hydrophobe.

Avant de se pencher sur l'optimisation du système de purification, nous avons tenté d'améliorer le rendement de la réaction en utilisant un autre système de déplacement d'équilibre. Pour cela nous avons couplé la réaction de transamination entre l'OPBA (9 mM) et le Glu (9 mM) avec une régénération du Glu catalysée par la GluDH en présence de NADH et d'ions ammonium. Le NADH a été lui-même utilisé en quantité catalytique et régénéré avec le couple formate/FDH. La disparition quasi-complète du substrat OPBA a pu être observée par CCM et confirmée par l'analyse RMN qui nous a permis de calculer un rendement supérieur à 95 %. Cependant, après une purification par chromatographie d'échange d'ions dans les mêmes conditions que précédemment, nous avons obtenu une fois de plus un rendement faible égal à 39 %.

### **6.6.2 Synthèse de la L-HPhe avec la TA A3D9**

Dans un second temps, nous avons mis en œuvre une autre enzyme, la TA A3D9 pour accéder à la L-HPhe. Cette enzyme est en effet le meilleur hit obtenu avec l'OPBA en test couplé avec le Glu comme donneur (Tableau 37). De plus cette enzyme acceptant la Gln comme donneur, nous avons pu tester une nouvelle stratégie de déplacement d'équilibre.

#### **6.6.2.1 Déplacement des équilibres de transamination avec la glutamine**

Des données de la littérature relatives aux glutamine-TA laissent penser que les réactions de transamination mettant en jeu la Gln comme donneur présentent des constantes d'équilibre très élevées. Cela pourrait être dû à la cyclisation du 2-oxoglutaramate (2OG) formé à partir de Gln produisant un déplacement d'équilibre, comme dans le cas de la Lys évoqué précédemment (Schéma 129). A la différence du cétoacide  $\epsilon$ -aminé formé à partir de Lys, on peut difficilement envisager dans ce cas, la formation d'une imine. Cependant, lors de travaux précédents au laboratoire, nous avons observé que ces structures de type héli-acétalique, résultant de l'addition d'un amide sur un groupement carbonyle  $\alpha$ -carboxylique, étaient particulièrement stables.

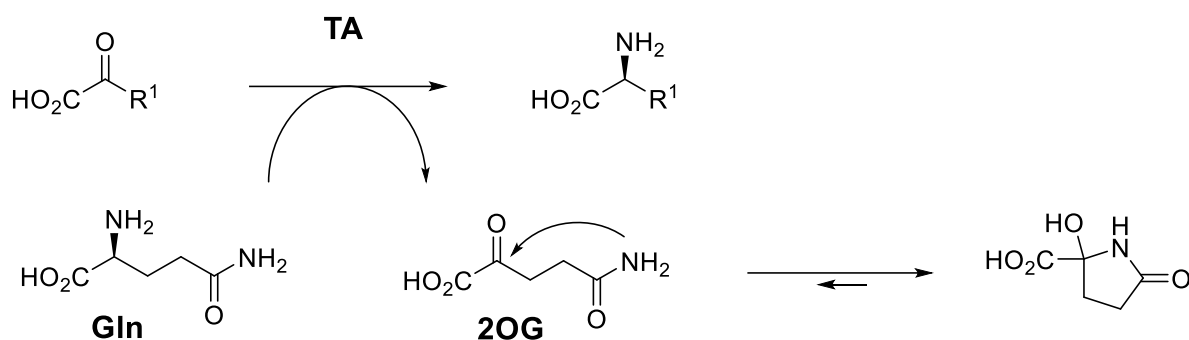
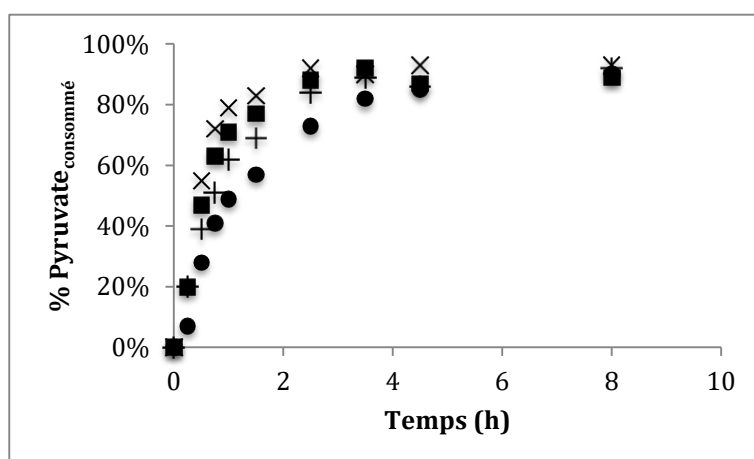


Schéma 129 : Déplacement d'équilibre par cyclisation du 2OG formé à partir de Gln.

Afin de tester nos hypothèses, nous avons donc tout d'abord étudié la réaction de transamination entre le Pyr et la Gln, catalysée par la TA A3D9. L'avancement de cette réaction a pu être facilement évalué par dosage du Pyr résiduel avec le couple LDH/NADH. La réaction a été répétée à différentes concentrations en Pyr, de 20 à 200 mM avec une concentration fixe de Gln de 200 mM. Le Graphique 54 présente les résultats obtenus.

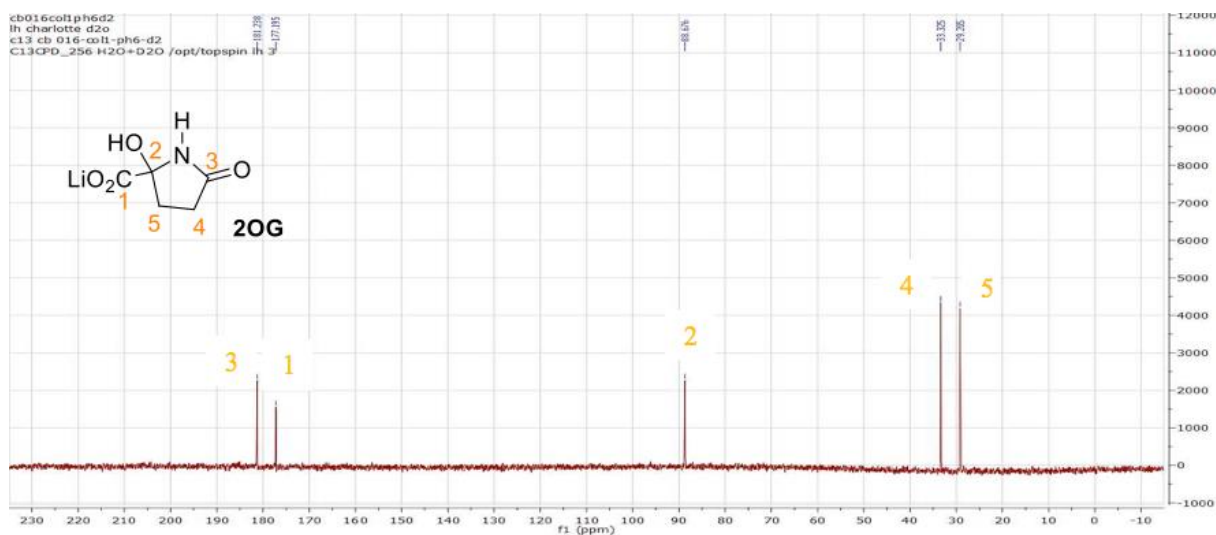


Graphique 54 : Consommation du Pyr en fonction du temps en présence de Gln (200 mM) et de la TA A3D9. Concentrations initiales de Pyr : 20 mM (×), 50 mM (■), 100 mM (+) et 200 mM (●).

Nous avons donc mesuré des taux de conversions supérieurs à 90 % quelle que soit la concentration initiale du Pyr, ce qui implique, comme nous l'avons envisagé, un phénomène de déplacement d'équilibre. La Gln peut donc être considérée comme un « substrat donneur irréversible ». De façon surprenante, nous n'avons pas trouvé trace dans la littérature de la caractérisation par RMN du 2OG. Nous avons donc entrepris sa synthèse en quantité suffisante pour pouvoir décrire les spectres de ce composé et

vérifier son existence sous forme cyclique. Nous avons donc répété à l'échelle préparative la réaction de transamination entre le Pyr (50 mM) et un léger excès de Gln (60 mM). Le dosage du Pyr résiduel a permis de suivre la réaction et d'observer une conversion quantitative.

Le 2OG a été purifié par un passage du mélange réactionnel sur une résine sulfonique, échangeuse de cation, permettant une adsorption sélective des aminoacides (Ala et excès de Gln). Le 2OG a pu être ainsi isolé par simple élution à l'eau. Plusieurs tentatives de séchage du 2OG par concentration sous pression réduite ou par lyophilisation se sont soldées par un échec. Nous avons en effet observé la formation d'un produit « gommeux » très peu soluble dans l'eau et présentant un spectre RMN  $^1\text{H}$  très complexe. L'analyse CCM a permis de confirmer la décomposition du 2OG. L'ensemble de ces observations indique de manière très probable une polymérisation, qui est vraisemblablement catalysée en milieu acide. Nous avons donc ajusté le pH de la solution de 2OG à 6 avec de la lithine avant de procéder à une lyophilisation. Dans ces conditions, nous avons réussi à isoler le 2OG sous la forme de carboxylate de lithium avec une bonne pureté (> 95 % selon la RMN  $^1\text{H}$ ). L'analyse des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  a permis de confirmer sa structure, et de démontrer que ce dernier est bien présent exclusivement sous la forme cyclique (> 99,5 %) (Figure 47 et Figure 48).



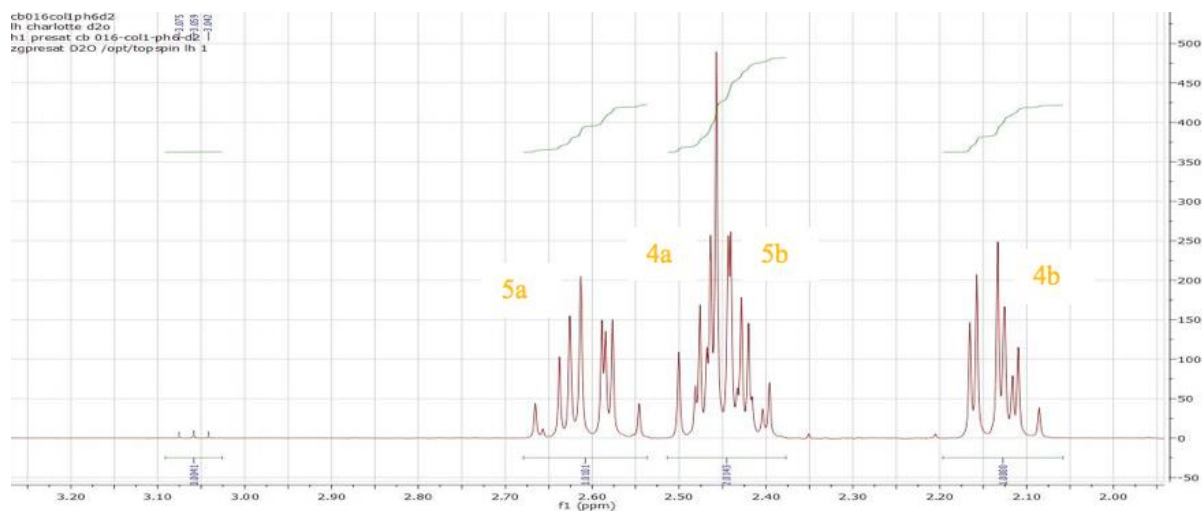


Figure 48 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du 2-oxoglutaramate (2OG).

La Gln conduit donc bien par transamination à la formation d'un cétoacide qui évolue spontanément et de façon complète vers une forme cyclique particulièrement stable. De fait, elle peut être considérée comme un nouveau « *smart donor* » et occupera une place prépondérante au sein de nos méthodes de déplacement d'équilibre pour la synthèse d'acides aminés avec les TA qui l'acceptent. Pour les autres, il sera bien évidemment toujours possible de réaliser un couplage avec une GlnTA afin de pouvoir continuer à utiliser cette stratégie. Ces cascades seront d'ailleurs applicables aussi bien aux  $\alpha$ -TA qu'aux amine-TA puisque nos GlnTA acceptent toutes le Pyre, l'alanine pouvant alors être utilisée comme donneur d'amine primaire.

La Gln ne sera en revanche, dans l'état actuel des choses, pas directement utilisable comme donneur avec les amine-TA puisque qu'elle n'a pas encore été décrite comme substrat pour ces enzymes. Il conviendra par conséquent de la tester lors de l'étude approfondie des hits trouvés dans les banques TAM(C) et TAM(D). Dans le cas où aucune de nos nouvelles amine-TA ne montrerait d'activité pour ce donneur, il sera alors peut-être possible d'utiliser, selon le même principe, le 4-aminobutanamide (ABA) comme « *smart donor* » avec ces dernières. En effet, l'aldéhyde produit par transamination à partir de cette amine pourrait lui aussi se cycliser spontanément et de manière irréversible pour donner un composé similaire au 2-oxoglutaramate (2OG) (Schéma 130).



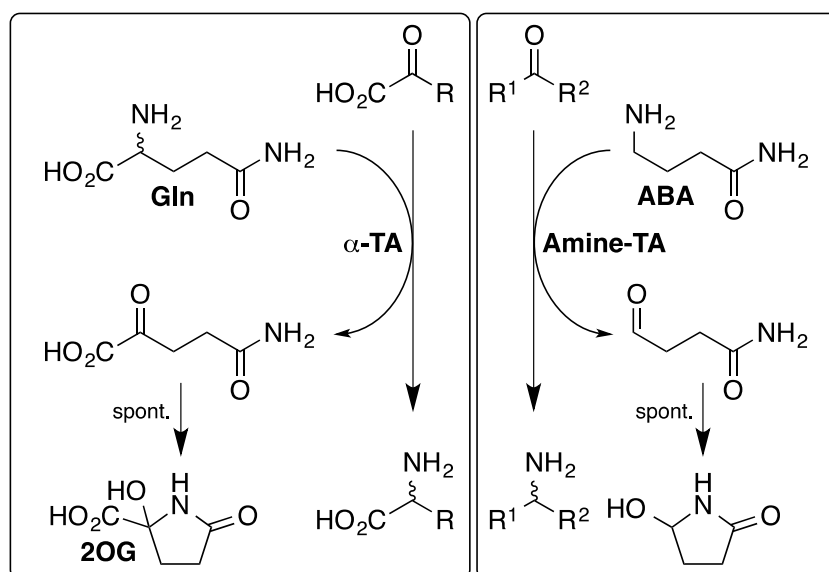


Schéma 130 : Stratégies de déplacement d'équilibre pour les  $\alpha$ -TA et amine-TA utilisant des « smart donor ».

### 6.6.2.2 Synthèse de la L-HPhe avec la glutamine et la TA A3D9

Disposant de cette nouvelle stratégie de déplacement d'équilibre, nous avons de nouveau procédé à la synthèse de la L-HPhe en utilisant la TA A3D9 à partir de l'OPBA (107 mM) et de la Gln. En utilisant un léger excès de cette dernière, nous avons pu atteindre un rendement quasi quantitatif avant purification, attesté par RMN  $^1\text{H}$ . La L-HPhe a été par la suite purifiée de la même manière que précédemment, en commençant par un passage sur une résine sulfonique. Cette chromatographie nous a permis d'éliminer le 2OG et d'isoler le mélange des deux aminoacides (HPhe et Gln en excès), qui ont par la suite été séparés sur résine basique de type Dowex 1. L'HPhe, de par son caractère hydrophobe, présente en effet une plus forte affinité pour ce support et est donc éluée après la Gln. Il est cependant apparu difficile de l'éluier en totalité à cause de sa très faible solubilité en milieu aqueux. La HPhe est donc de nouveau demeurée en partie adsorbée sur la résine et a été isolée avec un rendement de seulement 59 %. Une très bonne pureté a cependant pu être démontrée par RMN (Figure 49 et Figure 50).

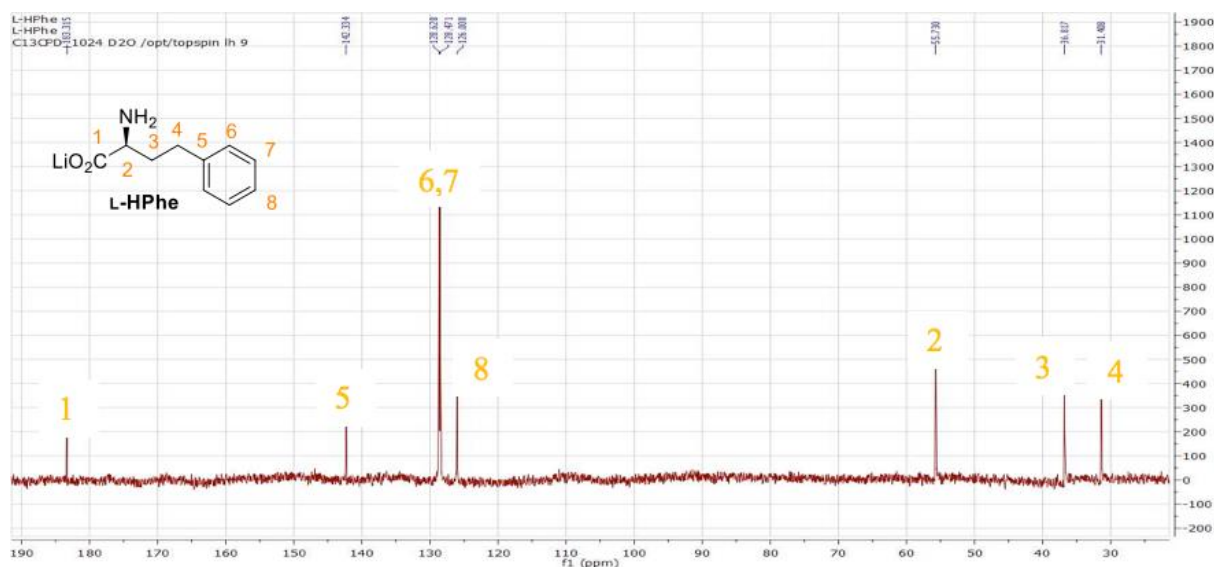


Figure 49 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de la L-homophénylalanine.

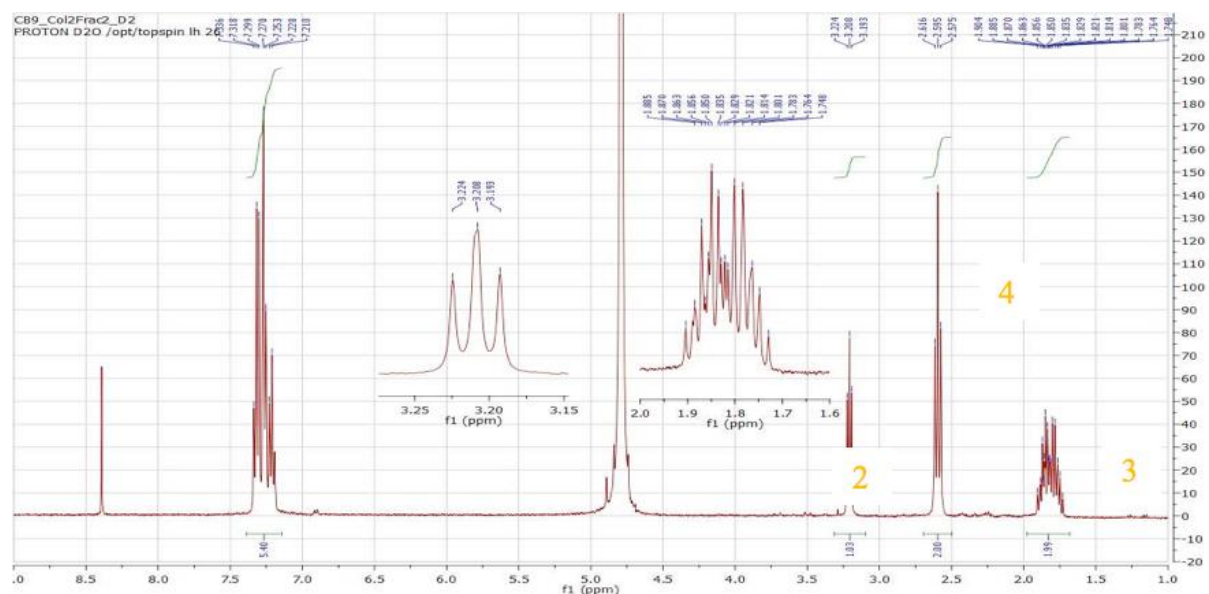


Figure 50 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  de la L-homophénylalanine.

### 6.6.3 Synthèse de la D-HPhe avec la glutamine et la TA A3B9

La méthode de déplacement d'équilibre basée sur l'utilisation de la Gln est applicable en série D, si l'on dispose d'une TA acceptant la D-Gln. Nous avons donc vérifié que c'était bien le cas de la TA A3B9 qui a par ailleurs montré dans le test direct avec le D-ACS, une bonne activité avec l'OPBA. Nous avons cette fois utilisé la D-Gln en léger défaut (0,95 équivalent) afin d'éviter l'utilisation de la résine basique lors de la purification. Un meilleur rendement de 75 % a ainsi pu être obtenu à l'issue de l'étape

chromatographique avec la résine sulfonique. La Figure 51 présente le spectre RMN  $^1\text{H}$  de la D-HPhe ainsi obtenue.

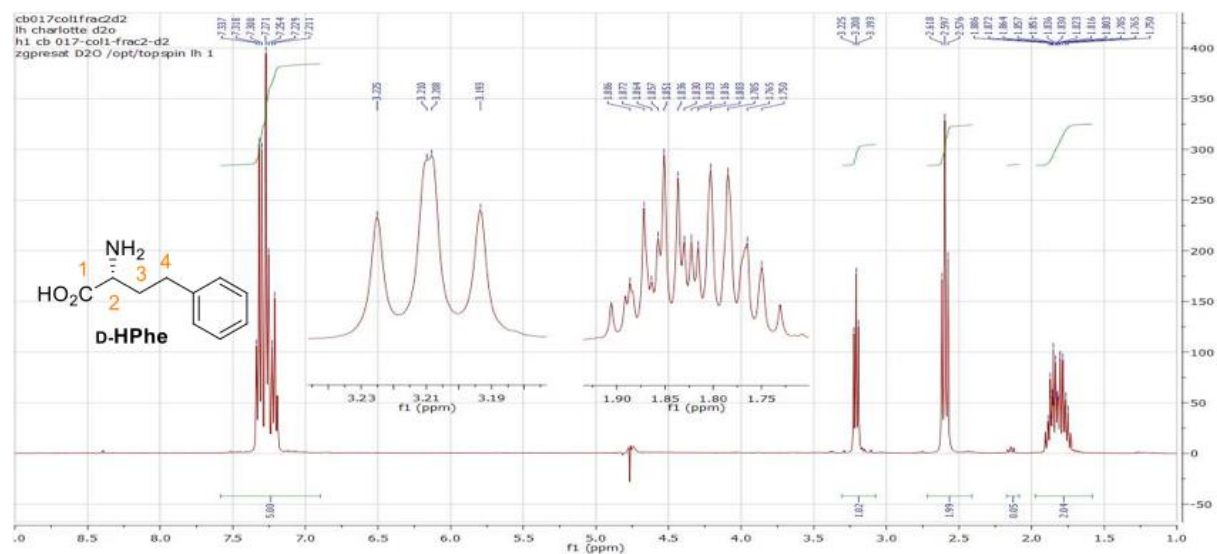


Figure 51 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  de la D-homophénylalanine.

#### 6.6.4 Détermination des excès énantiomériques des L- et D-HPhe

Les puretés énantiomériques des L- et D-HPhe précédemment synthétisées avec les TA A3D9 et A3B9 ont été mesurées par HPLC en utilisant un support chromatographique chiral, adapté pour les aminoacides (colonne Crownpack CR+, Daicel). L'optimisation des conditions a permis d'obtenir une bonne séparation des 2 énantiomères (Figure 52).

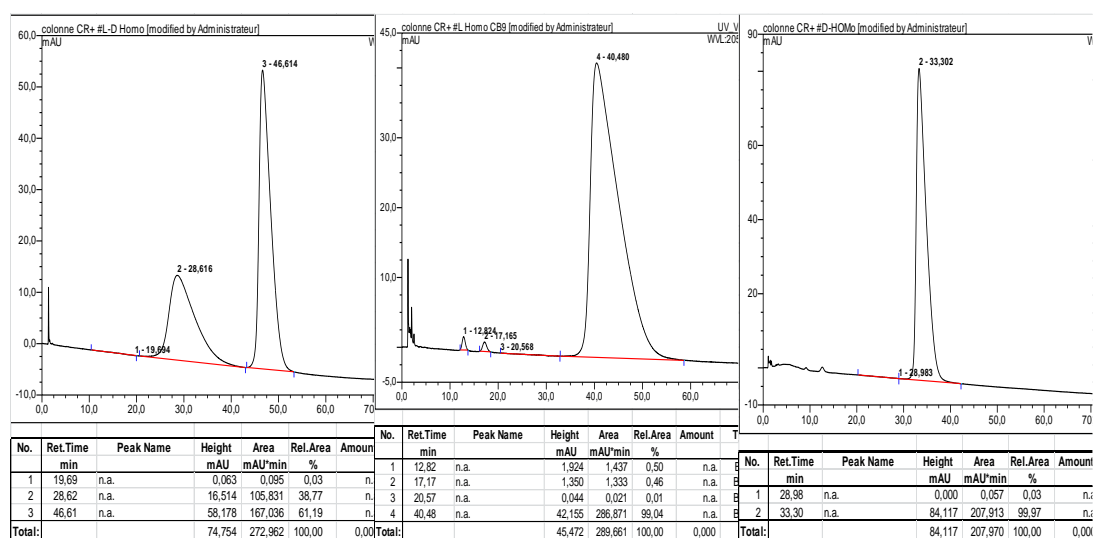


Figure 52 : Chromatogrammes obtenus pour le mélange racémique (à gauche), la L-HPhe (au centre) et la D-HPhe (à droite).

Ces analyses nous ont permis de montrer que les 2 échantillons de L- et D-HPhe préparés avec les 2 TA issues de nos criblages présentent tous deux des excès énantiomériques supérieurs à 99 %, ce qui confirme une fois encore la très grande stéréosélectivité des TA et l'intérêt de ces enzymes pour préparer des amines chirales de façon hautement stéréosélective.

Il est important de signaler que ces synthèses de l'HPhe ont été menées à petite échelle (50 mg d'OPBA au maximum) et que les rendements obtenus sont en conséquence relativement imprécis. Il sera nécessaire de reproduire ces synthèses à plus grande échelle et d'optimiser les conditions d'isolement et de purification. Par ailleurs, en raison de la faible solubilité de l'OPBA (< 10 mM) et de l'HPhe en milieu aqueux (< 2 mM), les réactions ont été menées en milieu hétérogène : à partir d'une suspension d'OPBA, nous avons finalement obtenu une suspension d'HPhe. Cela permet donc d'envisager à plus grande échelle, un isolement du produit par simple filtration, ce qui pourrait simplifier considérablement le procédé de synthèse de l'HPhe, ou d'autres aminoacides hydrophobes.



## **Conclusion**



## Conclusion

Ce travail avait pour objectif la découverte de nouveaux outils biocatalytiques par criblage de banques d'enzymes issues de la biodiversité. Il a donc impliqué un ensemble de tâches diverses :

- la construction de collections d'enzymes, en collaboration avec le Génomoscope d'Evry
- la mise au point de différents tests de criblage originaux
- la synthèse de divers substrats nécessaires pour ces criblages
- la mise en œuvre des criblages
- le traitement informatique et statistique des données
- la caractérisation des premiers hits
- le développement de premières applications

Grace à la collaboration très fructueuse engagée avec l'équipe du Dr Véronique de Bérardinis, nous avons pu disposer de trois collections de transaminases comptant au total plus de 800 enzymes surexprimées et représentatives d'une grande diversité d'activités catalytiques. Nos travaux ont d'ores et déjà montré que ces banques renferment des catalyseurs très performants pour la synthèse d'acides aminés et leur exploration plus approfondie dévoilera sans nul doute de nouveaux outils originaux pour la synthèse d'une grande variété d'amines chirales.

Nous avons mis au point plusieurs tests enzymatiques originaux et très performants permettant un suivi colorimétrique et continu d'une grande diversité de réactions de transamination. Ces tests reposent sur l'utilisation de substrats donneurs de type  $\beta$ -aminosulfonique ( $\beta$ AS) et du DTNB pour le dosage du  $\text{SO}_2$  formé à partir des  $\beta$ AS. Ils se sont avérés très efficaces pour la mesure précise de l'activité de L- ou D- $\alpha$ -TA (tests directs et couplés utilisant l'ACS), mais aussi de (R)- ou (S)-amine-TA, (tests directs à l'HPT). L'optimisation prochaine des tests couplés pour les amine-TA, incluant notamment les HypoTA récemment identifiées, devrait permettre une exploration sans limite des banques de TA. De plus, certains de nos tests sans déplacement d'équilibre pourraient aussi trouver des applications pour la détermination expérimentale des constantes d'équilibres et ainsi représenter un point clé dans le développement de procédés de synthèse.



Ce travail de thèse a aussi été l'occasion de mettre au point ou d'optimiser la synthèse de plusieurs substrats pour les TA. Plusieurs dérivés de type  $\beta$ AS (L- et D- ACS, HPT, (R)- et (S)-méthyl-HPT) peuvent être désormais préparés efficacement et de façon reproductible. Des voies d'accès à des  $\alpha$ -cétoacides originaux ont aussi été conçues et mises au point. On peut citer en particulier une méthode générale pour préparer des dérivés  $\beta$ -hydroxylés qui devraient permettre la synthèse prochaine d'une variété de  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -aminoacides. On peut également citer la synthèse du 3,3-diméthyl-KG ou encore la contribution que nous avons apportée à la synthèse d'un analogue  $\beta$ -lactame du KG. Ce dernier devrait pouvoir être intégré à un prochain criblage pour la découverte de TA permettant la synthèse de nouveaux analogues neuroactifs du Glu.

La mise en œuvre des criblages a permis de valider notre approche et de démontrer l'efficacité de nos différents tests. Une approche statistique rigoureuse et un traitement informatique efficace de la masse des données (> 50000 essais) a permis de détecter de façon très sensible de très nombreux hits avec une variété d'activités au sein des 3 banques de TA. Cette approche fiable et efficace sera désormais appliquée de façon systématique pour les prochains criblages de transaminases ou d'autres familles d'enzymes.

A l'issue de l'étape de criblage, nous avons sélectionné parmi les hits, 24 nouvelles transaminases issues de TAM(A), dont l'ensemble constitue une première « boîte à outils enzymatique » pour la synthèse stéréosélective d'une variété d'aminoacides. Les propriétés de ces enzymes, révélées par le criblage ont été confirmées et nous avons exploré plus avant leurs spectres de substrats afin de mieux cerner leur potentiel en synthèse. Nous avons aussi étudié une activité originale de désulfination de l'ACS propre à certaines D- $\alpha$ -TA et montré qu'elle correspond probablement à la capacité qu'ont ces enzymes de convertir le PLP présent en solution, en PMP. Un autre résultat marquant de nos travaux est la mise en lumière d'une nouvelle stratégie générale de déplacement d'équilibre via l'utilisation de la glutamine comme substrat donneur d'amine. Nous avons en effet montré que cet aminoacide peut coûteux peut être considéré comme un « donneur d'amine irréversible », un « *smart donor* » qui pourrait permettre à l'avenir la mise au point de procédés de transamination très efficaces. Nous avons aussi montré que certaines de nos TA peuvent être associées à des aldolases ou des transcétolases dans des cascades enzymatiques, offrant la perspective de procédés performants pour la

synthèse stéréosélective de composés polyfonctionnels. Enfin, à travers l'exemple de la synthèse des deux énantiomères de l'Homophénylalanine, nous avons fait la preuve des performances des nouvelles enzymes découvertes et plus globalement de l'efficacité de l'approche générale que nous avons développée pour la découverte de nouvelles transaminases.

Pour finir, en plus d'offrir de nombreuses perspectives d'application, nous pensons que ce travail de thèse représente une contribution à l'avancée des connaissances fondamentale sur les réactions de transamination enzymatiques et qu'il permettra d'amorcer de nouvelles découvertes dans ce domaine de recherche.



## **Partie expérimentale**



# Partie expérimentale

## 1 Généralités

### 1.1 Réactifs

Les produits commerciaux sont utilisés sans purification préalable. Les solvants anhydres sont séchés et distillés selon les procédures usuelles (toluène et Et<sub>2</sub>O sur Na, MeOH sur Mg/I<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sur CaH<sub>2</sub>, Pyridine sur KOH...).

### 1.2 Réactions

Les ozonolyses sont effectuées avec un ozoneur Fischer modèle 502 en utilisant de l'oxygène anhydre.

Le diazométhane est préparé en utilisant de la verrerie sans rodage (mini kit Aldrich).

### 1.3 Purifications

Les chromatographies sur colonnes de silice sont effectuées avec de la silice MN Kieselgel 60 M (0,04-0,063 mm/ 230-400 mesh, Macherey-Nagel).

Les chromatographies sur résine sont effectuées avec de la résine acide Dowex 50WX8 200-400 Mesh, ou de la résine basique Dowex 1X8 200-400 Mesh. La résine acide est lavée à l'eau avec 5 volumes de colonne avant utilisation. La résine basique, initialement sous forme chlorure, est équilibrée sous forme acétate de la façon suivante : La résine est premièrement équilibrée avec 10 volumes d'une solution aqueuse de NaOH 1M, puis avec H<sub>2</sub>O jusqu'à neutralité du percolat. Dans un second temps une solution aqueuse d'AcOH 1 M est passée sur la colonne jusqu'à acidité du percolat. Pour finir, la colonne est lavée avec de l'eau jusqu'à neutralité.

### 1.4 Analyses

Les chromatographies sur couches minces sont effectuées sur gel de silice (Merk, support aluminium, 60F254). Les plaques sont révélées par exposition sous UV, puis par trempage dans une solution éthanolique d'acide sulfurique à 10 % contenant 1 % de vanilline, ou dans une solution de ninhydrine à 2 % dans EtOH dans le cas des composés aminés. La révélation est effectuée par chauffage à 200 °C durant quelques secondes.

Les spectres de RMN sont enregistrés sur un appareil Bruker Avance-400 ( $^1\text{H}$  : 400 MHz ;  $^{13}\text{C}$  : 100 MHz). Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par référence au tétraméthylsilane. Les abréviations utilisées sont : m (multiplet) ; s (singulet) ; d (doublet) ; t (triplet); dd (doublet dédoublé) ; ddd (doublet dédoublé dédoublé) ; q (quadruplet) ; quint (quintuplé) ; h (hexuplé).

Les spectres de masse sont réalisés sur un appareil Q-Tof Micro de chez MicroMass équipé du module d'ionisation par électrospray.

Les spectres infra-rouge sont réalisés sur un appareil FT IR Paragon 880 PERKIN ELMER.

Les points de fusion sont mesurés à l'aide d'un microscope REICHERT 2849223.

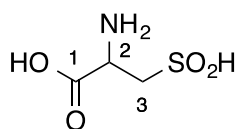
Les analyses HPLC sont effectuées à 10 °C en utilisant une colonne Crownpack CR (Daicel, 15 x 0,5 cm) avec une solution de  $\text{HClO}_4$  à pH = 2, un débit de 1,2 mL/min et une détection à 205 nm.

Les analyses spectrophotométriques sont effectuées sur un lecteur de microplaque Safire<sup>2</sup> de chez TECAN. Les analyses en UV/Vis sont effectuées en plaques Greiner 96 puits transparentes à fond plat (ref. 655101). Les analyses fluorométriques sont réalisées en plaques Thermo 96 puits opaques noires à fond plat (ref. 611F96BK).

## 2 Synthèse chimique

### 2.1 Synthèse des donneurs

#### 2.1.1 Synthèse de l'acide cystéine sulfinique (ACS)



acide cystéine sulfinique (ACS)

$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_4\text{S}$  – 153,15 g/mol – ACS

À une solution de L- ou D-cystine (30,0 g ; 0,13 mol) dans de l'acide formique 95 % (600 mL) est ajouté de l'acide chlorhydrique 37 % (25,0 mL). Une solution de peroxyde d'hydrogène à 10 M (25,6 mL ; 256 mmol) est ensuite additionnée au mélange en maintenant la température du milieu comprise entre 17 et 23 °C. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 h puis concentré sous pression réduite.

Les traces d'acides sont éliminées par 3 ajouts et évaporations successives d'eau (3 x 100 mL). On ajoute alors une solution ammoniacale à 15 % (130 mL). Le milieu réactionnel est placé sous agitation pendant 4 h à température ambiante. Le précipité formé (cystine) est filtré sur un verre fritté de porosité 3 et lavé avec de l'eau (2 x 50,0 mL). Le filtrat est concentré sous pression réduite et les traces d'ammoniaque sont éliminées par 3 ajouts et évaporations successives d'eau (3 x 100 mL). Le produit est repris dans de l'eau (40 mL) puis déposé sur résine Dowex 50WX8 200-400 Mesh échangeuse de cations équilibrée sous forme H<sup>+</sup>. Le produit est élué avec de l'eau. Les fractions contenant l'ACS sont rassemblées et concentrées sous pression réduite jusqu'à obtenir un volume d'environ 40 mL. Le produit est, pour finir, déposé sur une résine Dowex 1X8 200-400 Mesh échangeuse d'anions équilibrée sous forme acétate. La colonne est lavée avec une solution d'acide acétique à 0,5 M (500 mL) et l'ACS est enfin élué avec une solution d'acide formique à 1 M (5 L). Les fractions contenant l'ACS sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. L'ACS est récupéré sous la forme d'un solide cristallin blanc (17,9 g ; 70 %).

RMN<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) : δ 4,36 (1H, dd, *J* = 9,0 et 3,8 Hz, H<sup>2</sup>), 2,85 (1H, dd, *J* = 14,1 et 3,8 Hz, H<sup>3a</sup>), 2,69 (1H, dd, *J* = 14,1 et 9,0 Hz, H<sup>3b</sup>).

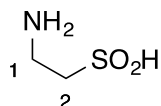
RMN<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O) : δ 171,3 (C<sup>1</sup>), 56,4 (C<sup>3</sup>), 47,8 (C<sup>2</sup>).

PF : 93 °C

IR (cm<sup>-1</sup>) : 3300-2500 (ν NH), 1732 (ν C=O).

HRMS (ESI<sup>-</sup>) *m/z* : [M-H]<sup>-</sup> : calculé pour (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>4</sub>S) 152,0018 ; exp. 152,0008.

### 2.1.2 Synthèse de l'hypotaurine (HPT)



Acide 2-aminoéthane-1-sulfonique

C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>S – 109,14 g/mol – **HPT**

À une solution de chlorhydrate de cystamine (10,0 g ; 44,4 mmol) dans de l'acide formique 95 % (230 mL) est ajouté de l'acide chlorhydrique à 37 % (9,0 mL). Une solution de peroxyde d'hydrogène à 10 M (10,7 mL ; 107 mmol) est ensuite additionnée au mélange en maintenant la température du milieu entre 17 et 23 °C. Le milieu



réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 h puis concentré sous pression réduite. Les traces d'acide sont éliminées par 3 ajouts et évaporations successives d'eau (3 x 100 mL). Le résidu est dissout dans l'eau (22,0 mL) et une solution d'ammoniaque à 30 % (22,0 mL) est ajoutée. Le milieu réactionnel est agité pendant 4 h à température ambiante. La solution est concentrée sous pression réduite et les traces d'ammoniaque sont éliminées par 3 ajouts et évaporations successives d'eau (3 x 100 mL). Le produit est repris dans de l'eau (10,0 mL) et le pH de la solution est ajusté à 11 avec une solution de soude concentrée. La solution est déposée sur résine Dowex 50WX8 échange de cations, équilibrée sous forme H<sup>+</sup>. L'HPT est éluée avec de l'eau (2 L) et concentrée sous pression réduite jusqu'à obtenir un solide cristallin légèrement jaune. (4,9 g ; 75 %).

RMN<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) : δ 3,22 (1H, d, J = 6,4 Hz H<sup>1</sup>), 2,51 (1H, d, J = 6,8 Hz, H<sup>2</sup>).

RMN<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O) : δ 55,4 (C<sup>2</sup>), 33,4 (C<sup>1</sup>).

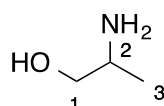
PF : 186 °C

IR (cm<sup>-1</sup>) : 3200-2500 (ν NH).

HRMS (ESI<sup>+</sup>) m/z : [M+H]<sup>+</sup> : calculé pour (C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>S) 110,0276; exp. 110,0279.

## 2.1.3 Synthèse de la méthylhypotaurine (MHPT)

### 2.1.3.1 Synthèse du composé 3



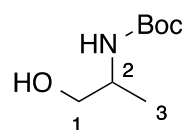
2-aminopropan-1-ol

C<sub>3</sub>H<sub>9</sub>NO – 75,11 g/mol – 3

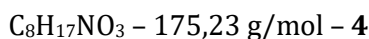
À une solution de LiAlH<sub>4</sub> (10,0 g ; 0,26 mol) dans du THF (350 mL) refroidie à 0 °C est ajouté de la L- ou D-alanine (11,8 g ; 0,13 mol). Le mélange est chauffé à reflux pendant 16 h. Le mélange est refroidit à température ambiante et une solution saturée de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 mL) est ajoutée. Le milieu réactionnel est ensuite filtré et le précipité est lavé avec du THF (4 x 50,0 mL). Le filtrat est concentré sous pression réduite et le produit **3** est séché sous vide (7,3 g ; 75 %).

RMN<sup>1</sup>H (DMSO-D<sub>6</sub>) : δ 4,91 (1H, s, OH), 3,19 (1H, dd, J = 10,3 et 5,1 Hz, H<sup>1a</sup>), 3,08 (1H, dd, J = 10,3, 6,9 Hz, H<sup>1b</sup>), 2,74 (1H, m, H<sup>2</sup>), 0,88 (3H, d, J = 6,5 Hz, H<sup>3</sup>).

### 2.1.3.2 Synthèse du composé 4



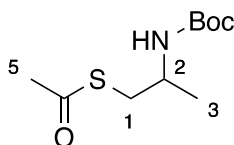
(1-hydroxypropan-2-yl)carbamate de *tert*-butyle



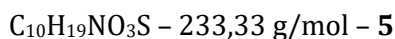
À une solution de composé **3** (5 g ; 66,6 mmol) dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 mL) refroidie à 0 °C est ajouté goutte à goutte du dicarbonate de di-*tert*-butyle (13,8 g ; 63,2 mmol) en solution dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10,0 mL). Après retour à température ambiante le milieu réactionnel est agité pendant 90 min. Le mélange réactionnel est dilué avec du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , puis lavé avec une solution d'acide citrique à 20 % (3 x 40 mL) puis avec une solution de NaCl saturée (60 mL). La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  et concentrée sous pression réduite. La phase aqueuse est extraite à nouveau avec du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 50,0 mL) et la seconde phase organique est lavée de la même façon que la précédente. Après séchage sur  $\text{MgSO}_4$  et concentration sous pression réduite, le produit de la seconde phase organique est rassemblé avec celui de la première et séché par évaporation sous pression réduite (pompe à palettes). Le produit **4** est obtenu sous forme d'une huile incolore qui cristallise à -20 °C (10,5 g ; 90 %).

RMN<sup>1</sup>H ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  4,64 (1H, s, NH), 3,76 (1H, m, H<sup>2</sup>), 3,63 (1H, dd,  $J = 10,9$  et 3,8 Hz, H<sup>1a</sup>), 3,50 (1H, dd,  $J = 10,9$  et 6,2 Hz, H<sup>1b</sup>), 2,20 (1H, s, OH), 1,44 (9H, s, tBu), 1,14 (3H, d,  $J = 6,8$  Hz, H<sup>3</sup>).

### 2.1.3.3 Synthèse du composé 5



(1-thioacétylpropan-2-yl)carbamate de *tert*-butyle

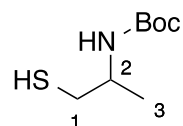


À une solution de triphénylphosphine (30,4 g ; 0,12 mol) dans du THF anhydre (175 mL) refroidie à 5 °C est ajouté de l'azodicarboxylate de diisopropyle (22,8 mL ; 0,12 mol). Le mélange est agité sous atmosphère inerte (Argon) à 5 °C pendant 30 min. Un mélange d'acide thioacétique (8,25 mL ; 0,12 mol) et de composé **4** (10,2 g ; 57,9 mmol)

en solution dans du THF anhydre (90 mL) sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une canule et d'une ampoule à brome. Le mélange est placé sous agitation à 5 °C pendant 16 h puis concentré sous pression réduite. De l'éther diéthylique (200 mL) est ajouté et le précipité formé est filtré sur un verre fritté de porosité 3. Le filtrat est concentré sous pression réduite et un mélange Cyclohexane/AcOEt (90 mL/10 mL) est ajouté. Le précipité formé est filtré sur un verre fritté de porosité 3 et le filtrat est concentré sous pression réduite. Le produit est repris dans un mélange Cyclohexane/AcOEt (90 mL/10 mL) puis purifié par chromatographie éclair sur silice (éluant Cyclohexane/AcOEt : 8/2). Le produit **5** est obtenu en mélange avec des dérivés du DIAD et un rendement de 53% calculé par RMN<sup>1</sup>H.

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ 4,52 (1H, s, NH), 3,86 (1H, m, H<sup>2</sup>), 3,04 (2H, m, H<sup>1</sup>), 2,35 (3H, s, H<sup>5</sup>), 1,43 (9H, s, tBu), 1,16 (3H, d, *J* = 6,7 Hz, H<sup>3</sup>).

#### 2.1.3.4 Synthèse du composé **6**



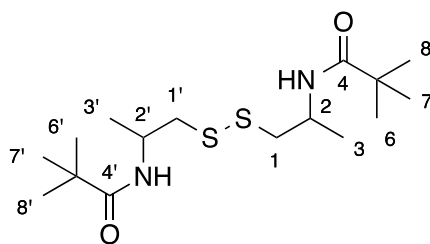
(1-mercaptopropan-2-yl)carbamate de *tert*-butyle

C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>S - 191,29 g/mol - **6**

À une solution de composé **5** (30,8 mmol) dans du MeOH (100 mL) sont ajoutés de l'eau (100 mL) et une solution de LiOH 1 M (82,0 mL). Après 1 h d'agitation le méthanol est évaporé sous pression réduite et le produit est extrait avec de l'AcOEt (5 x 100 mL). La phase organique est lavée avec une solution de NaCl saturée (100 mL) et séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrée sous pression réduite. Après séchage sous vide, le produit **6** est obtenu sous forme cristalline avec des dérivés du DIAD et un rendement quantitatif.

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ 4,63 (1H, s, NH), 3,84 (1H, m, H<sup>2</sup>), 2,96 (1H, m, H<sup>1a</sup>), 2,65 (1H, dd, *J* = 8,7 et 5,1 Hz, H<sup>1b</sup>), 1,44 (9H, s, tBu), 1,18 (3H, d, *J* = 6,7 Hz, H<sup>3</sup>).

### 2.1.3.5 Synthèse du composé 7



(disulfanediybis(propane-1,2-diyl))dicarbamate de di-*tert*-butyle

$C_{16}H_{32}N_2O_4S_2$  – 380,56 g/mol – 7

À une solution de composé 6 (30,8 mmol) dans du MeOH (350 mL) est ajouté du NaI (0,9 g ; 6,0 mmol). Une solution de peroxyde d'hydrogène 10 M (7,0 mL ; 70 mmol) est ensuite ajoutée goutte à goutte, et le mélange est agité pendant 90 min à température ambiante. Le milieu réactionnel est refroidi à 0 °C et une solution de  $Na_2SO_3$  2 M (16,0 mL) est ajoutée par petites portions. Le mélange est concentré sous pression réduite et repris dans de l'AcOEt (400 mL). La phase organique est lavée avec de l'eau (2 x 300 mL), une solution de NaCl saturée (100 mL), séchée sur  $MgSO_4$ , puis concentrée sous pression réduite. Le résidu est dissous dans 500 mL d'un mélange Cyclohexane/AcOEt (3/2, v/v) chauffé à 50 °C. Le mélange est concentré sous pression réduite à 50 °C jusqu'à atteindre un volume de 400 mL puis refroidi à 0 °C. Le mélange est enfin filtré sur fritté de porosité 3 et le précipité est lavé avec du cyclohexane froid (4 x 50,0 mL). Le filtrat est concentré sous pression réduite et le produit 7 est obtenu sous la forme d'un solide cristallin couleur crème (4,7 g ; 40 %).

RMN<sup>1</sup>H ( $CDCl_3$ ) :  $\delta$  4,88 (2 x 1H, s, NH), 3,93 (2 x 1H, m, H<sup>2</sup> et H<sup>2'</sup>), 2,95 (2 x 1H, m, H<sup>1a</sup> et H<sup>1a'</sup>), 2,75 (2 x 1H, dd,  $J = 13,6$  et  $6,2$  Hz, H<sup>1b</sup> et H<sup>1b'</sup>), 1,42 (2 x 9H, s, tBu), 1,21 (2 x 3H, d,  $J = 6,7$  Hz, H<sup>3</sup> et H<sup>3'</sup>).

RMN<sup>13</sup>C ( $CDCl_3$ ) :  $\delta$  155,2 (C<sup>4</sup> et C<sup>4'</sup>), 79,3 (C<sup>5</sup> et C<sup>5'</sup>), 46,1 (C<sup>2</sup> et C<sup>2'</sup>), 28,5 (C<sup>1</sup> et C<sup>1'</sup>), 26,9 (tBu), 19,6 (C<sup>3</sup> et C<sup>3'</sup>).

### 2.1.3.6 Synthèse de la MHPT

acide 2-aminopropane-1-sulfinique

$C_3H_9NO_2S$  – 123,17 g/mol – **MHPT**

À une solution de composé **7** (4,7 g ; 12,4 mmol) dans de l'acide formique à 95 % (81 mL) est ajouté de l'acide chlorhydrique à 37 % (3,2 mL). Une solution de peroxyde d'hydrogène à 10 M (3,8 mL ; 38 mmol) est ensuite additionnée au mélange et la température du milieu est stabilisée à 20°C. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 h puis concentré sous pression réduite. Les traces d'acide sont éliminées par 4 ajouts et évaporations successives d'eau (4 x 50 mL). Au résidu sont ensuite ajoutées de l'eau (8 mL) et une solution d'ammoniaque à 30 % (8 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 5 h à température ambiante. Le filtrat est concentré sous pression réduite et les traces d'ammoniaque sont éliminées par 3 ajouts et évaporations successives d'eau (30,0 mL). Le résidu est repris dans de l'eau (5 mL) et le pH de la solution est ajusté à 11 avec une solution de soude concentrée. La solution est déposée sur résine Dowex 50WX8 (50 mL), équilibrée sous forme H<sup>+</sup>. La MHPT est éluée avec de l'eau (1,5 L) et la solution est concentrée sous pression réduite jusqu'à obtenir un solide cristallin légèrement jaune (1,2 g ; 79 %).

RMN<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  3,71 (1H, m, H<sup>2</sup>), 2,55 (1H, dd,  $J = 13,6$  et  $5,2$  Hz, H<sup>1a</sup>), 2,45 (1H, dd,  $J = 13,6$  et  $8,0$  Hz, H<sup>1b</sup>), 1,31 (3H, d,  $J = 6,8$  Hz, H<sup>3</sup>).

RMN<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  62,0 (C<sup>1</sup>), 43,2 (C<sup>2</sup>), 18,4 (C<sup>3</sup>).

PF : 194 °C

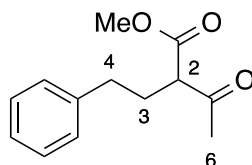
IR (cm<sup>-1</sup>) : 3200-2600 ( $\nu$  NH).

HRMS (ESI<sup>-</sup>) m/z : [M-H]<sup>-</sup> : calculé pour (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>3</sub>S) 122,0276 ; exp. 122,0267.

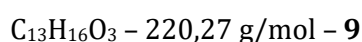
## 2.2 Synthèse des accepteurs

### 2.2.1 Synthèse de l'acide 2-oxo-4-phénylbutanoïque (OPBA)

#### 2.2.1.1 Synthèse du composé 9



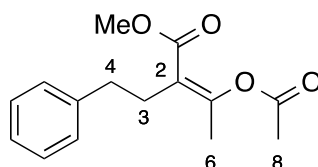
2-acétyl-4-phénylbutanoate de méthyle



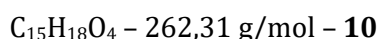
À une suspension de NaH (5,7 g ; 0,24 mol) dans le THF (342 mL) est ajoutée l'acétoacétate d'éthyle (13,9 mL ; 0,11 mol) pendant 1 h à 0°C. Après retour à température ambiante, l'agitation est poursuivie pendant 1 h. On ajoute alors du bromure de phényléthyle (17,4 mL ; 0,13 mol) goutte à goutte, et le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 90 h. Après refroidissement du mélange à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué par ajout de 60 mL d'eau, puis le produit est extrait avec de l'AcOEt (2 x 50 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl (2 x 20 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, puis concentrée sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair sur silice (éluant Cylo/AcOEt : 9/1). Le produit **9** est isolé sous la forme d'une huile jaune (7,3 g ; 30 %).

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7,24 (5H, m, H<sup>ar</sup>), 3,74 (3H, s, OMe), 3,45 (1H, t,  $J = 7,2$  Hz, H<sup>2</sup>), 2,63 (2H, m, H<sup>4</sup>), 2,19 (2H, m, H<sup>3</sup>), 2,21 (3H, s, H<sup>6</sup>).

#### 2.2.1.2 Synthèse du composé 10



3-acétoxy-2-phénéthylbut-2-énoate de méthyle

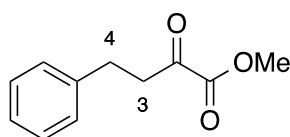


À une solution de **9** (4,0 g ; 18,2 mmol) dans 30 mL de pyridine refroidie à 0°C sont ajoutés goutte à goutte du chlorure d'acétyle (1,9 mL ; 27,3 mmol). Après agitation à température ambiante durant 48 h, le milieu est dilué avec de l'éther diéthylique (100 mL). La phase organique est lavée successivement avec de l'eau (70 mL), une solution de

CuSO<sub>4</sub> saturée (70 mL), et une solution de NaCl saturée (50 mL). La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> et concentrée sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair (éluant Cyclo/AcOEt : 9/1). Le produit **10** est isolé sous forme d'huile jaune (1,6 g ; 34 %).

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ 7,24 (5H, m, H<sup>ar</sup>), 3,74 (3H, s, OMe), 2,68 (2H, m, H<sup>4</sup>), 2,54 (2H, m, H<sup>3</sup>), 2,29 (3H, s, H<sup>6</sup>), 2,18 (3H, s, H<sup>8</sup>).

### 2.2.1.3 Synthèse du composé **11**



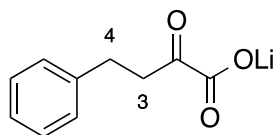
2-oxo-4-phénylbutanoate de méthyle

C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub> – 192,21 g/mol – **11**

Une solution du composé **10** (1,3 g ; 5,0 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) est refroidie à -78 °C et traitée par un flux d'ozone jusqu'à ce que la solution devienne bleue (3 h). Après élimination de l'excès d'ozone par un flux d'O<sub>2</sub> (jusqu'à décoloration), du sulfure de diméthyle (0,6 mL ; 8,1 mmol) est ajouté. Après agitation pendant 18h, la solution est concentrée sous pression réduite, puis de l'AcOEt (50 mL) est ajouté. La phase organique est lavée avec de l'eau (2 x 50 mL) puis avec une solution de NaCl saturée (25 mL). La phase organique est enfin séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrée sous pression réduite. Le produit **11** est obtenu sous forme d'une huile incolore (836 mg ; 87 %).

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ 7,33 (5H, m, H<sup>ar</sup>), 3,90 (3H, s, OMe), 3,24 (2H, t, J = 7,2 Hz, H<sup>3</sup>), 3,01 (2H, t, J = 8,0 Hz, H<sup>4</sup>).

### 2.2.1.4 Synthèse de l'OPBA



2-oxo-4-phénylbutanoate de lithium

C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>LiO<sub>3</sub> – 184,12 g/mol – **OPBA**

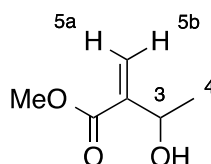
Une solution du composé **11** (800 mg ; 4,16 mmol) dans 100 mL d'un mélange Eau/méthanol (2/1, v/v) est ajusté à pH = 7 avec une solution de LiOH. Le pH est ensuite régulé à 8 au pH-stat à l'aide d'une solution de LiOH à 0,2 M (20,8 mL) pendant 2 h. La

solution est lyophilisée et l'OPBA est obtenu sous la forme d'une poudre blanche. L'analyse RMN montre que l'OPBA est pur à 65 %.

RMN<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  7,27 (5H, m, H<sup>ar</sup>), 3,07 (2H, t,  $J = 7,2$  Hz, H<sup>3</sup>), 2,92 (2H, t,  $J = 7,2$  Hz, H<sup>4</sup>).

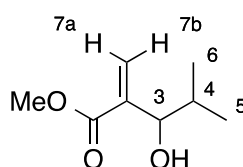
## 2.2.2 Synthèse des composés $\beta$ -hydroxylés

### 2.2.2.1 Synthèse des composés **12a**, **12b** et **12c**



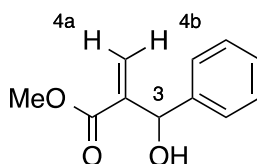
3-hydroxy-2-méthylènebutanoate de méthyle

C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub> - 130,14 g/mol - **12a**



3-hydroxy-4-méthyl-2-méthylènepentanoate de méthyle

C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub> - 158,20 g/mol - **12b**



3-hydroxy-3-phényl-2-méthylènepropanoate de méthyle

C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub> - 192,21 g/mol - **12c**

À un mélange d'acrylate de méthyle (18,1 mL ; 0,2 mol) et d'aldéhyde (**12a** ; acétaldéhyde ; 16,8 mL ; 0,3 mol / **12b** ; 2-méthylpropanal ; 27,4 mL ; 0,3 mol / **12c** ; benzaldéhyde ; 30,4 mL ; 0,3 mol) est ajouté du DABCO (1,12 g ; 10 mmol). Le mélange est agité pendant 14 jours à température ambiante. Le milieu réactionnel est extrait avec 50 mL d'AcOEt puis lavé avec une solution d'HCl à 0,1 M (2 x 50 mL). La phase organique est lavée successivement avec une solution de NaHCO<sub>3</sub> saturée (30 mL) puis une solution de NaCl saturée (30 mL). La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrée sous pression réduite. Le composé **12a** est purifié par distillation à 82 °C sous 10 mm Hg. Le composé **12b** est purifié par distillation à 49 °C sous 0,8 mm Hg. Le



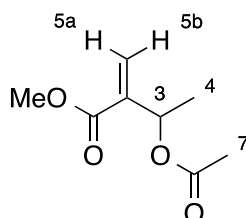
composé **12c** est purifié par distillation à 133 °C sous 0,6 mm Hg. Les produits sont récupérés sous la forme d'huiles incolores (**12a** ; 21,3 g, 82 % / **12b** ; 12,3 g ; 39 % / **12c** ; 11,5 g ; 30 %).

**12a** : RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 6,15 (1H, s, H<sup>5a/5b</sup>), 5,80 (1H, s, H<sup>5a/5b</sup>), 4,55 (1H, q, *J* = 10,0 Hz, H<sup>3</sup>), 3,70 (3H, s, OMe), 3,45 (1H, s, OH), 1,25 (3H, d, *J* = 10,0 Hz, H<sup>4</sup>).

**12b** : RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ 6,21 (1H, s, H<sup>7a/7b</sup>), 5,72 (1H, s, H<sup>7a/7b</sup>), 4,04 (1H, d, *J* = 6,7 Hz, H<sup>3</sup>), 3,72 (3H, s, OMe), 1,86 (1H, m, H<sup>4</sup>), 0,89 (3H, d, *J* = 6,7 Hz, H<sup>5</sup>), 0,83 (3H, d, *J* = 6,8 Hz, H<sup>6</sup>).

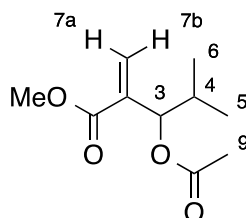
**12c** : RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ 7,33 (5H, m, H<sup>ar</sup>), 6,34 (1H, s, H<sup>4a/4b</sup>), 5,83 (1H, s, H<sup>4a/4b</sup>), 5,57 (1H, s, H<sup>3</sup>), 3,73 (3H, s, OMe).

### 2.2.2.2 Synthèse des composés **13a**, **13b** et **13c**



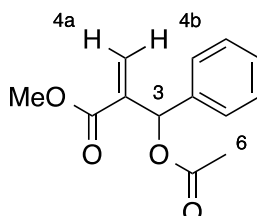
3-acétoxy-2-méthylènebutanoate

C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> – 172,18 g/mol – **13a**



3-acétoxy-4-méthyl-2-méthylène-pentanoate de méthyle

C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub> – 200,23 g/mol – **13b**



3-acétoxy-3-phényl-2-méthylène-propanoate de méthyle

C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub> – 234,25 g/mol – **13c**

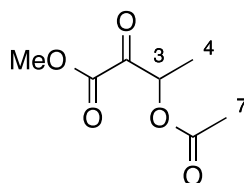
À une solution de **12a** (5 g ; 38,4 mmol), de **12b** (5 g ; 31,6 mmol) ou de **12c** (5 g ; 26,0 mmol) dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) à 0 °C est ajouté goutte à goutte de la pyridine (**12a** ; 4,0 mL ; 50,0 mmol / **12b** ; 3,3 mL ; 41,1 mmol / **12c** ; 2,4 mL ; 34 mmol) et du chlorure d'acétyle (**12a** ; 3,57 mL ; 50,0 mmol / **12b** ; 2,9 mL ; 41,1 mmol / **12c** ; 2,7 mL ; 34 mmol). Après agitation 1 h à température ambiante, le milieu réactionnel est lavé avec une solution aqueuse de HCl 1 M (2 x 25 mL), puis une solution aqueuse saturée de NaCl (50 mL), séché sur MgSO<sub>4</sub> et enfin concentré sous pression réduite. Les produits **13a**, **13b** et **13c** sont isolés sous la forme d'une huile incolore (**13a** ; 5,9 g ; 89 % / **13b** ; 5,1 g ; 80 % / **13c** ; 5,5 g ; 91 %).

**13a** : RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ 6,28 (1H, s, H<sup>5a/5b</sup>), 5,81 (1H, s, H<sup>5a/5b</sup>), 5,70 (1H, q, J = 6,8 Hz, H<sup>3</sup>), 3,77 (3H, s, OMe), 2,07 (3H, s, H<sup>7</sup>), 1,40 (3H, d, J = 6,5 Hz, H<sup>4</sup>).

**13b** : RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ 6,32 (1H, d, J = 0,9 Hz, H<sup>7a/7b</sup>), 5,71 (1H, t, J = 1,0 Hz, H<sup>7a/7b</sup>), 5,46 (1H, dd, J = 5,5 et 0,8 Hz, H<sup>3</sup>), 3,77 (3H, s, OMe), 2,08 (3H, s, J = 6,8 Hz, H<sup>9</sup>), 0,92 (3H, d, J = 6,9 Hz, H<sup>5</sup>), 0,88 (3H, d, J = 6,8 Hz, H<sup>6</sup>).

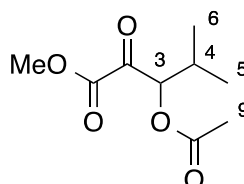
**13c** : RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ 7,29 (5H, m, H<sup>ar</sup>), 6,64 (1H, s, H<sup>3</sup>), 6,35 (1H, s, H<sup>4a/4b</sup>), 5,82 (1H, s, H<sup>4a/4b</sup>), 3,65 (3H, s, OMe), 2,05 (3H, s, H<sup>6</sup>).

### 2.2.2.3 Synthèse des composés **14a**, **14b** et **14c**



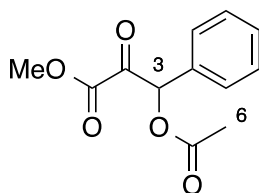
3-acétoxy-2-oxobutanoate de méthyle

C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> - 174,15 g/mol - **14a**

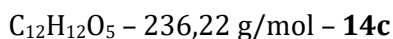


3-acétoxy-4-méthyl-2-oxopentanoate de méthyle

C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub> - 202,21 g/mol - **14b**



3-acétoxy-2-oxo-3-phénylpropanoate de méthyle



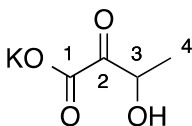
Une solution de **13a** (5,0 g ; 29,0 mmol), de **13b** (5,0 g ; 25,0 mmol) ou **13c** (5,0 g ; 21,0 mmol) dans le  $CH_2Cl_2$  (100 mL) est refroidie à  $-78\text{ }^\circ C$  et traitée par un flux d'ozone jusqu'à ce que la solution devienne bleue (3 h). Après élimination de l'excès d'ozone par un flux d' $O_2$  (jusqu'à décoloration), du sulfure de diméthyle (2,3 mL ; 31,5 mmol) est ajouté au milieu réactionnel. Le mélange est agité à température ambiante pendant 16 h. Le milieu réactionnel est ensuite extrait avec de l'AcOEt (100 mL). La phase organique est lavée avec de l'eau (2 x 50 mL), puis avec une solution saturée de NaCl (25 mL). La phase organique est ensuite séchée sur  $MgSO_4$  avant d'être concentrée sous pression réduite. Le produit **14a** est purifié par chromatographie éclair sur silice (éluant Cyclo/AcOEt : 9/1 => 5/5). Les produits **14a**, **14b** et **14c** sont isolés sous la forme d'huiles incolores (**13a** ; 3,2 g ; 63 % / **14b** ; 4,7 g ; 92 % / **14c** ; 4,1 g ; 82 %).

**14a** : RMN $^1H$  ( $CDCl_3$ ) :  $\delta$  5,62 (1H, q,  $J = 7,1$  Hz,  $H^3$ ), 3,90 (3H, s, OMe), 2,12 (s, 3H,  $H^7$ ), 1,50 (3H, d,  $J = 7,1$  Hz,  $H^4$ ).

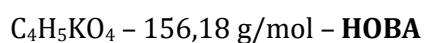
**14b** : RMN $^1H$  ( $CDCl_3$ ) :  $\delta$  5,38 (1H, d,  $J = 4,8$  Hz,  $H^3$ ), 3,86 (3H, s, OMe), 2,30 (1H, m,  $H^4$ ), 2,10 (3H, s,  $H^9$ ), 1,00 et 0,91 (2 x 3H, 2 x d,  $J = 7,2$  Hz,  $H^5$  et  $H^6$ ).

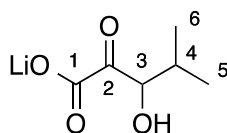
**14c** : RMN $^1H$  ( $CDCl_3$ ) :  $\delta$  7,43 (5H, m,  $H^{ar}$ ), 6,66 (1H, s,  $H^3$ ), 3,81 (3H, s, OMe), 2,19 (3H, s,  $H^6$ ).

#### 2.2.2.4 Synthèse du HOBA, HMOP et HOPP



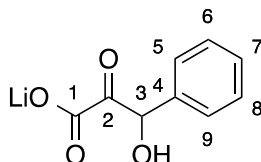
3-hydroxy-2-oxobutanoate de potassium





3-hydroxy-4-méthyl-2-oxopentanoate de lithium

$C_6H_9LiO_4$  - 152,07 g/mol - **HMOP**



3-hydroxy-2-oxo-3-phénylpropanoate de lithium

$C_9H_7LiO_4$  - 186,09g/mol - **HOPP**

Une solution de **14a** (2,0 g ; 11,5 mmol), de **14b** (2,0 g ; 9,9 mmol) ou de **14c** (1,0 g ; 4,2 mmol) dans un mélange eau/méthanol (**14a** ; 75 mL/25 mL / **14b** ; 64 mL/16 mL / **14c** ; 32 mL/8 mL) est ajusté à pH = 7 au pH-mètre avec une solution de LiOH ou de KOH à 0,2 M. Le pH est ensuite régulé à 8 pour **14c** et à 10 pour **14a** et **14b** à l'aide d'un pH-stat, avec une solution de LiOH ou de KOH à 0,2 M (**14a** ; 126,9 mL / **14b** ; 98,9 mL / **14c** ; 42,2 mL) pendant 18 h. Le HOBA, le HMOP, et le HOPP sont ensuite lyophilisés et isolés sous la forme d'une poudre légèrement jaune avec un rendement quantitatif.

**HOBA** : RMN<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  4,75 (1H, q,  $J = 7,3$  Hz, H<sup>3</sup>), 1,30 (1H, d,  $J = 7,2$  Hz, H<sup>4</sup>),

RMN<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  206,0 (C<sup>2</sup>), 170,0 (C<sup>1</sup>), 70,3 (C<sup>3</sup>), 17,7 (C<sup>4</sup>).

**HOBA.H<sub>2</sub>O** : RMN<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) : 3,86 (1H, q,  $J = 6,5$  Hz, H<sup>3</sup>), 1,05 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H<sup>4</sup>).

RMN<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  177,0 (C<sup>1</sup>), 95,6 (C<sup>2</sup>), 70,2 (C<sup>3</sup>), 15,8 (C<sup>4</sup>).

IR (cm<sup>-1</sup>) : 3500-2900 ( $\nu$  OH), 1624 ( $\nu$  C=O, cétone), 1570 ( $\nu$  C=O, carboxylate).

HRMS (ESI<sup>-</sup>) m/z : [M-K]<sup>-</sup> : calculé pour (C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>4</sub>) 117,0188 ; exp. 117,0194.

**HMOP** : RMN<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  4,79 (1H, d,  $J = 3,2$  Hz, H<sup>3</sup>), 2,22 (1H, m, H<sup>4</sup>), 1,05 et 0,82 (2 x 3H, 2 x d,  $J = 7,2$  et 6,8 Hz, H<sup>5</sup> et H<sup>6</sup>).

RMN<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  206,0 (C<sup>2</sup>), 170,4 (C<sup>1</sup>), 78,6 (C<sup>3</sup>), 29,9 (C<sup>4</sup>), 18,7 et 15,0 (C<sup>5</sup> et C<sup>6</sup>).

IR (cm<sup>-1</sup>) : 3500-2900 ( $\nu$  OH), 1715 ( $\nu$  C=O, cétone), 1579 ( $\nu$  C=O, carboxylate).

HRMS (ESI<sup>-</sup>) m/z : [M-Li]<sup>-</sup> : calculé pour (C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub>) 145,0501 ; exp. 145,0493.

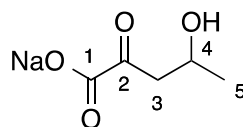
**HOPP** : RMN<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  7,37 (5H, m, H<sup>ar</sup>), 5,81 (1H, s, H<sup>3</sup>).

RMN<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O) : δ 202,0 (C<sup>2</sup>), 168,8 (C<sup>1</sup>), 135,5 (C<sup>4</sup>), 129,2 (C<sup>ar</sup>), 127,9 (C<sup>ar</sup>), 76,9 (C<sup>3</sup>).

IR (cm<sup>-1</sup>) : 3400-3000 (ν OH), 1710 (ν C=O, cétone), 1577 (ν C=O, carboxylate).

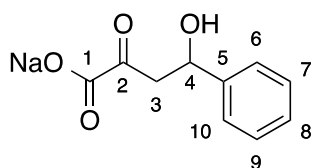
HRMS (ESI<sup>-</sup>) m/z : [M-Li]<sup>-</sup> : calculé pour (C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>4</sub>) 179,0334 ; exp. 179,0327.

### 2.2.3 Synthèse des composés γ-hydroxylés



4-hydroxy-2-oxopentanoate de sodium

C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>4</sub> – 154,10 g/mol – **HOP**



4-hydroxy-2-oxo-4-phenylbutanoate de sodium

C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NaO<sub>4</sub> – 216,17 g/mol – **HOPB**

De l'acide oxaloacétique (250 mg ; 1,9 mmol) est dissous dans une solution de NaOH 1 M (3,5 mL) puis le pH est ajusté à 8 par addition de NaOH 0,1 M (environ 3 mL). Après addition d'acétaldéhyde (**HOP** ; 535 µl ; 9,5 mmol) ou de benzaldéhyde (**HOPB** ; 288 µL ; 2,88 mmol), le milieu est agité à température ambiante, jusqu'à consommation complète de l'oxaloacétate (**HOP** ; 4 h / **HOPB** ; 20 h). Le mélange est alors acidifié avec de la résine DOWEX 50WX8 jusqu'à pH = 3 et placé sous agitation pendant 1 h. Le mélange est filtré et le filtrat est neutralisé à pH = 7 à l'aide d'une solution de NaOH 1 M, puis lyophilisé. Les produits **HOP** et **HOPB** sont isolés sous la forme d'un solide blanc (**HOP** ; 205 mg) et jaune (**HOPB** ; 320 mg). L'analyse RMN montre que le solide obtenu à partir de l'acide oxaloacétique et d'acétaldéhyde est constitué de 72 % de **HOP**, 12 % de produit de déshydratation et de 16 % de pyruvate (% molaires). L'analyse RMN montre que le solide obtenu à partir d'acide oxaloacétique et de benzaldéhyde est constitué de 53 % de **HOPB**, 22 % de produit de déshydratation et de 25 % de pyruvate (% molaires).

**HOP** : RMN<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) : δ 4,29 (1H, h, J = 6,4 Hz, H<sup>4</sup>), 2,90 (2H, d, J = 6,4 Hz, H<sup>3</sup>), 1,21 (3H, d, J = 6,4 Hz, H<sup>5</sup>).

RMN<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O) : δ 204,6 (C<sup>2</sup>), 169,8 (C<sup>1</sup>), 63,6 (C<sup>4</sup>), 47,9 (C<sup>3</sup>), 22,1 (C<sup>5</sup>).

IR (cm<sup>-1</sup>) : 3600-2600 (ν OH), 1720 (ν C=O, cétone), 1623 (ν C=O, carboxylate).

HRMS (ESI<sup>-</sup>) m/z : [M-Na]<sup>-</sup> : calculé pour (C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>4</sub>) 131,0344 ; exp. 131,0331.

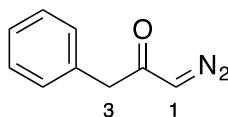
**HOPB** : RMN<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) : δ 7,41 (5H, m, H<sup>ar</sup>), 5,21 (1H, dd, J = 8,2 et 5,2 Hz, H<sup>4</sup>), 3,27 (1H, dd, J = 16,6 et 8,2 Hz, H<sup>3a</sup>), 3,20 (1H, dd, J = 16,6 et 5,2 Hz, H<sup>3b</sup>).

IR (cm<sup>-1</sup>) : 3500-2500 (ν OH), 1722 (ν C=O, cétone), 1621 (ν C=O, carboxylate).

HRMS (ESI<sup>-</sup>) m/z : [M-Na]<sup>-</sup> : calculé pour (C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub>) 193,0501 ; exp. 193,0508.

## 2.2.4 Synthèse de la 1-hydroxy-3-phénylpropan-2-one (HPPO)

### 2.2.4.1 Synthèse du composé 15



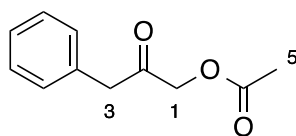
1-diazo-3-phénylpropan-2-one

C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O – 160,18 g/mol – **15**

Une solution de Diazald (8,3 g ; 38,8 mmol) dans de l'éther diéthylique (50 mL) est ajoutée goutte à goutte à une solution de KOH 5M dans un mélange H<sub>2</sub>O/EtOH (1/1, v/v) à 70 °C. Le diazométhane et l'Et<sub>2</sub>O sont codistillés et recueillis à -70°C. À cette solution est ajoutée une solution de chlorure de 2-phénylacétyle (1,3 mL ; 9,7 mmol) dans de l'éther diéthylique (4 mL). Le mélange est agité jusqu'à retour à température ambiante, puis l'excès de diazométhane est chassé par un flux d'Ar et détruit dans un mélange Et<sub>2</sub>O/AcOH (15 mL/15 mL). Le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite puis séché sous un vide poussé. Le résidu est repris dans de l'AcOEt (100 mL) puis lavé avec une solution de NaHCO<sub>3</sub> saturée (100 mL). La phase organique est lavée successivement avec de l'eau (2 x 50,0 mL) et une solution de NaCl saturée, puis séchée sur MgSO<sub>4</sub> et concentrée sous pression réduite. Le produit **15** est alors obtenu avec un rendement quantitatif.

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ 7,28 (5H, m, H<sup>ar</sup>), 5,12 (1H, s, H<sup>1</sup>), 3,62 (1H, s, H<sup>3</sup>).

### 2.2.4.2 Synthèse du composé 16



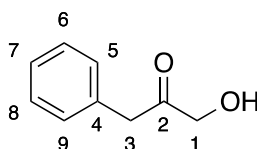
acétate de 2-oxo-3-phénylpropyle

$C_{11}H_{12}O_3$  – 192,21 g/mol – **16**

À une solution de **15** (1,6 g ; 10 mmol) dans du THF anhydre (40 mL) refroidie à 0 °C est ajoutée une solution de HBr à 33 % dans de l'acide acétique (1,6 mL ; 29,1 mmol). Le mélange est agité à 0 °C pendant 15 minutes puis une solution de  $K_2CO_3$  (13,4 g ; 97,0 mmol) et de NaOAc (8,0 g ; 97,0 mmol) dans du DMF (27,0 mL) est ajoutée. Le mélange est agité 1 h à température ambiante puis dilué avec de l'AcOEt (100 mL), lavé avec de l'eau (3 x 50,0 mL), une solution de NaCl saturée (2 x 50,0 mL), et enfin séché sur  $MgSO_4$  puis concentrée sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair sur silice (éluant Cyclo/AcOEt : 8/2) et il est isolé sous la forme d'une huile orangée (0,9 g ; 60 %)

RMN<sup>1</sup>H ( $CDCl_3$ ) :  $\delta$  7,28 (5H, m,  $H^{ar}$ ), 4,69 (2H, s,  $H^1$ ), 3,73 (2H, s,  $H^3$ ), 2,14 (3H, s,  $H^5$ ).

### 2.2.4.3 Synthèse du HPPO



1-hydroxy-3-phénylpropan-2-one

$C_9H_{10}O_2$  – 150,18 g/mol – **HPPO**

Une solution de **16** (0,9 g ; 4,7 mmol) dans un mélange eau/méthanol (36 mL/9 mL) est ajusté à pH = 7 au pH-mètre avec une solution de LiOH à 0,2 M. Le pH est ensuite réglé à 10 à l'aide d'un pH-stat, avec une solution de LiOH à 0,2 M (24 mL) pendant 24 h. Le méthanol est ensuite éliminé sous pression réduite et le milieu est extrait avec de l'acétate d'éthyle (4 x 100 mL). La phase organique est lavée avec une solution de NaCl saturée (2 x 100 mL) puis séchée sur  $MgSO_4$  et concentrée sous pression réduite. Le produit **HPPO** est récupéré sous la forme d'une cire orangée (0,6 g ; 85 %).

RMN<sup>1</sup>H ( $CDCl_3$ ) :  $\delta$  7,30 (5H, m,  $H^{ar}$ ), 4,27 (2H, s,  $H^1$ ), 3,71 (2H, s,  $H^3$ ).

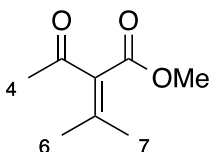
RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : δ 207,4 (C<sup>2</sup>), 132,8 (C<sup>4</sup>), 129,34 (C<sup>6</sup> et C<sup>8</sup>) et 129,0 (C<sup>5</sup> et C<sup>9</sup>), 127,5 (C<sup>7</sup>), 67,7 (C<sup>1</sup>), 45,8 (C<sup>3</sup>).

IR (cm<sup>-1</sup>) : 3427 (ν OH), 1721 (ν C=O).

HRMS (ESI<sup>-</sup>) m/z : [M-H]<sup>-</sup> : calculé pour (C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>) 149,0603 ; exp. 149,0592.

## 2.2.5 Synthèse de l'acide 3,3-diméthyl-2-oxopentanoïque (DMOP)

### 2.2.5.1 Synthèse du composé 17



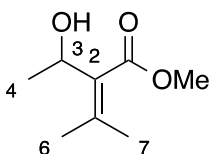
2-acétyl-3-méthylbut-2-enoate de méthyle

C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub> – 156,18 g/mol – **17**

À un mélange d'acétoacétate de méthyle (18,6 mL ; 0,17 mol) et d'acétone (18,9 mL ; 0,26 mol) sont ajoutés du ZnCl<sub>2</sub> (3,5 g ; 25,8 mmol) et de l'anhydride acétique (22,7 mL ; 0,24 mol). Le milieu réactionnel est agité à 50 °C pendant 72 h. La réaction est refroidie à température ambiante et du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (350 mL) est ajouté au mélange. La solution est ensuite lavée avec de l'eau (3 x 50 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub> et concentrée sous pression réduite. Le produit **17** est purifié par chromatographie éclair sur silice (éluant Cylo/AcOEt : 9/1) et obtenu sous la forme d'une huile incolore (4,2 g ; 15 %).

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ 3,73 (3H, s, OMe), 2,25 (3H, s, H<sup>4</sup>), 2,07 et 1,91 (2 x 3H, 2 x s, H<sup>6</sup> et H<sup>7</sup>).

### 2.2.5.2 Synthèse du composé 18



2-(1-hydroxyéthyl)-3-méthylbut-2-enoate de méthyle

C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub> – 158,20 g/mol – **18**

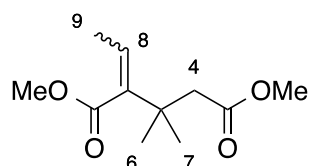
À une solution de **17** (4,1 g ; 26,3 mmol) dans un mélange THF/MeOH (50 mL/6 mL) sont ajoutés du CeCl<sub>3</sub> heptahydraté (9,8 g ; 26,3 mmol) et du NaBH<sub>4</sub> (1,0 g ; 26,3 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante jusqu'à ce que la réaction n'évolue plus. De l'eau (25 mL) est alors ajoutée au mélange et les solvants organiques



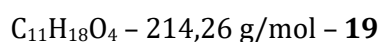
sont évaporés sous pression réduite. Le produit est extrait avec de AcOEt (90,0 mL), lavé successivement avec de l'eau (2 x 20,0 mL) et une solution de NaCl saturée (20,0 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis concentré sous pression réduite. Le produit **18** est purifié par chromatographie éclair sur silice (éluant Cyclo/AcOEt : 7/3) et récupéré sous la forme d'une huile incolore (2,8 g ; 64 %).

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ 4,73 (1H, q, *J* = 6,6 Hz, H<sup>3</sup>), 3,77 (3H, s, OMe), 2,54 (1H, s, OH), 1,87 et 1,82 (2 x 3H, s, H<sup>6</sup> et H<sup>7</sup>), 1,34 (3H, d, *J* = 6,6 Hz, H<sup>4</sup>).

### 2.2.5.3 Synthèse du composé 19



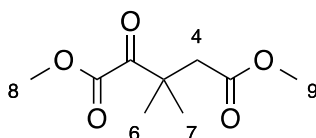
2-éthylidène-3,3-diméthylpentanedioate de diméthyle



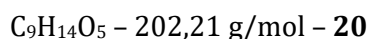
À une solution de **18** (2,3 g ; 14,6 mmol) dans du toluène (25 mL) sont ajoutés de l'orthoacétate de triméthyle (3,5 g ; 3,7 mL) et de l'acide pivalique (150 mg ; 1,5 mmol). Le mélange est porté à reflux pendant 1 h et le méthanol est éliminé par distillation. Le mélange est refroidi à température ambiante puis concentré sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair sur silice (éluant Cyclo/AcOEt : 95/5 -> 90/10) et récupéré sous la forme d'une huile incolore (1,8 g ; 56 %).

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ 5,76 (1H, q, *J* = 7,0 Hz, H<sup>8</sup>), 3,76 et 3,62 (2 x 3H, 2 x s, OMe), 2,53 (2H, s, H<sup>4</sup>), 1,72 (3H, d, H<sup>9</sup>), 1,21 (6H, s, H<sup>6</sup> et H<sup>7</sup>).

### 2.2.5.4 Synthèse du composé 20



3,3-diméthyl-2-oxopentanedioate de diméthyle

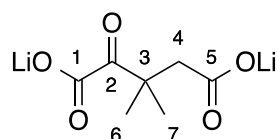


Une solution de **19** (1,4 g ; 6,5 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) est refroidie à -78 °C et traitée par un flux d'ozone jusqu'à ce que la solution devienne bleue (1 h). Après élimination de l'excès d'ozone par un flux d'O<sub>2</sub> (jusqu'à décoloration), du sulfure de

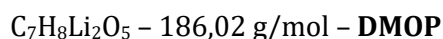
diméthyle (0,7 mL, 9,8 mmol) est ajouté. Le milieu est agité 16 h à température ambiante puis concentré sous pression réduite. Le milieu est repris avec de l'AcOEt (50 mL), lavé avec de l'eau (3 x 20 mL), une solution de NaCl saturée (20 mL), et pour finir séché sur MgSO<sub>4</sub> puis concentré sous pression réduite. Le produit est repris dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) et du sulfure de diméthyle (0,7 mL, 9,8 mmol) est ajouté. Le milieu est agité à température ambiante pendant 16 h puis de la triphénylphosphine (2,6 g ; 9,8 mmol) est ajoutée. Le mélange est agité à température ambiante pendant 48 h puis concentré sous pression réduite. Le résidu est repris avec de l'AcOEt (150 mL) puis la solution est lavée successivement avec de l'eau (2 x 50,0 mL) et une solution de NaCl saturée (50 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrée sous pression réduite. Le produit est enfin purifié par chromatographie éclair sur silice (éluant Cyclo/AcOEt : 8/2) et est obtenu sous la forme d'une huile incolore (1,1 g ; 83 %).

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ 3,85 (3H, s, H<sup>8</sup>), 3,65 (3H, s, H<sup>9</sup>), 2,91 (2H, s, H<sup>4</sup>), 1,31 (2 x 3H, s, H<sup>6</sup> et H<sup>7</sup>).

### 2.2.5.5 Synthèse du DMOP



3,3-diméthyl-2-oxopentanedioate de dilithium



Une solution du composé **20** (1,1 g ; 5,4 mmol) dans un mélange eau/méthanol (36 mL/9 mL) est ajusté à pH = 7 avec une solution de LiOH à 0,2 M. Le pH est ensuite régulé à 10 à l'aide d'un pH-stat, avec une solution de LiOH à 0,2 M (56,0 mL) pendant 18 h. Après évaporation du MeOH sous pression réduite, le résidu est lyophilisé et le produit est isolé sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement quantitatif.

RMN<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) : δ 2,51 (2H, s, H<sup>4</sup>), 1,28 (2 x 3H, s, H<sup>6</sup> et H<sup>7</sup>).

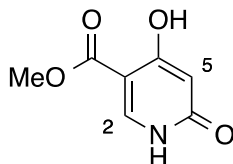
RMN<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O) : δ 212,6 (C<sup>2</sup>), 179,8 (C<sup>5</sup>), 172,4 (C<sup>1</sup>), 46,5 (C<sup>4</sup>), 43,2 (C<sup>3</sup>), 23,7 (C<sup>6</sup> et 7).

IR (cm<sup>-1</sup>) : 1693 (ν C=O, cétone), 1578 (ν C=O, carboxylate).

HRMS (ESI<sup>-</sup>) m/z : [M-2Li+H]<sup>-</sup> : calculé pour (C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>O<sub>5</sub>) 173,0450 ; exp. 173,0446.

## 2.2.6 Synthèse de l'acide 2-(carboxycarbonyl)-4-oxoazetidine-3-carboxylique (COC)

### 2.2.6.1 Synthèse du composé 21



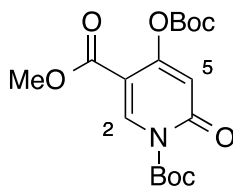
4-hydroxy-6-oxo-1,6-dihydropyridine-3-carboxylate de méthyle

$C_7H_7NO_4$  – 169,14 g/mol – **21**

À une solution de 3-oxoglutarate de diméthyle (21 mL ; 140 mmol) dans de l'anhydride acétique (27,1 mL ; 290 mmol) placée sous atmosphère inerte est ajouté de l'orthoformiate de triméthyle (15,6 mL ; 140 mmol). Le mélange est agité à 135 °C pendant 1 h, refroidi à température ambiante, et concentré sous pression réduite à 70 °C. Le résidu est refroidi à 4 °C et une solution ammoniacale à 15,4 M est ajoutée (23,3 mL). De l'eau (150 mL) est ajoutée au mélange et le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 h. Le mélange est lavé avec de l'AcOEt(6 x 50 mL) et la phase aqueuse est acidifiée à pH = 4 avec une solution d'HCl à 10 %. Le précipité formé est filtré sur une verre fritté de porosité 3, lavé avec de l'eau (3 x 50 mL) puis dispersé dans un mélange toluène/acétone (10/2 ; v/v). Après évaporation des solvants, le produit est recristallisé avec de l'AcOEt. Le produit est enfin séché sous vide et obtenu sous la forme d'un solide cristallin jaune (11,8 g ; 50 %).

RMN<sup>1</sup>H (MeOD) :  $\delta$  8,22 (1H, s, H<sup>2</sup>), 5,84 (1H, s, H<sup>5</sup>), 3,95 (3H, s, OMe).

### 2.2.6.2 Synthèse du composé 22



4-((*tert*-butoxycarbonyl)oxy)-6-oxopyridine-1,3-dicarboxylate de 1-(*tert*-butyle) et de 3-méthyle

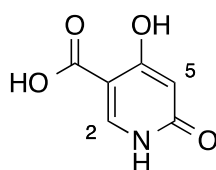
$C_{17}H_{23}NO_8$  – 369,37 g/mol – **22**

À une solution du composé **21** (1,0 g ; 5,9 mmol) et de dicarbonate de di-*tert*-butyle (3,9 g ; 17,7 mmol) dans du DMF anhydre (5,0 mL) sous atmosphère inerte, est

additionnée la triéthylamine (2,4 mL ; 17,7 mmol). Après 24 h d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué avec de l'AcOEt (120 mL), puis lavé à l'eau (4 x 50 mL). La phase organique est lavée avec une solution de NaCl saturée (50 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, puis concentrée sous pression réduite pour donner une huile orange vif. (2,0 g). La RMN indique une pureté molaire d'environ 90 %. Le produit **22** est utilisé sans purification préalable dans l'étape suivante.

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ 8,48 (1H, s, H<sup>2</sup>), 6,25 (1H, s, H<sup>5</sup>), 3,82 (3H, s, OMe), 1,62 (9H, s, tBu), 1,54 (9H, s, tBu).

### 2.2.6.3 Synthèse du composé **23**



acide 4-hydroxy-6-oxo-1,6-dihydropyridine-3-oïque

C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>4</sub> – 155,11 g/mol – **23**

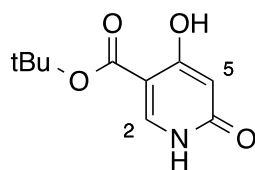
À une solution du composé **21** (2 g ; 11,8 mmol) dans du MeOH (37 mL), est ajoutée une solution de LiOH.H<sub>2</sub>O (1,2 g ; 29,6 mmol) dans H<sub>2</sub>O (27 mL). Après trois heures d'agitation à reflux, le milieu réactionnel est refroidi et le MeOH est évaporé sous pression réduite. La solution aqueuse est acidifiée à pH = 3 avec une solution d'HCl 3 M (10 mL). Le précipité formé est isolé par filtration et lavé avec H<sub>2</sub>O (2 x 20 mL), puis avec de l'acétone (4 x 15,0 mL). Le produit est isolé après séchage sous pression réduite et chauffage (0,1 mmHg ; 50 °C) pendant 30 min sous la forme d'un solide blanc (1,6 g ; 89 %).

RMN<sup>1</sup>H (DMSO-D<sub>6</sub>) : δ 11,88 (1H, s large, NH/OH), 8,02 (1H, s, H<sup>2</sup>), 5,60 (1H, s, H<sup>5</sup>).

PF : Décomposition à 308°C.

IR (cm<sup>-1</sup>) : 3400-2250 (ν OH), 3148 (ν C=C, aromatiques), 1697 (ν C=O, acide), 1612 (ν C=O, amide).

#### 2.2.6.4 Synthèse du composé 24



4-hydroxy-6-oxo-1,6-dihydropyridine-3-carboxylate de *tert*-butyle

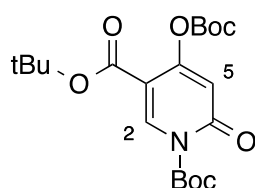
$C_{10}H_{13}NO_4$  - 211,22 g/mol - **24**

À une solution du dérivé **23** (1,0 g ; 6,5 mmol) dans du DMF anhydre (12 mL) et du *t*BuOH (12 mL) sous atmosphère inerte, sont ajoutés du dicarbonate de di-*tert*-butyle (5,63 g ; 25,7 mmol) et de la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) (236 mg ; 1,9 mmol). Après 48 h d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est porté à reflux 1 h à 90 °C puis refroidi à température ambiante. Après évaporation des solvants sous pression réduite, le résidu est repris dans l'AcOEt (50 mL). Le solide formé est filtré et lavé à l'AcOEt (3 x 20 mL). Le filtrat est lavé à l'eau (150 mL), puis concentré sous pression réduite. Le produit **24** est ainsi isolé sous la forme d'un solide jaune (0,8 g ; 58 %).

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  11,88 (s large, OH/NH), 8,12 (1H, s, H<sup>2</sup>), 5,91 (1H, s, H<sup>5</sup>), 1,56 (9H, s, *t*Bu).

PF : 157°C.

#### 2.2.6.5 Synthèse du composé 25



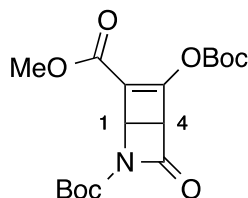
4-((*tert*-butoxycarbonyl)oxy)-6-oxopyridine-1,3(6H)-dicarboxylate de di-*tert*-butyle

$C_{20}H_{29}NO_8$  - 411,45 g/mol - **25**

À une solution du composé **24** (205 mg ; 1,2 mmol) et de dicarbonate de di-*tert*-butyle (780 mg ; 3,6 mmol) dans du DMF anhydre (5,0 mL), sous atmosphère inerte, est additionnée la triéthylamine (0,5 mL ; 3,6 mmol). Après 66 h d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite. Le produit **25** est isolé sous la forme d'une huile brune. (521 mg). La RMN indique une pureté molaire d'environ 70 %.

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ 8,36 (1H, s, H<sup>2</sup>), 6,24 (1H, s, H<sup>5</sup>), 1,62 (9H, s, tBu), 1,54 (9H, s, tBu), 1,53 (9H, s, tBu).

### 2.2.6.6 Synthèse du composé 26



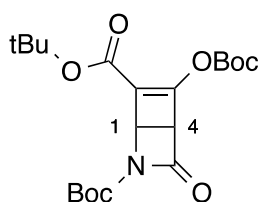
5-((*tert*-butoxycarbonyl)oxy)-3-oxo-2-azabicyclo[2.2.0]hex-5-ène-2,6-dicarboxylate de 2-*tert*-butyle et de 6-méthyle

C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>8</sub> – 369,37 g/mol – **26**

Une solution du dérivé **22** (965 mg ; environ 2 mmol) dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL) est introduite dans un réacteur cylindrique en pyrex et cette solution est dégazée pendant 10 min sous flux d'argon. Toujours sous un flux continu d'argon, la solution est irradiée par une lampe à mercure de 400 W pendant 2,5 h, puis est concentrée sous pression réduite. Cette solution est directement utilisée pour la réaction suivante. Un aliquot est concentré jusqu'à élimination quasi totale du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pour être analysé par RMN.

RMN<sup>1</sup>H (DMSO-D<sub>6</sub>) : δ 4,90 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, H<sup>1</sup>), 4,81 (1H, d, *J* = 2,4 Hz, H<sup>4</sup>), 3,70 (3H, s, OMe), 1,50 et 1,44 (2 x 9H, s, 2 x tBu).

### 2.2.6.7 Synthèse du composé 27



5-((*tert*-butoxycarbonyl)oxy)-3-oxo-2-azabicyclo[2.2.0]hex-5-ène-2,6-dicarboxylate de di-*tert*-butyle

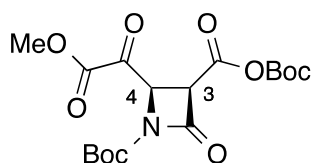
C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>8</sub> – 411,19 g/mol – **27**

Une solution de **25** (521 mg ; environ 1 mmol) dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL) est introduite dans un réacteur cylindrique en pyrex et dégazée 10 min sous flux d'argon. La solution est alors irradiée dans les mêmes conditions par une lampe à mercure de 400 W pendant 7 h, puis est concentrée sous pression réduite (25 mL final). Cette solution

est directement utilisée pour la réaction suivante. Un aliquot est concentré jusqu'à élimination quasi totale du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pour être analysé par RMN.

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ 4,79 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, H<sup>1</sup>), 4,61 (1H, d, *J* = 2,4 Hz, H<sup>4</sup>), 1,53, 1,51 et 1,49 (3 x 9H, s, 3 x tBu).

### 2.2.6.8 Synthèse du composé 28



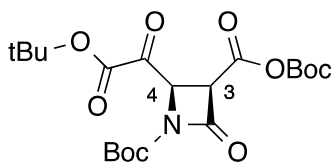
Anhydride-*cis*-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-2-(2-méthoxy-2-oxoacétyl)-4-oxoazétidine-3-carboxylique(*tert*-butylcarbonique)

C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>10</sub> – 401,37 g/mol – **28**

La solution concentrée de **26** (environ 2 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) est refroidie à -78 °C et traitée par un flux d'ozone jusqu'à ce que la solution devienne bleue (15 min). Après élimination de l'excès d'ozone par un flux d'O<sub>2</sub> (jusqu'à décoloration), du sulfure de diméthyle (220 µL, 3,0 mmol) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité 16 h à température ambiante, puis stocké à -18 °C. Un aliquot a été concentré sous pression réduite pour être analysé par RMN.

RMN<sup>1</sup>H (DMSO-D<sub>6</sub>) : δ 5,22 (1H, d, *J* = 6,8 Hz, H<sup>4</sup>), 4,90 (1H, d, *J* = 6,8 Hz, H<sup>3</sup>), 3,79 (3H, s, OMe), 1,47 et 1,43 (2 x 9H, s, 2 x tBu).

### 2.2.6.9 Synthèse du composé 29



Anhydride *cis*-2-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoacétyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-oxoazétidine-3-carboxylique (*tert*-butyl carbonique)

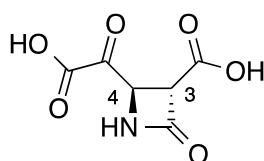
C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>10</sub> – 443,45 g/mol – **29**

La solution concentrée de **27** (environ 1 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL) est refroidie à -78 °C et traitée par un flux d'ozone jusqu'à ce que la solution devienne bleue (1,5 h). Après élimination de l'excès d'ozone par un flux d'O<sub>2</sub> (jusqu'à décoloration), du sulfure de diméthyle (150 µL ; 1,90 mmol) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité 4 h à

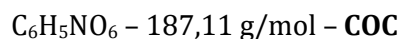
température ambiante, puis stocké à -18 °C. Un aliquot est concentré sous pression réduite pour être analysé par RMN. Le produit **29** est le produit majoritaire (70 %), en mélange avec des produits résultant de l'isomérisation *cis-trans*, de l'hydrolyse de l'anhydride et de l'hydratation du carbonyle.

RMN<sup>1</sup>H (DMSO-D<sub>6</sub>) : δ 5,14 (1H, d, *J* = 6,9 Hz, H<sup>4</sup>), 4,85 (1H, d, *J* = 6,9 Hz, H<sup>3</sup>), 1,47 (9H, s, tBu), 1,43 (2 x 9 H, s, tBu).

#### 2.2.6.10 Synthèse du COC



acide 2-(carboxycarbonyl)-4-oxoazétidine-3-carboxylique



Deux essais de déprotection en milieu acide de **29** (dowex 50W (H<sup>+</sup>) ou HCl 0,5 M) ont été menés pour accéder au composé **COC**. Seul l'essai en présence de HCl a permis d'observer la formation de **COC**.

Au cours du premier essai, une solution de **29** (environ 0,5 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (12,5 mL) est évaporée à sec, et le résidu repris dans un mélange THF/H<sub>2</sub>O (12,6 mL/7,6 mL). Après avoir ajouté de la résine Dowex 50WX8 (200-400 mesh, forme H<sup>+</sup>, 8 mL), le milieu réactionnel est agité à température ambiante. A différents temps de réaction des aliquots (2,0 mL) sont prélevés, filtrés, concentrés sous pression réduite et les résidus analysés par RMN<sup>1</sup>H.

Au cours du second essai, une solution de **29** (environ 0,1 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) est évaporée à sec, et le résidu repris dans un mélange THF/H<sub>2</sub>O (5 mL/3 mL). Une solution de HCl 2 M (3 mL) est ajoutée. A différents temps de réaction des aliquots (2 mL) sont prélevés, filtrés, concentrés sous pression réduite et les résidus analysés par RMN<sup>1</sup>H. Après 22 h de réaction, le produit **COC** est identifié parmi différents intermédiaires. Il représente, avec sa forme hydrate, environ 30 % du mélange.

**COC** : RMN<sup>1</sup>H (DMSO-D<sub>6</sub>) : δ 4,82 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, H<sup>3</sup>), 4,21 (1H, dd, *J* = 2,4 et 0,4 Hz, H<sup>4</sup>).



**COC.H<sub>2</sub>O** : RMN<sup>1</sup>H (DMSO-D<sub>6</sub>) : 3,82 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H<sup>3</sup>), 3,77 (1H, dd, *J* = 2,0 et 0,5 Hz, H<sup>4</sup>).

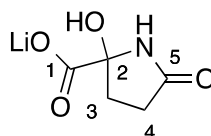
### 3 Synthèses enzymatiques

Toutes les solutions sont préparées dans du tampon phosphate de potassium 0,05 M pH = 7,5. Les solutions sont stockées à -20 °C pour conservation. Les enzymes disponibles sous la forme d'une suspension dans le sulfate d'ammonium 3M sont centrifugées (5 min, 14500 tours/min) et les culots sont solubilisés dans du tampon phosphate avant utilisation.

#### 3.1 Activité de la A3D9 pour le couple L-Gln/Pyr

À 1 mL d'une solution de pyruvate de sodium à 20, 50, 100 ou 200 mM et de L-glutamine 200 mM sont ajoutées 7,2 UI de A3D9 (1 UI = quantité d'enzyme nécessaire pour transformer 1 μmol de Pyr par min, avec 20 mM en L-ACS). Un premier témoin (T<sub>1</sub>) est réalisé en parallèle en l'absence de pyruvate avec la même quantité d'enzyme. Un second témoin négatif (T<sub>2</sub>) est réalisé en l'absence de A3D9, avec 200 mM de Pyr et de L-Gln. À intervalles de temps réguliers, un aliquot de 20 μL est prélevé pour chacune des quatre concentrations en Pyr et pour chacun des deux témoins. Les aliquots sont ensuite dilués par un facteur 4, 10, 20 ou 40 suivant la concentration initiale en Pyr de manière à obtenir une concentration finale en Pyr au maximum égale à 5 mM. La concentration en Pyr réelle présente dans chacun des échantillons [Pyr]<sub>t</sub> est dosée en mélangeant 20 μL de prélèvement dilué, 20 μL de NADH à 8,5 mM, 20 μL de LDH à 100 UI/mL et 140 μL de tampon phosphate 50 mM pH = 7,5. Le taux d'avancement est calculé selon l'équation suivante : % d'avancement = 1 - (([Pyr]<sub>T1</sub> - [Pyr]<sub>t</sub>)/([Pyr]<sub>T1</sub> - [Pyr]<sub>T2</sub>)).

#### 3.2 Synthèse du 2OG



2-hydroxy-5-oxopyrrolidine-2-carboxylate de Lithium

C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>LiNO<sub>4</sub> – 151,05 g/mol – **2OG**

À un mélange de pyruvate de sodium (77 mg ; 0,7 mmol) et de glutamine (123 mg, 0,84 mmol) dans 12 mL d'eau est ajoutée une solution aqueuse de PLP 10 mM (140 μL, 1,4 μmol). Le pH est ajusté à 7,6 avec une solution de KOH 1M. Le volume est ajusté à 14

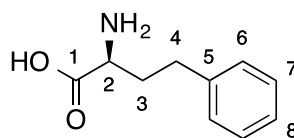
mL avec de l'eau. 500  $\mu$ L de suspension de TA A3D9 (5,9 mg ; 0,13  $\mu$ mol) sont centrifugés. Le surnageant est éliminé et le culot dissous dans le milieu réactionnel qui est agité doucement à température ambiante. L'avancement de la réaction est suivi par dosage du pyruvate résiduel. La réaction est stoppée après environ 5 h par dépôt sur une colonne de résine Dowex 50WX8 (forme H<sup>+</sup> ; 10 mL) qui est ensuite éluée avec de l'eau. Les fractions sont analysées par CCM et celles contenant le 2OG sont rassemblées. Le pH de la solution est alors ajusté à 6 avec une solution d'hydroxyde de lithium 0,1 M. La solution est filtrée sur verre fritté puis lyophilisée. On isole ainsi le dérivé 2OG sous la forme d'un solide blanc (151 mg).

RMN<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) : 2,60 (1H, m, H<sup>3b</sup>), 2,45 (2H, m, H<sup>4b</sup> et H<sup>3a</sup>),  $\delta$  2,13 (1H, m, H<sup>4a</sup>).

RMN<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O) : 181,2 (C<sup>5</sup>), 177,2 (C<sup>1</sup>), 88,6 (C<sup>2</sup>), 33,3 (C<sup>4</sup>),  $\delta$  29,2 (C<sup>3</sup>).

IR (cm<sup>-1</sup>) : 3600-2500 ( $\nu$  OH), 3304 ( $\nu$  NH), 1657 ( $\nu$  C=O, amide et carboxylate).

### 3.3 Synthèse de la L-homophénylalanine



Acide (*S*)-2-amino-4-phénylbutanoïque

C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub> – 179,22 g/mol – **L-HPhe**

#### 3.3.1 Avec A4A10

##### 3.3.1.1 Synthèse avec un excès d'aspartate

Le 2-oxo-4-phénylbutanoate de lithium (OPBA à 65 % de pureté, 50 mg, 0,18 mmol) et l'acide L-aspartique (180 mg ; 1,35 mmol) sont dissous dans l'eau (10 mL). Le pH de la solution est ajusté à 7,5 avec une solution de KOH 0,1 M puis le volume est ajusté à 25 mL avec de l'eau. 370  $\mu$ L d'une suspension de TA A4A10 (0,2 mg ; 4 nmol) sont centrifugés. Le surnageant est éliminé et le culot dissous dans le milieu réactionnel. Ce dernier est agité doucement à température ambiante et la réaction est suivie par CCM pendant 25 heures. Un échantillon est alors prélevé, concentré sous pression réduite puis dissous dans D<sub>2</sub>O (0,5 mL). La composition du milieu réactionnel est analysée par RMN<sup>1</sup>H. 20 % d'OPBA ont été consommés, l'homophénylalanine est en mélange avec de nombreuses impuretés.

### 3.3.1.2 Synthèse avec un excès de glutamate

Le 2-oxo-4-phénylbutanoate de lithium (OPBA à 65 % de pureté ; 50 mg ; 0,18 mmol) et l'acide L-glutamique (198 mg ; 1,35 mmol) sont dissous dans l'eau (10 mL). Le pH de la solution est ajusté à 7,5 avec une solution de KOH 0,1 M puis le volume est ajusté à 25 mL avec de l'eau. 370 µL d'une suspension de TA A4A10 (0,2 mg ; 4 nmol) sont centrifugés. Le surnageant est éliminé et le culot dissous dans le milieu réactionnel. Ce dernier est agité doucement à température ambiante et la réaction est suivie par CCM pendant 8 h. La concentration en KG formé est dosée après 4, 5, 6, et 8 h en mélangeant 20 µL de milieu réactionnel, 20 µL de GluDH à 10 UI/mL, 20 µL de NADH à 8,5 mM, 20 µL d'une solution de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 500 mM et 120 µL de tampon phosphate. La concentration en KG est calculée selon l'équation suivant :  $[KG] = 10 \cdot \Delta DO_{340nm} / 0,59 / 6220$ . La réaction est stoppée par dépôt sur une colonne de résine Dowex 50WX8 (forme H<sup>+</sup> ; 5 mL). Après lavage avec de l'eau (50 mL), la L-HPhe est éluée avec une solution d'ammoniaque 1M. Les fractions contenant la L-HPhe sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. Le résidu est dissous dans une solution d'ammoniaque 1M (10 mL). Cette solution est déposée sur une colonne de résine Dowex 1X8 (forme AcO<sup>-</sup> ; 5 mL). La colonne est éluée avec de l'H<sub>2</sub>O (100 mL). Les fractions contenant la L-HPhe sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. La L-HPhe est isolée sous la forme d'un solide blanc (10,0 mg ; 31 %). Afin d'effectuer l'analyse RMN, des grains de lithine sont additionnés à une suspension de L-HPhe (5 mg) dans D<sub>2</sub>O (0,5 mL) jusqu'à dissolution complète.

RMN<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O + LiOH) : 7,27 (5H, m, H<sup>ar</sup>), δ 3,21 (1H, t,  $J = 6,4$  Hz, H<sup>2</sup>), δ 2,60 (2H, t,  $J = 8,2$  Hz, H<sup>4</sup>), δ 1,84 (2H, m, H<sup>3</sup>).

RMN<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O + LiOH) : δ 183,3 (C<sup>1</sup>), 142,3 (C<sup>5</sup>), 128,6 (C<sup>7</sup>), 128,5 (C<sup>6</sup>), 126,0 (C<sup>8</sup>), 55,7 (C<sup>2</sup>), 36,8 (C<sup>3</sup>), 31,4 (C<sup>4</sup>).

Pf : ≥ 230 °C (décomposition)

IR (cm<sup>-1</sup>) : 3300-2500 (ν NH, ammonium), 1679 (ν C=O), 1602, 1580 et 1494 (ν C=C, aromatiques).

### 3.3.1.3 Synthèse avec régénération du glutamate

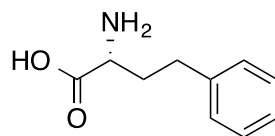
Le 2-oxo-4-phénylbutanoate de lithium (OPBA à 65 % de pureté ; 50 mg ; 0,18 mmol) et l'acide L-glutamique (5,8 mg ; 39,0 µmol) sont dissous dans l'eau (15 mL). Le

pH de la solution est ajusté à 7,5 avec une solution de KOH 0,1 M. 410  $\mu\text{L}$  d'une suspension de TA A4A10 (0,2 mg ; 4 nmol) sont centrifugés. Le surnageant est éliminé et le culot dissous dans le milieu réactionnel. Un procédé identique est utilisé pour ajouter 5 UI de GluDH. 5 UI de FDH (4,34 mg) sont enfin ajoutées, ainsi que 13,3 mg de NADH (18,7  $\mu\text{mol}$ ) et 68 mg de  $\text{HCO}_2\text{NH}_4$  (1,1 mmol). Le volume est ajusté à 20 mL avec de l'eau et le milieu est agité doucement à température ambiante pendant 24 h. La réaction est stoppée par dépôt sur une colonne de résine Dowex 50WX8 (forme  $\text{H}^+$  ; 5 mL). Après lavage avec de l' $\text{H}_2\text{O}$  (50 mL), la L-HPhe est éluée avec une solution aqueuse de  $\text{NH}_3$  1 M. Les fractions contenant la L-HPhe sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. Le résidu est dissous dans une solution aqueuse de  $\text{NH}_3$  1 M (10 mL). Cette solution est déposée sur une colonne de résine Dowex 1X8 (forme  $\text{AcO}^-$  ; 5 mL). La colonne est éluée avec de l' $\text{H}_2\text{O}$  (100 mL). Les fractions contenant la L-HPhe sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. La L-HPhe est isolée sous la forme d'un solide blanc (13,0 mg ; 40 %).

### 3.3.2 Avec A3D9 et la L-glutamine

Le 2-oxo-4-phénylbutanoate de lithium (OPBA à 65 % de pureté ; 45 mg ; 0,16 mmol) et la L-glutamine (24 mg ; 0,17 mmol) sont dissous dans l'eau (1,2 mL). Le pH de la solution est ajusté à 7,8 avec une solution de KOH 0,1 M puis le volume est ajusté à 1,5 mL avec de l'eau. 400  $\mu\text{L}$  de suspension de TA A3D9 (4,7 mg ; 0,1  $\mu\text{mol}$ ) sont centrifugés. Le surnageant est éliminé et le culot dissous dans le milieu réactionnel qui est agité doucement à température ambiante. La réaction est suivie par CCM pendant 5 jours. L'addition de TA A3D9 est renouvelée (4,7 mg). La réaction est stoppée après 7 jours par dépôt sur une colonne de résine Dowex 50WX8 (forme  $\text{H}^+$  ; 3 mL). Après lavage avec de l' $\text{H}_2\text{O}$  (50 mL), la L-HPhe est éluée avec une solution aqueuse de  $\text{NH}_3$  1 M. Les fractions contenant la L-HPhe sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. Le résidu est dissous dans une solution aqueuse d'ammoniaque 1 M (10 mL). Cette solution est déposée sur une colonne de résine Dowex 1X8 (forme  $\text{AcO}^-$  ; 1,5 mL). La colonne est éluée avec de l' $\text{H}_2\text{O}$  (25 mL) puis avec un mélange  $\text{H}_2\text{O}$  / Méthanol (1:1) (30 mL) puis avec une solution aqueuse de  $\text{HCO}_2\text{H}$  1M (80 mL) puis 2M (50 mL). Les fractions contenant la L-HPhe sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. La L-HPhe est isolée sous la forme d'un solide blanc (17 mg ; 59 %).

### 3.4 Synthèse de la D-homophénylalanine



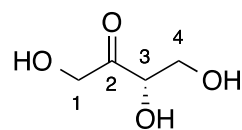
Acide (*R*)-2-amino-4-phénylbutanoïque

$C_{10}H_{13}NO_2$  – 179,22 g/mol – **D-HPhe**

Le 2-oxo-4-phénylbutanoate de lithium (OPBA à 65 % de pureté ; 40 mg ; 0,14 mmol) et la D-glutamine (21 mg ; 0,14 mmol) sont dissous dans l'eau (1,2 mL). Le pH de la solution est ajusté à 8 avec une solution de KOH 0,1 M puis le volume est ajusté à 3 mL avec de l'eau. 500  $\mu$ L de suspension de TA A3B9 (3,5 mg ; 0,1  $\mu$ mol) sont centrifugés. Le surnageant est éliminé et le culot dissous dans le milieu réactionnel qui est agité doucement à température ambiante. La réaction est suivie par CCM pendant 3 jours. La réaction est stoppée par dépôt sur une colonne de résine Dowex 50WX8 (forme H<sup>+</sup> ; 10 mL). Après lavage avec de l'H<sub>2</sub>O (60 mL), la D-HPhe est éluée avec une solution aqueuse d'ammoniaque 1 M. Les fractions contenant la D-HPhe sont rassemblées et évaporées sous pression réduite. La D-HPhe est isolée sous la forme d'un solide blanc (19,5 mg ; 73 %).

Le spectre RMN<sup>1</sup>H est identique à celui décrit pour la L-HPhe.

### 3.5 Synthèse du L-érythrulose



(*S*)-1,3,4-trihydroxybutan-2-one

$C_4H_8O_4$  – 120,10 g/mol – L-érythrulose

#### 3.5.1 Avec le pyruvate comme accepteur

De la thiamine diphosphate (ThDP)(0,9 mg, 2,0  $\mu$ mol), du  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (4,0 mg, 20,0  $\mu$ mol), du PLP (1,0 mg, 4,0  $\mu$ mol), du pyruvate de sodium monohydraté (110 mg, 1,0 mmol) et du glycolaldéhyde (60,0 mg, 1,0 mmol) sont dissous dans l'eau (19,0 mL) et le pH est ajusté à 7 avec une solution de NaOH 1M. À cette solution sont ajoutées 6,0 mg de TK<sub>gst</sub> (82 nmol) et 2,4 mg de TA A4C2 (58 nmol) lyophilysées. Le pH est ensuite ajusté à 7 avec une solution de NaOH 1 M et le milieu réactionnel agité pendant 20 min à 60 °C. La L-sérine (157 mg, 1,5 mmol) est dissoute dans 1 mL d'H<sub>2</sub>O et le pH est ajusté à 7 avec une solution de NaOH 1 M. Cette solution est ensuite introduite dans le milieu réactionnel pour initier la réaction. Le pH est maintenu à 7 par ajout de HCl 0,1 M à l'aide d'un pH-stat. L'avancement de la réaction est suivi par RMN en utilisant du 3-triméthylsilylpropionate de sodium tetradeutééré (TSPD<sub>4</sub>) à concentration fixe comme référence : 450  $\mu$ L de milieu réactionnel sont dilués avec 50  $\mu$ L d'une solution de TSPD<sub>4</sub> 50mM préparée dans D<sub>2</sub>O. Après 10 h, le milieu réactionnel ne contient ni glycolaldéhyde, ni pyruvate, et la réaction est stoppée par ajout de silice dans le milieu. L'eau est évaporée sous pression réduite et le résidu solide est purifié par chromatographie éclair sur silice (éluant AcOEt/MeOH : 9/1). Le L-érythrulose est obtenu sous forme d'une huile jaune (52,8 mg, 44 %).

RMN<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  4,62 ppm (1H, d,  $J$  = 20,0 Hz, H<sup>1a</sup>), 4,55 (1H, d,  $J$  = 20, Hz, H<sup>1b</sup>), 4,47 (1H, t,  $J$  = 4 Hz, H<sup>3</sup>), 3,90 (1H, dd,  $J$  = 12,0 et 4,0 Hz, H<sup>4a</sup>), 3,86 (1H, dd,  $J$  = 12,0 et 4,0 Hz, H<sup>4b</sup>).

#### 3.5.2 Avec le glyoxylate

De la ThDP (0,9 mg, 2,0  $\mu$ mol), du  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (4,0 mg, 20,0  $\mu$ mol), du PLP (1,0 mg, 4,0  $\mu$ mol), du glyoxylate de sodium (114 mg, 1,0 mmol) et du glycolaldéhyde (60,0 mg, 1,0 mmol) sont dissous dans l'eau (19,0 mL) et le pH est ajusté à 7 avec une solution de

NaOH 1 M. À cette solution sont ajoutées 6,0 mg de TK<sub>gst</sub> (82 nmol) et 2,4 mg de TA A4C2 (58 nmol) lyophilysées. Le pH est ensuite ajusté à 7 avec une solution de NaOH 1M et le milieu réactionnel agité pendant 20 min à 60 °C. La L-sérine (157 mg, 1,5 mmol) est dissoute dans 1 mL d'H<sub>2</sub>O et le pH est ajusté à 7 avec une solution de NaOH 1M. La solution est ensuite introduite dans le milieu réactionnel pour initier la réaction. Le pH est maintenu à 7 par ajout de HCl 0,1 M à l'aide d'un pH-stat. L'avancement de la réaction est suivi par RMN. Après 10 h, le milieu réactionnel ne contient ni glycolaldéhyde, ni glyoxylate, et la réaction est stoppée par ajout de silice dans le milieu. L'eau est évaporée sous pression réduite et le résidu solide est purifié par chromatographie éclair sur silice (éluant AcOEt/MeOH : 9/1). Le L-érythrose est obtenu sous forme d'une huile jaune (26,4 mg, 22 %).

## 4 Création des banques

Toutes les étapes de clonage et d'expression se font en plaque 96 puits. Le choix des oligonucléotides de chaque gène est réalisé à l'aide du programme Primer3, et une séquence spécifique est ajoutée en 5' de chaque oligonucléotide sens et antisens pour permettre le clonage.

Après amplification par PCR des gènes candidats à partir des souches bactériennes correspondantes, le clonage est réalisé dans un plasmide d'expression (pET22b(+)) (NOVAGEN) modifié dans le laboratoire) selon la méthode de "Ligation Independent Cloning" ou LIC développée par Aslanadis et De Jong.<sup>281</sup> La construction obtenue est introduite par choc thermique dans la bactérie hôte NOVABLUE (Novagen), qui sont ensuite mises en culture. La culture est centrifugée, le surnageant éliminé et le plasmide extrait du culot cellulaire par lyse alcaline.

Une deuxième transformation est effectuée avec les plasmides contenant les gènes d'intérêt dans la bactérie d'expression *E. coli* BL21(DE3)STAR (Invitrogen). Après induction de l'expression des gènes par l'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) et synthèse des protéines, les cultures sont centrifugées, les surnageants éliminés et les culots conservés à -80 °C jusqu'à la lyse.

Pour la lyse, les culots sont repris dans un tampon de lyse (Tampon Phosphate 50 mM pH 7,5 ; 50 mM NaCl, 10 % glycérol, 1 mM Pefabloc SC (Sigma-Aldrich) et 0,2 mL de Lysonase™ *bioprocessing reagent* (Merck)), soniqués dans un bain à ultrason (Bronson

2510 Ultrasonic Cleaner) et centrifugés. Les lysats sont récupérés et conservés à -80 °C. La quantité de protéines dans les lysats est estimée par la méthode de Bradford.

## **5 Tests enzymatiques et enzymologie**

Toutes les solutions et réactions sont réalisées dans du tampon phosphate de potassium 0,05 M pH = 7,5. Les solutions sont stockées à -20 °C pour conservation. Les enzymes disponibles sous la forme d'une suspension dans le sulfate d'ammonium 3M sont centrifugées (5 min, 14500 tours/min) et les culots sont solubilisés dans du tampon phosphate avant utilisation.

### **5.1 Tests enzymatiques**

Les paramètres généraux des différents tests enzymatiques sont présentés dans la première partie de ce chapitre. Les valeurs entre crochets décrivent les activités et concentrations finales utilisées dans ces conditions pour les différents composants. Les paramètres variant pour chaque expérience sont détaillés de manière individuelle dans le tableau de la seconde partie de ce chapitre.

#### **5.1.1 Conditions générales**

Les mesures d'activités sont effectuées à  $30 \pm 2$  °C dans 200 µL de volume total. Après agitation pendant 90 secondes de manière orbitale, des lectures de densité optique ou de fluorescence sont réalisées toutes les 15 secondes pendant 30 minutes. Les pentes maximales sont mesurées sur la partie linéaire de chaque courbe avec un minimum de 10 points. La valeur de 0,59 cm est prise comme trajet optique pour les mesures de densité optique.

##### **5.1.1.1 Tests au NADH**

Les réactions mettant en jeu le NADH sont suivies par mesure de la variation de densité optique du milieu réactionnel à 340 nm.

###### **5.1.1.1.1 Test à la LDH**

Dans un puits sont ajoutés successivement 20 µL de TA à 0,1 UI/mL [2 mUI], 20 µL de LDH à 10 UI/mL [0,2 UI], 20 µL de PLP à 0,5 mM [0,05 mM], 20 µL de NADH à 8,5 mM [0,85 mM], 20 µL d'accepteur à 20 mM [2 mM] et 50 µL de tampon phosphate 50 mM pH = 7,5. La réaction est initiée par ajout de 50 µL d'Ala (ou d'ACS) à 80 mM [20 mM].

###### **5.1.1.1.2 Test à la GluDH**



Dans un puits sont ajoutés successivement 20 µL de TA à 0,1 UI/mL [2 mUI], 20 µL de GluDH à 10 UI/mL [0,2 UI], 20 µL de PLP à 0,5 mM [0,05 mM], 20 µL de NADH à 8,5 mM [0,85 mM], 20 µL d'accepteur à 20 mM [2 mM], 20 µL de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 500 mM [50 mM] et 30 µL de tampon phosphate 50 mM pH = 7,5. La réaction est initiée par ajout de 50 µL de Glu à 80 mM [20 mM].

#### **5.1.1.1.3 Test à la MDH**

Dans un puits sont ajoutés successivement 20 µL de TA à 0,1 UI/mL [2 mUI], 20 µL de MDH à 10 UI/mL [0,2 UI], 20 µL de PLP à 0,5 mM [0,05 mM], 20 µL de NADH à 8,5 mM [0,85 mM], 20 µL d'accepteur à 20 mM [2 mM] et 50 µL de tampon phosphate 50 mM pH = 7,5. La réaction est initiée par ajout de 50 µL d'Asp à 80 mM [20 mM].

#### **5.1.1.2 Tests au DTNB**

Les réactions mettant en jeu le DTNB sont suivies par mesure de la variation de densité optique du milieu réactionnel à 412 nm. Le DTNB est préparé à 10 mM dans du tampon phosphate 50 mM pH = 7,5 avec 10 % d'éthanol. Les accepteurs sont préparés à 20 mM dans du tampon phosphate 50 mM pH = 7,5 avec de 0 à 100 % de DMSO suivant leur solubilité.

##### **5.1.1.2.1 Test direct à l'ACS**

Dans un puits sont ajoutés successivement 20 µL de TA à 0,1 UI/mL [2 mUI], 20 µL de PLP à 0,5 mM [0,05 mM], 20 µL de DTNB à 10 mM [1 mM], 20 µL d'accepteur à 20 mM [2 mM] et 70 µL de tampon phosphate 50 mM pH = 7,5. La réaction est initiée par ajout de 50 µL d'ACS à 80 mM [20 mM].

##### **5.1.1.2.2 Test couplé à l'ACS**

Dans un puits sont ajoutés successivement 20 µL de TA à 0,1 UI/mL [2 mUI], 20 µL d'AspTA d'*E.coli* à 10 UI/mL [0,2 UI], 20 µL de PLP à 0,5 mM [0,05 mM], 20 µL de DTNB à 10 mM [1 mM], 20 µL d'accepteur à 20 mM [2 mM], et 50 µL d'ACS à 80 mM [20 mM]. La réaction est initiée par ajout de 50 µL de Glu à 80 mM [20 mM].

##### **5.1.1.2.3 Test direct à l'HPT**

Dans un puits sont ajoutés successivement 20 µL de TA à 0,1 UI/mL [2 mUI], 20 µL de PLP à 0,5 mM [0,05 mM], 20 µL de DTNB à 10 mM [1 mM], 20 µL d'accepteur à 20 mM

[2 mM] et 70  $\mu$ L de tampon phosphate 50 mM pH = 7,5. La réaction est initiée par ajout de 50  $\mu$ L d'HPT à 80 mM [20 mM].

#### **5.1.1.2.4 Test couplé à l'HPT**

Dans un puits sont ajoutés successivement 20  $\mu$ L de TA à 0,1 UI/mL [2 mUI], 20  $\mu$ L de Q9A3Q9 à 10 UI/mL [0,2 UI], 20  $\mu$ L de PLP à 0,5 mM [0,05 mM], 20  $\mu$ L de DTNB à 10 mM [1 mM], 20  $\mu$ L d'accepteur à 20 mM [2 mM], et 50  $\mu$ L d'HPT à 80 mM [20 mM]. La réaction est initiée par ajout de 50  $\mu$ L d'Ala à 80 mM [20 mM].

#### **5.1.1.2.5 Test à amplification**

Dans un puits sont ajoutés successivement 20  $\mu$ L de TA à 0,1 UI/mL [2 mUI], 20  $\mu$ L de A4A10 à 10 UI/mL [0,2 UI], 20  $\mu$ L de PLP à 0,5 mM [0,05 mM], 20  $\mu$ L de DTNB à 10 mM [1 mM], 20  $\mu$ L d'accepteur à 20 mM [2 mM], et 50  $\mu$ L de L-ACS à 80 mM [20 mM]. La réaction est initiée par ajout de 50  $\mu$ L d'Ala à 80 mM [20 mM].

#### **5.1.1.3 Test à la résazurine**

Les réactions mettant en jeu la résazurine sont suivies par mesure de la fluorescence de la résazurine  $\lambda_{\text{ex}} = 563$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 587$  nm.

Une solution (mix) est préparée avec 20  $\mu$ L de GluDH à 50 UI/mL [1 UI], 20  $\mu$ L de diaphorase à 5 UI/mL [0,1 UI], 20  $\mu$ L de PLP à 50  $\mu$ M [5  $\mu$ M], 20  $\mu$ L de NAD<sup>+</sup> à 30 mM [3 mM], 20  $\mu$ L de résazurine 100  $\mu$ M (10  $\mu$ M) en solution dans 50 % de DMSO [5 %], 20  $\mu$ L de KG à 20 mM [2 mM], et 10  $\mu$ L de tampon phosphate 50 mM pH = 7,5.

Dans un puits sont ensuite ajoutés successivement 20  $\mu$ L de TA à 0,1 UI/mL [2 mUI], le mix précédemment formé, et la réaction est initiée par ajout de 50  $\mu$ L de donneur à 80 mM [20 mM].

#### **5.1.1.4 Test au WST-1**

Pour ce test, les solutions sont préparées dans du tampon HEPES 0,1 M pH = 7,5.

Le test se décompose de deux étapes : une étape de réaction enzymatique et une étape de révélation (test discontinu). La première étape est réalisée en mélangeant successivement 5  $\mu$ L de lysat cellulaire issu des banques TAM, 20  $\mu$ L d'accepteur à 50 mM [5 mM], 10  $\mu$ L de PLP à 4 mM [0,2 mM] et 145  $\mu$ L de tampon HEPES 0,1 M pH = 7,5. La réaction est initiée par ajout de 20  $\mu$ L de L-Ser à 50 mM [5 mM].

Pour la seconde étape de révélation, 20 µL de milieu réactionnel sont prélevés et mélangés avec 90 µL d'une solution de NaOH à 0,44 M [0,2 M] et 90 µL d'une solution de WST-1 à 0,49 mg/mL [0,22 mg/mL]. Le mélange est ensuite incubé pendant 10 minutes à 60 °C et l'absorbance est mesurée à 600 nm.

## 5.1.2 Conditions particulières pour les différentes expériences

Dans le Tableau 44 sont reportés tous les tests décrits au sein de cette thèse, avec les différents paramètres qui ont été modifiés par rapport aux conditions générales précédemment décrites. Le volume total du puits est fixé à 200 µL. Pour atteindre ce volume du tampon phosphate 50 mM pH = 7,5, ou du tampon HEPES 0,1 M pH = 7,5 dans le cas du test au WST-1, est ajouté si nécessaire. Les activités enzymatiques sont calculées dans les conditions standard des tests à 30 °C.

Tableau 44 : Conditions des différentes expériences.

Expérience	Test	TA	Enz. aux.	Donneurs (Primaire/secon daire)	Accepteurs	PLP	Autre
<b>Mise au point des tests</b>							
<b>Test Direct/ACS</b>							
Calibration des sulfites	Direct ACS	AspTA [0,16 UI]	---	NaHSO <sub>3</sub> [1 -> 100 µM]	KG [2 mM]	[50 µM]	---
Calibration du L-ACS	Direct ACS	AspTA [0,16 UI]	---	L-ACS [1 -> 100 µM]	KG [2 mM]	[50 µM]	---
Blanc L-ACS/DTNB	Direct ACS	---	---	L-ACS [20 mM]	KG [2 mM]	[50 µM]	---
Témoin positif test direct L-ACS	Direct ACS	AspTA [2 mUI]	---	L-ACS [50 mM]	KG [2 mM]	[50 µM]	---
LOD test Direct ACS (DTNB)	Direct ACS	AspTA [0,05 -> 16 mUI]	---	L-ACS [50 mM]	KG [2 mM]	[50 µM]	---
LOD test Direct ACS (NADH)	LDH	AspTA [0,05 -> 40 mUI]	LDH [20 UI]	L-ACS [50 mM]	KG [2 mM]	[50 µM]	---
Paramètres cinétiques AspTA (DTNB)	Direct ACS	AspTA [2 mUI]	---	L-ACS [0,5 -> 32 mM]	KG [0,2 -> 1,6 mM]	[50 µM]	---
Paramètres cinétiques AspTA (NADH)	LDH	AspTA [4 mUI]	LDH [5 UI]	L-ACS [0,5 -> 32 mM]	KG [0,2 -> 2 mM]	[50 µM]	---
<b>Test Couplé/ACS</b>							
Etude du rapport AspTA/BCAT	Couplé ACS	BCAT [0,25 -> 37 mUI]	AspTA [20 mUI]	L-Glu/L-ACS [20 mM]	MOPA [2 mM]	[50 µM]	---
LOD test Couplé ACS (DTNB)	Couplé ACS	BCAT [0,1 -> 16 mUI]	AspTA [2 UI]	L-Glu/L-ACS [50/6,25 mM]	MOPA [2 mM]	[50 µM]	---
LOD test Couplé ACS (DTNB)	GluDH	BCAT [0,1 -> 40 mUI]	GluDH [2 UI]	L-Glu [50 mM]	MOPA [2 mM]	[50 µM]	---
Paramètres cinétiques BCAT (DTNB)	Couplé ACS	BCAT [2 mUI]	AspTA [0,2 UI]	L-Glu/L-ACS [50/6,25 mM]	MOPA [0,2 -> 2 mM]	[50 µM]	---
Paramètres cinétiques BCAT (NADH)	GluDH	BCAT [2 mUI]	GluDH [0,1 UI]	L-Glu [50 mM]	MOPA [0,2 -> 2 mM]	[50 µM]	---
<b>Test Direct/HypoT</b>							
Spectre de substrat de Q9A3Q9	Direct HypoT	Q9A3Q9	---	HypoT [20 mM]	Variable [2 mM]	[5 µM]	DMSO [5 ou 10 %]

LOD test Direct HypoT	Direct HypoT	Q9A3Q9 [0,02 -> 7 mUI]	---	HypoT [20 mM]	Pyr [2 mM]	[5 µM]	DMSO [5 %]
<b>Test Couplé/HypoT</b>							
Spectre de substrat de Q7NWX4	LDH	Q7NWX4	---	L-Ala [20 mM]	Variable [2 mM]	[5 µM]	DMSO [5 %]
LOD test Couplé HypoT	Couplé HypoT	A4A10 [0,02 -> 1,5 mUI]	Q9A3Q9 [20 mUI]	L-Ala [20 mM]	KG [2 mM]	[5 µM]	DMSO [5 %]
<b>Test à Amplification</b>							
Evaluation du bruit de fond avec la A4A10 seule	Direct ACS	A4A10 [20 ou 100 mUI]	---	L-ACS [20 mM]	---	[0 -> 50 µM]	---
Comparaison A4A10-PMP et A4A10-PLP	Direct ACS	A4A10-PMP ou A4A10-PLP [1 ou 100 mUI]	---	L-ACS [20 mM]	Pyr [0 ou 2 mM]	[0 ou 50 µM]	---
Optimisation du rapport A4A10/Q7NWX4	Amplif.	Q7NWX4 [0, 1 ou 10 mUI]	A4A10 [0, 20 ou 200 mUI]	L-Ala/L-ACS [20 mM]	Butanal [2 mM]	[50 µM]	---
Première courbe étalon à 50 µM de PLP	Amplif.	Q7NWX4 [0,4 -> 50 mUI]	A4A10 [0,2 UI]	L-Ala/L-ACS [20 mM]	Butanal [2 mM]	[50 µM]	---
Influence de la [PLP] sur A4A10	Direct ACS	A4A10 [2 mUI]	---	L-ACS [20 mM]	Pyr [2 mM]	[0,5 -> 50 µM]	---
Influence de la [PLP] sur Q7NWX4	LDH	Q7NWX4 [2 mUI]	LDH [40 mUI]	L-Ala [20 mM]	Butanal [2 mM]	[1 -> 50 µM]	---
Influence de la [PLP] sur le couplage des deux Enz.	Amplif.	Q7NWX4 [0 ou 1 mUI]	A4A10 [0,2 UI]	L-Ala/L-ACS [20 mM]	Butanal [2 mM]	[1 -> 50 µM]	---
Courbe de calibration (DTNB)	Amplif.	Q7NWX4 [0,01 -> 5 mUI]	A4A10 [0,2 UI]	L-Ala/L-ACS [20 mM]	Butanal [2 mM]	[5 µM]	---
Courbe de calibration (NADH)	LDH	Q7NWX4 [0,01 -> 5 mUI]	LDH [2 UI]	L-Ala/L-ACS [20 mM]	Butanal [2 mM]	[5 µM]	---
<b>Test à la résazurine</b>							
Mise au point des conditions générales	Résa.	A4A10 [1 -> 100 mUI]	GluDH/ Diapho. [0,01 -> 10 UI]	L-Asp [20 mM]	KG [2 mM]	[5 µM]	Résa. + NAD <sup>a</sup>
Courbe de calibration du test à la résazurine	Résa.	A3D9 [0,14 -> 37 mUI]	GluDH/ Diapho. [1/0,1 UI]	L-Ala [20 mM]	KG [2 mM]	[5 µM]	---
<b>Criblages</b>							
Criblage TAM(A) test direct L-ACS	Direct ACS	Variable [2 µL de Lysat]	---	L-ACS [20 mM]	Variable [2 mM]	[50 µM]	DMSO [0 ou 5 %]
Criblage TAM(A) test couplé L-Glu/L-ACS	Couplé ACS	Variable [2 µL de Lysat]	AspTA [20 mUI]	L-Glu/L-ACS [20 mM]	Variable [2 mM]	[50 µM]	DMSO [0 ou 5 %]
Criblage TAM(A) test direct D-ACS	Direct ACS	Variable [2 µL de Lysat]	---	D-ACS [10 mM]	Variable [2 mM]	[50 µM]	DMSO [0 ou 5 %]
Criblage TAM(C) test couplé D-Glu/L-ACS	Couplé ACS	Variable [2 µL de Lysat]	AspTA [20 mUI]	D-Glu/L-ACS [20 mM]	Variable [2 mM]	[50 µM]	DMSO [0 ou 5 %]
Criblage TAM(D) test direct HypoT	Direct HPT	Variable [2 µL de Lysat]	---	HPT [10 mM]	Variable [2 mM]	[50 µM]	DMSO [5 %]
Vérification des activités des hits test direct L-ACS	Direct ACS	Variable [Entre 1 et 8 µg d'Enz] <sup>b</sup>	---	L-ACS [20 mM]	Variable [2 mM]	[5 µM]	DMSO [0 ou 5 %]

Vérification des activités des hits test couplé L-Glu/L-ACS	Couplé ACS	Variable [Entre 1 et 8 µg d'Enz] <sup>b</sup>	AspTA [20 mUI]	L-Glu/L-ACS [20 mM]	Variable [2 mM]	[5 µM]	DMSO [0 ou 5 %]
Vérification des activités des hits test direct D-ACS	Direct ACS	Variable [Entre 1 et 8 µg d'Enz] <sup>b</sup>	---	D-ACS [10 mM]	Variable [2 mM]	[5 µM]	DMSO [0 ou 5 %]
Vérification des activités des hits test couplé D-Glu/L-ACS	Couplé ACS	Variable [Entre 1 et 8 µg d'Enz] <sup>b</sup>	AspTA [20 mUI]	D-Glu/L-ACS [20 mM]	Variable [2 mM]	[5 µM]	DMSO [0 ou 5 %]
Etude du spectre de donneurs	Résa.	Variable [Entre 0,01 et 8 µg d'Enz] <sup>c</sup>	GluDH/Diapho. [1/0,1 UI]	Variable [20 mM]	KG [2 mM]	[5 µM]	---
Criblage des SerTA	WST-1	Variable [5 µL de Lysat]	---	L-Ser [5 mM]	Variable [5 mM]	[0,2 mM]	---

### Caractérisation des hits

A4A10							
Paramètres cinétiques A4A10 L-ACS/Pyr	Direct ACS	A4A10 [1,3 µg]	---	L-ACS [0,5 -> 20 mM]	Pyr [0,2 -> 4 mM]	[50 µM]	---
Thermoactivité de A4A10	Direct ACS	A4A10 [10 mUI]	---	L-ACS [70 mM]	Pyr [10 mM]	[50 µM]	T°C [10 -> 80 °C]
Thermostabilité de A4A10	Direct ACS	A4A10 [2 mUI]	---	L-ACS [20 mM]	KG [2 mM]	[50 µM]	T°C [30 ou 60 °C]
Influence du pH sur A4A10	Direct ACS	A4A10 [8 mUI]	---	L-ACS [25 mM]	Pyr [1 mM]	[2,5 µM]	pH [6,4 -> 8,7] <sup>d</sup>
Influence du DMSO sur A4A10	Direct ACS	A4A10 [1 mUI]	---	L-ACS [20 mM]	Pyr [2 mM]	[50 µM]	DMSO [0 -> 70 %]
Activité A4A10 pour le couple L-Glu/Pyr	GluDH	A4A10 [2 mUI]	GluDH [0,2 UI]	L-Glu [20 mM]	Pyr [2 mM]	[5 µM]	---
Activité A4A10 pour le couple L-Glu/OPBA	GluDH	A4A10 [2 mUI]	GluDH [0,2 UI]	L-Glu [20 mM]	OPBA [2 mM]	[5 µM]	---
Activité A4A10 pour le couple L-Ala/KG	LDH	A4A10 [2 mUI]	LDH [0,2 UI]	L-Ala [20 mM]	KG [2 mM]	[5 µM]	---
Activité A4A10 pour le couple L-Ala/OPBA	LDH	A4A10 [2 mUI]	LDH [0,2 UI]	L-Ala [20 mM]	OPBA [2 mM]	[5 µM]	---
Activité A4A10 pour le couple L-ACS/KG	LDH	A4A10 [2 mUI]	LDH [0,2 UI]	L-ACS [20 mM]	KG [2 mM]	[5 µM]	---
Activité A4A10 pour le couple L-ACS/OPBA	LDH	A4A10 [2 mUI]	LDH [0,2 UI]	L-ACS [20 mM]	OPBA [2 mM]	[5 µM]	---
Activité A4A10 pour le couple L-Asp/KG	MDH	A4A10 [2 mUI]	MDH [0,2 UI]	L-Asp [20 mM]	KG [2 mM]	[5 µM]	---
Activité A4A10 pour le couple L-Asp/Pyr	MDH	A4A10 [2 mUI]	MDH [0,2 UI]	L-Asp [20 mM]	Pyr [2 mM]	[5 µM]	---
Activité A4A10 pour le couple L-Asp/OPBA	MDH	A4A10 [2 mUI]	MDH [0,2 UI]	L-Asp [20 mM]	OPBA [2 mM]	[5 µM]	---
A4C2							
Paramètres cinétiques A4C2 pour le Pyr	WST-1	A4C2 [37 mUI]	---	L-Ser [5 mM]	Pyr [1 -> 20 mM]	[0,2 mM]	---

Paramètres cinétiques A4C2 pour le KG	WST-1	A4C2 [94 mUI]	---	L-Ser [5 mM]	KG [1 -> 20 mM]	[0,2 mM]	---
Paramètres cinétiques A4C2 pour le Glyox	WST-1	A4C2 [188 mUI]	---	L-Ser [5 mM]	Glyox [1 -> 20 mM]	[0,2 mM]	---
Paramètres cinétiques A4C2 pour la L-Ser	WST-1	A4C2 [37 mUI]	---	L-Ser [1 -> 100 mM]	Pyr [20 mM]	[0,2 mM]	---
Paramètres cinétiques A4C2 pour la L-Ser	WST-1	A4C2 [94 mUI]	---	L-Ser [1 -> 100 mM]	KG [3 mM]	[0,2 mM]	---
Paramètres cinétiques A4C2 pour la L-Ser	WST-1	A4C2 [188 mUI]	---	L-Ser [1 -> 100 mM]	Glyox [5 mM]	[0,2 mM]	---
Thermoactivité de A4C2	WST-1	A4C2 [74 mUI]	---	L-Ser [170 mM]	Pyr [25 mM]	[0,2 mM]	T°C [25 -> 60 °C]
Thermostabilité de A4C2	LDH	A4C2 [2 mUI]	LDH [2 UI]	L-Ser [170 mM]	KG [25 mM]	[0,2 mM]	T°C [60 °C]

<sup>a</sup> Résa. [0,01 -> 1 mM] ; NAD [0,2 -> 15 mM]. <sup>b</sup> 20 µL d'Enz. purifiée au Géoscope, diluée 10 fois, sont introduits par puits. <sup>c</sup> 20 µL d'Enz. purifiée au Géoscope, diluée 10, 100 ou 1000 fois, sont introduits par puits. <sup>d</sup> Le DTNB a été utilisé à [0,5 mM].

## 5.2 Enzymologie

### 5.2.1 Enzymes commerciales

L'activité des enzymes commerciale a été remesurée dans des conditions standard avec du tmpon phosphate 50 mM pH 7,5.

- Malate déshydrogénase (MDH) de cœur de bovin (E.C.1.1.1.3.7, 8568 UI/mL, suspension dans le sulfate d'ammonium 3M) disponible chez Sigma. L'activité a été mesurée en présence d'OA (2 mM) et de NADH (0,6 mg/mL).
- Lactate déshydrogénase (LDH) de muscle de lapin (E.C.1.1.1.27, 944 UI/mL suspension dans le sulfate d'ammonium 3M) disponible chez Sigma. L'activité a été mesurée en présence de Pyr (2 mM) et de NADH (0,6 mg/mL).
- Glutamate déshydrogénase (GluDH) de foie de bovin (E.C.1.4.1.3, 1358 UI/mL, suspension dans le sulfate d'ammonium 3M) disponible chez Sigma. L'activité a été mesurée en présence de KG (2 mM), de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM et de NADH (0,6 mg/mL).
- Formate déshydrogénase (FDH) de *Candida Boidinii* (EC 1.2.1.2, 1,15 UI/mg, lyophilisat) disponible chez Sigma. L'activité n'a pas été remesurée et a été considérée comme égale à celle décrite par Sigma.

- Diaphorase de *Clostridium kluverii* (EC 1.8.1.4, 2,6 UI/mg de solide, lyophilisat) disponible chez Sigma. L'activité n'a pas été remesurée et a été considérée comme égale à celle décrite par Sigma.

## 5.2.2 Transaminases

Les tampons nécessaires à la surexpression et à la purification des TA sont les suivants :

- Tampon de lyse (pH = 8) : phosphate de potassium 50 mM, KCl 300 mM, imidazole 10 mM.
- Tampon de lavage (pH = 8) : phosphate de potassium 50 mM, KCl 300 mM, imidazole 20mM.
- Tampon d'élution (pH = 8) : phosphate de potassium 50 mM, KCl 300 mM, imidazole 250 mM.
- Tampon de rinçage (pH = 9) : phosphate de potassium 50 mM, KCl 300 mM, imidazole 500 mM.

### 5.2.2.1 Surexpression

Les transaminases sont produites à partir d'une souche d'*E. coli* recombinante transformée avec le plasmide pET22b contenant le gène correspondant. Le plasmide contient aussi un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection des cellules transformées. Une séquence codante pour un enchaînement de 6 histidines est ajoutée à chaque gène, de préférence en position N-terminale, pour permettre la purification par chromatographie d'affinité métallique (IMAC). Les cellules transformées sont stockées à -80 °C dans 3 mL de milieu Luria-Bertini (LB) + ampicilline (tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 10 g/L, ampicilline 100 m/L) contenant 10 % de glycérol.

On effectue une préculture par ajout de 3 mL de cellules transformées dans 100 mL de milieu Luria-Bertini + ampicilline. Le milieu est agité à 200 rpm durant 24 h à 37 °C. Pour la phase d'expression 4 mL de préculture sont ajoutés à 5 x 200 mL de milieu Luria-Bertini + ampicilline. Les milieux de culture sont agités à 200 rpm, à 37 °C, jusqu'à ce que la DO à 600 nm de la solution bactérienne atteigne 0,7. 2mL d'IPTG sont alors ajoutés à chaque milieu pour induire l'expression. Les milieux sont laissés à agiter à 200 rpm durant 24 h à 30 °C. Les milieux de culture sont, pour finir, centrifugés à 11900 *g* pendant 15 min. Les culots bactériens obtenus sont mis en suspension dans du tampon de lyse (environ 30 mL) et centrifugés à 11900 *g* pendant 15 minutes. L'opération est

répétée 3 fois pour bien laver les cellules. Habituellement, environ 3 g de cellules humides sont obtenus par litre de culture. Le culot cellulaire est conservé sous cette forme à -80 °C jusqu'à purification de l'enzyme.

## 5.2.2.2 Purification

### 5.2.2.2.1 AspTA (P00509)

Pour 3 g environ de culot cellulaire d'*Escherichia Coli* obtenu suivant le protocole décrit précédemment est ajouté, à 4°C, du tampon de Lyse (20 mL). Les cellules sont mises en suspension par agitation à l'aide d'un vortex. La suspension obtenue est soniquée pendant 1 h (amplitude 55 %, 8 s on / 15 s off) puis centrifugé à 25000 g (14500 tours par min) pendant 30 min à 4 °C. Le surnageant est récupéré et 1,5 mL d'une solution de PLP à 10 mM sont ajoutés avant ajustement du volume à 30 mL avec du tampon de lyse. Après agitation pendant 5 min, l'activité du lysat est mesurée à l'aide du test utilisant la MDH (50 mM L-Asp, 2 mM KG). La solution est ensuite déposée sur une colonne (30 mL) de Ni-NTA agarose (Qiagen) préalablement rincée avec du tampon de rinçage (100 mL), de l'éthanol (100 mL), du tampon de lyse (300 mL). Après élution avec le tampon de lavage (300 mL), l'AspTA est élue à l'aide du tampon d'élution (100 mL). Les différentes fractions sont analysées avec le test utilisant la MDH. Les fractions contenant l'enzyme sont regroupées puis dialysées dans 3 bains successifs de sulfate d'ammonium 3 M (3 x 500 mL) pendant environ 3 x 6 h. L'activité du dialysat est mesurée à l'aide du test utilisant la MDH. Un volume de 10 mL de suspension d'enzyme est ainsi obtenu, contenant 22,8 mg/mL de protéine (228 mg.) Une activité de 1877,0 UI/mL (18770 UI) a ainsi été obtenue. Activité spécifique : 82,4 UI/mg.

### 5.2.2.2.2 Autres enzymes

Les autres enzymes ont été purifiées en suivant le même protocole que celui décrit précédemment pour l'AspTA. Les différents résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 45 ci-dessous.

Tableau 45 : Résultats de la purification des différentes TA.

Enzyme	Masse de cellules (g)	Test pour le dosage d'activité	Donn./Accep. pour le dosage d'activité	Volume de suspension (mL)	Concentration en protéines (mg/mL)	Activité de la suspension (UI/mL)	Activité spécifique (UI/mg)
AspTA (P00509)	3,17	MDH	L-Asp [50 mM] / KG [2 mM]	10	22,8	1877,0	82,4
BCAT (P0AB80)	3,52	GluDH	L-Glu [50 mM] / MOPA [2 mM]	10	7,0	81,0	11,5
A4A10	9,91	Direct ACS	L-ACS [20 mM] / Pyr [2 mM]	10	9,3	25,2	2,7



A4C2	3,31	LDH	L-Ser [100 mM] / KG [10 mM]	10	11,2	37,0	3,3
A3D9	2,67	LDH	L-Ala [20 mM] / KG [2 mM]	10	11,8	76,0	6,5
A3B9	2,82	LDH	D-Ala [20 mM] / KG [2 mM]	10	6,9	105,0	15,1
Q9A3Q9	5,56	Direct HPT	HPT [20 mM] / Pyr [2 mM]	10	3,3	1,6	0,5
Q7NWX4	3,84	LDH	L-Ala [20 mM] / Butanal [2 mM] / 5 % DMSO	10	28,9	31,9	1,1

### 5.2.3 Dosages de protéines par la méthode de Bradford

Un échantillon de 20  $\mu$ L est dosé par addition de 180  $\mu$ L de solution de Bradford (100 mg de bleu de Coomassie brillant G dans 50 mL d'EtOH, 100 mL d'acide phosphorique à 85 %, eau qsp 1 L). Après agitation et incubation à 30 °C pendant 15 min, la DO est mesurée à 595 nm. Une gamme étalon de 0,01 à 0,1 mg/mL est réalisée avec une solution titrée d'albumine de sérum bovin (BSA). La concentration en protéines de l'échantillon (mg/mL) est déterminée en reportant les valeurs d'absorbance obtenues sur la courbe étalon.

## 5.3 Autres analyses biochimiques

### 5.3.1 Conversion du PLP lié à A4A10 en PMP

À 10 mL d'une solution de A4A10 (100 UI ; 0,5  $\mu$ mol) dans du tampon phosphate sont ajoutés de la LDH (100 UI) et du NADH (3 mg ; 4,2  $\mu$ mol) en solution dans 1 mL de tampon phosphate. Après addition d'1 mL d'une solution de L-Ala à 80 mM (0,8 mmol), le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite dilué avec 200 mL de tampon phosphate et déposé sur une colonne IMAC. L'enzyme A4A10 sous forme PMP est purifiée de la même façon que la A4A10 sous forme PLP.

### 5.3.2 Etude de la thermoactivité des enzymes

#### 5.3.2.1 Thermoactivité de A4A10

Un mix contenant 470  $\mu$ L de tampon phosphate 50 mM pH = 7,5 et 350  $\mu$ L d'une solution de L-ACS à 200 mM est incubé dans un bain-marie réglé à différentes températures comprises entre 10 et 80 °C, pendant 5 minutes. A la fin du temps d'incubation, le mix est introduit dans une cuve de 3 mL contenant 20  $\mu$ L de A4A10 à 0,5 UI/mL [10 mUI], 10  $\mu$ L de PLP à 5 mM [50  $\mu$ M], 100  $\mu$ L de DTNB à 10 mM [1 mM] et 50

$\mu\text{L}$  de Pyr à 200 mM [10 mM]. La cuve est incubée pendant 2 min dans le bloc thermorégulé d'un spectrophotomètre Carry 300 de chez Agilent, ajusté à la température correspondante au bain-marie, et l'activité est ensuite mesurée à la même température à 412 nm pendant 30 min, en prenant la pente maximale sur un temps de 2 minutes.

### **5.3.2.2 Thermoactivité de A4C2**

L'étude de la thermoactivité de A4C2 est réalisée en mélangeant successivement 74 mUI d'une suspension de A4C2 (au préalable centrifugée et débarrassée de son surnageant), 100  $\mu\text{L}$  de Pyr à 250 mM [25 mM], 25  $\mu\text{L}$  de PLP à 8 mM [0,2 mM], 425  $\mu\text{L}$  de tampon HEPES 0,1 M pH = 7,5 et 425  $\mu\text{L}$  de L-sérine à 400 mM [170 mM]. La réaction est agitée et incubée à différentes températures comprises entre 25 et 70 °C et un aliquot de 20  $\mu\text{L}$  est prélevé après 2, 4, 6, 8 et 10 minutes pour être dosé. A l'aliquot sont alors immédiatement rajoutés 90  $\mu\text{L}$  d'une solution de NaOH à 0,44 M [0,2 M] pour stopper la réaction et 90  $\mu\text{L}$  d'une solution de WST-1 à 0,49 mg/mL [0,22 mg/mL]. Le mélange est ensuite incubé pendant 10 minutes à 60 °C et l'absorbance est mesurée à 600 nm à 30 °C. L'activité de l'enzyme aux différentes températures est enfin calculée à partir de la variation d'absorbance mesurée aux différents temps.

### **5.3.3 Etude de la thermostabilité des enzymes**

Un échantillon de 2 mUI d'une suspension de TA est centrifugé et repris dans 20  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate 50 mM pH = 7,5 pour chaque temps de mesure et chaque température. Chaque échantillon est alors incubé à 30 ou 60°C pendant 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 31, 48, 72, 120, 168, 192, 216 et 240 h. A l'issue de ce temps, l'échantillon considéré est directement utilisé avec le test approprié (Tableau 44) en plaque 96 puits, et son activité à 30 °C est mesurée.

### **5.3.4 Dosage de l'activité des Hits pour les cétoacides $\gamma$ -hydroxylés**

Le dosage de l'activité de A3D9 et de A3B9 envers HOP et HOPB est effectué en macrocuve de 1 mL au spectrophotomètre. Le tampon utilisé pour la préparation des solutions et les essais enzymatiques est du tampon phosphate 0,1 M pH = 7,6. Le protocole utilisé est le suivant : dans une macrocuve sont introduits successivement 10  $\mu\text{L}$  d'une solution de HOP ou HOPB à 5 mM [50  $\mu\text{M}$ ], 50  $\mu\text{L}$  de L- ou D-Ala à 200 mM [10 mM], 20  $\mu\text{L}$  de NADH à 14 mM [280  $\mu\text{M}$ ], 100  $\mu\text{L}$  de PLP à 10 mM [10  $\mu\text{M}$ ] et 895  $\mu\text{L}$  de

tampon phosphate. La réaction est initiée par ajout de 10  $\mu\text{L}$  de LDH à 100 UI/mL [1 UI]. Une fois que tout le pyruvate est consommé et que la DO est stabilisée, 5  $\mu\text{L}$  de A3D9 ou A3B9 à 2 UI/mL [10 mIU] sont ajoutés au mélange. La variation de DO est mesurée au cours du temps et l'activité de la TA est calculée.

### 5.3.5 Micro-synthèses avec les cétoacides $\gamma$ -hydroxylés

À une solution de HOP (39,0 mg ; 0,25 mmol) ou de HOPB (54,0 mg ; 0,25 mmol) dans de l'eau (20 mL) est ajoutée de la L- ou D-Ala (94,0 mg ; 1 mmol). Le pH est ajusté à 7,6 avec une solution de KOH 1 M et le volume est ajusté à 25 mL avec de l'eau. 5 UI d'une suspension de A3D9 ou de A3B9 sont enfin centrifugées et le culot enzymatique est ajouté au mélange réactionnel après élimination du surnageant (les unités ici considérées sont celles qui ont été mesurées précédemment avec le HOP ou le HOPB et l'Ala). Le milieu est mis à agiter doucement pendant 19 h à température ambiante. Un aliquot de 20  $\mu\text{L}$  est prélevé après 0, 2 et 19 h et la concentration en pyruvate est dosée à l'aide du test à la LDH selon le protocole suivant : dans une macrocuvette sont introduits 20  $\mu\text{L}$  de NADH à 14 mM [280  $\mu\text{M}$ ], 10  $\mu\text{L}$  de LDH à 100 UI/mL [1 UI] et 950  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate 0,1 M pH = 7,6. Après stabilisation et mesure de la DO initiale, 20  $\mu\text{L}$  de milieu réactionnel sont ajoutés au mélange, et le  $\Delta\text{DO}$  est mesuré. La concentration en pyruvate dans la cuve est calculée selon la loi de Beer-Lambert.

### 5.3.6 Analyse de la désulfination de l'ACS par RMN

À 2,5 mL d'une solution de L- ou D-ACS 10 mM et de PLP 0,05 mM sont ajoutés 0,3 UI de A3B9 dialysée dans du tampon (les unités sont mesurées au préalable avec le test direct à l'ACS sans accepteur). Le mélange réactionnel est incubé à 30 °C et des aliquots de 450  $\mu\text{L}$  sont prélevés après 0, 1, 2, 7 et 8 h, chauffés à 70 °C pendant 10 min, puis congelés jusqu'à analyse. Les échantillons sont alors décongelés et centrifugés à 14000  $g$  pendant 5 min. 50  $\mu\text{L}$  d'une solution de TSPD<sub>4</sub> 10 mM dans D<sub>2</sub>O sont ajoutés comme standard interne, et le mélange est analysé par RMN<sup>1</sup>H.

## 6 Criblages des banques de transaminases

Les criblages sont réalisés en quatre étapes. La première consiste à diluer les lysats fournis par le Génoscope pour obtenir une solution mère directement utilisable pour les criblages. La seconde consiste en la préparation des Mix contenant tous les réactifs chimiques nécessaires aux tests. La troisième consiste à mélanger la solution mère avec

les différents Mix et du tampon phosphate, en utilisant la plateforme de pipetage automatisée pour lancer les réactions enzymatiques dans les plaques de lecture. La dernière consiste à lire la variation d'absorbance de chaque puits de la plaque précédemment préparée, à l'aide du module d'analyse spectrophotométrique de la plateforme TECAN Evo™.

## **6.1 Plaque mère de lysats**

La plaque mère de lysat est préparée en mélangeant 18 µL de lysat envoyé par le Génoscope et 162 µL de tampon. Dans le cas du test couplé à l'ACS, le tampon phosphate utilisé pour la préparation de la plaque-mère contient de l'AspTA à hauteur de 0,2 UI/mL.

## **6.2 Préparation des Mix**

Pour le criblage des banques TAM(A) et TAM(C) les solutions de cétoacides (20 mM) sont préparées dans du tampon phosphate 50 mM pH = 7,5, à l'exception de l'OPBA qui est préparé avec 50 % volumique de DMSO. Pour TAM(D), les solutions des substrats accepteurs (20 mM) sont préparées dans 50 % de tampon et 50 % de DMSO. La solution d'acétone est préparée en mélangeant successivement 4 µL d'acétone, 5 mL de DMSO et 5 mL de tampon.

La solution de DTNB est préparée en dissolvant 119 mg de DTNB dans 3 mL d'éthanol et en ajustant le volume à 30 mL avec du tampon. La solution contient donc du DTNB à 10 mM [1 mM] et 10 % d'éthanol [1 %].

### **6.2.1 Mix pour le test direct au L-ACS**

Pour les criblages avec le test direct au L-ACS, 12 mL de Mix sont préparés pour chaque accepteur en mélangeant 2,4 mL d'une solution de L-ACS à 200 mM [20 mM], 2,4 mL d'une solution de DTNB à 10 mM [1 mM], 2,4 mL d'une solution d'accepteur à 20 mM [2 mM] et 4,8 mL de tampon. 120 µL d'une solution de PLP à 10 mM [0,5 mM] sont ensuite ajoutés et le mix obtenu est réparti dans 12 puits d'une plaque DeepWell.

### **6.2.2 Mix pour le test direct au D-ACS**

Pour les criblages avec le test direct au D-ACS, 12 mL de Mix sont préparés pour chaque accepteur en mélangeant 2,4 mL d'une solution de D-ACS à 100 mM [10 mM], 2,4 mL d'une solution de DTNB à 10 mM [1 mM], 2,4 mL d'une solution d'accepteur à 20 mM

[2 mM] et 4,8 mL de tampon. 120  $\mu$ L d'une solution de PLP à 10 mM [0,5 mM] sont ensuite ajoutés et le mix obtenu est réparti dans 12 puits d'une plaque DeepWell.

### **6.2.3 Mix pour le test couplé à l'ACS**

Pour les criblages avec le test couplé à l'ACS, 12 mL de Mix sont préparés pour chaque accepteur en mélangeant 2,4 mL d'une solution de L-ACS à 200 mM [20 mM], 2,4 mL d'une solution de L- ou D-Glu à 200 mM [20 mM], 2,4 mL d'une solution de DTNB à 10 mM [1 mM], 2,4 mL d'une solution d'accepteur à 20 mM [2 mM] et 2,4 mL de tampon. 120  $\mu$ L d'une solution de PLP à 10 mM [0,5 mM] sont ensuite ajoutés et le mix obtenu est réparti dans 12 puits d'une plaque DeepWell.

### **6.2.4 Mix pour le test direct à l'HPT**

Pour les criblages avec le test direct à l'HPT, 12 mL de Mix sont préparés pour chaque accepteur en mélangeant 2,4 mL d'une solution d'HPT à 100 mM [10 mM], 2,4 mL d'une solution de DTNB à 10 mM [1 mM], 2,4 mL d'une solution d'accepteur à 20 mM [2 mM] et 4,8 mL de tampon. 120  $\mu$ L d'une solution de PLP à 10 mM [0,5 mM] sont ensuite ajoutés et le mix obtenu est réparti dans 12 puits d'une plaque DeepWell.

## **6.3 Mélange des différents composants et lecture**

Les réactions enzymatiques sont réalisées en mélangeant 20  $\mu$ L de la solution mère de lysat, 80  $\mu$ L de tampon phosphate 0,5 M pH = 7,5 et 100  $\mu$ L du mix contenant les différents réactifs chimiques correspondant au test choisi. Dans le cas du test couplé à l'ACS, le tampon phosphate utilisé pour compléter le volume (80  $\mu$ L) contient de l'AspTA à hauteur de 0,2 UI/mL. La plaque est ensuite agitée à 30 °C pendant 90 secondes et lue à 412 nm à la même température pendant 30 minutes. Les résultats bruts sont récupérés et traités par informatique.

# **Bibliographie**



# Bibliographie

- (1) Pasteur, L. *Académie des Sciences*. Paris May 15, 1848, pp 535–538.
- (2) Rentsch, K. M. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2002**, *54* (1–3), 1–9.
- (3) Nguyen, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* **2006**, *2* (2), 85–100.
- (4) Vargesson, N. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **2015**, n/a – n/a.
- (5) Savile, C. K.; Janey, J. M.; Mundorff, E. C.; Moore, J. C.; Tam, S.; Jarvis, W. R.; Colbeck, J. C.; Krebber, A.; Fleitz, F. J.; Brands, J.; Devine, P. N.; Huisman, G. W.; Hughes, G. J. *Science* **2010**, *329* (5989), 305–309.
- (6) Koszelewski, D.; Tauber, K.; Faber, K.; Kroutil, W. *Trends Biotechnol.* **2010**, *28* (6), 324–332.
- (7) 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. *Biotechnol. Adv.* **2015**.
- (8) Batchelor, F. R.; Doyle, F. P.; Nayler, J. H. C.; Rolinson, G. N. *Nature* **1959**, *183* (4656), 257–258.
- (9) Ruiz-Mesia, L.; Ruiz-Mesía, W.; Reina, M.; Martínez-Díaz, R.; de Inés, C.; Guadaño, A.; González-Coloma, A. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (6), 1921–1926.
- (10) Woodward, R. B.; Doering, W. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, *66* (5), 849–849.
- (11) Woodward, R. B.; Doering, W. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, *67* (5), 860–874.
- (12) Ikeda, M. In *Microbial production of l-amino acids*; Springer, 2003; pp 1–35.
- (13) Breuer, M.; Ditrich, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Keßeler, M.; Stürmer, R.; Zelinski, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (7), 788–824.
- (14) Drauz, K.; Grayson, I.; Kleemann, A.; Krimmer, H.-P.; Leuchtenberger, W.; Weckbecker, C. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2007.
- (15) Ivanov, K.; Stoimenova, A.; Obreshkova, D.; Saso, L. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2013**, *27* (2), 3620–3626.
- (16) *Stereoselective Formation of Amines*; Li, W., Zhang, X., Eds.; Topics in Current Chemistry; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2014; Vol. 343.
- (17) *Asymmetric Synthesis and Application of alpha-Amino Acids*; Soloshonok, V. A., Izawa, K., Eds.; OUP USA ACS Symposium Series, 2009.
- (18) Nugent, T. C. *Chiral Amines Synthesis: Methods, Developments and Applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Bremen (Germany), 2010.
- (19) Liu, G.; Cogan, D. A.; Ellman, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (41), 9913–9914.
- (20) Ooi, T.; Uematsu, Y.; Maruoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (8), 2548–2549.
- (21) Uraguchi, D.; Terada, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (17), 5356–5357.
- (22) Côté, A.; Boezio, A. A.; Charette, A. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (15), 5405–5410.
- (23) Tokunaga, N.; Otomaru, Y.; Okamoto, K.; Ueyama, K.; Shintani, R.; Hayashi, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (42), 13584–13585.
- (24) Vineyard, B. D.; Knowles, W. S.; Sabacky, M. J.; Bachman, G. L.; Weinkauff, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (18), 5946–5952.
- (25) Tang, W.; Zhang, X. *Org. Lett.* **2002**, *4* (23), 4159–4161.
- (26) Chen, J.; Zhang, W.; Geng, H.; Li, W.; Hou, G.; Lei, A.; Zhang, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (4), 800–802.
- (27) Blaser, H.-U. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344* (1), 17–31.
- (28) Li, C.; Wang, C.; Villa-Marcos, B.; Xiao, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (44), 14450–14451.
- (29) Kadyrov, R.; Riermeier, T. H.; Dingerdissen, U.; Tararov, V.; Börner, A. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (10), 4067–4070.
- (30) Steinhuebel, D.; Sun, Y.; Matsumura, K.; Sayo, N.; Saito, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (32), 11316–11317.
- (31) Li, G.; Liang, Y.; Antilla, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (18), 5830–5831.
- (32) Nishioka, Y.; Uchida, T.; Katsuki, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (6), 1739–1742.
- (33) Phua, P. H.; White, A. J. P.; de Vries, J. G.; Hii, K. K. (Mimi). *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348* (4–5), 587–592.
- (34) Lu, X.; Deng, L. *Angew. Chem.* **2008**, *120* (40), 7824–7827.
- (35) Huang, L.; Arndt, M.; Gooßen, K.; Heydt, H.; Gooßen, L. *J. Chem. Rev.* **2015**, *115* (7), 2596–2697.
- (36) Yang, Y.; Shi, S.-L.; Niu, D.; Liu, P.; Buchwald, S. L. *Science* **2015**, *349* (6243), 62–66.
- (37) Drauz, K. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook*; John Wiley & Sons, 2012.
- (38) Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K. *Nature* **2012**, *485* (7397), 185–194.
- (39) Ricca, E.; Brucher, B.; Schrittwieser, J. H. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353* (13), 2239–2262.



- (40) Ghislieri, D.; Turner, N. J. *Top. Catal.* **2014**, *57* (5), 284–300.
- (41) Höhne, M.; Bornscheuer, U. T. *ChemCatChem* **2009**, *1* (1), 42–51.
- (42) Hauer, B.; Schneider, N.; Drew, D.; Ditrich, K.; Turner, N.; Nestl, B. M. Biocatalyst for Catalytic Hydroamination. US2012123155 (A1), May 17, 2012.
- (43) Paetzold, J.; Bäckvall, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (50), 17620–17621.
- (44) Sylđatk, C.; May, O.; Altenbuchner, J.; Mattes, R.; Siemann, M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51* (3), 293–309.
- (45) May, O.; Nguyen, P. T.; Arnold, F. H. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18* (3), 317–320.
- (46) Alexandre, F.-R.; Pantaleone, D. P.; Taylor, P. P.; Fotheringham, I. G.; Ager, D. J.; Turner, N. J. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43* (4), 707–710.
- (47) Caligiuri, A.; D'Arrigo, P.; Gefflaut, T.; Molla, G.; Pollegioni, L.; Rosini, E.; Rossi, C.; Servi, S. *Biocatal. Biotransformation* **2006**, *24* (6), 409–413.
- (48) Hayashi, M.; Yamamoto, H.; Kimoto, N. Method for producing l-amino acids. US2009209012 (A1), August 20, 2009.
- (49) Li, T.; Liang, J.; Ambrogelly, A.; Brennan, T.; Gloor, G.; Huisman, G.; Lalonde, J.; Lekhal, A.; Mijts, B.; Muley, S.; Newman, L.; Tobin, M.; Wong, G.; Zaks, A.; Zhang, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (14), 6467–6472.
- (50) Bommarius, A. S.; Schwarm, M.; Drauz, K. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **1998**, *5* (1–4), 1–11.
- (51) Wichmann, R.; Wandrey, C.; Bückmann, A. F.; Kula, M. *Biotechnol. Bioeng.* **1981**, *23* (12), 2789–2802.
- (52) Hanson, R. L.; Goldberg, S. L.; Brzozowski, D. B.; Tully, T. P.; Cazzulino, D.; Parker, W. L.; Lyngberg, O. K.; Vu, T. C.; Wong, M. K.; Patel, R. N. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349* (8–9), 1369–1378.
- (53) Vedha-Peters, K.; Gunawardana, M.; Rozzell, J. D.; Novick, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (33), 10923–10929.
- (54) Abrahamson, M. J.; Vázquez-Figueroa, E.; Woodall, N. B.; Moore, J. C.; Bommarius, A. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (16), 3969–3972.
- (55) MITSUKURA, K.; SUZUKI, M.; SHINODA, S.; KURAMOTO, T.; YOSHIDA, T.; NAGASAWA, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75* (9), 1778–1782.
- (56) Mitsukura, K.; Kuramoto, T.; Yoshida, T.; Kimoto, N.; Yamamoto, H.; Nagasawa, T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *97* (18), 8079–8086.
- (57) Leipold, F.; Hussain, S.; Ghislieri, D.; Turner, N. J. *ChemCatChem* **2013**, *5* (12), 3505–3508.
- (58) Chen, H.; Moore, J.; Collier, S. J.; Smith, D.; Nazor, J.; Hughes, G.; Janey, J.; Huisman, G.; Novick, S.; Agard, N.; Alvizo, O.; Cope, G.; Yeo, W.; Sukumaran, J.; Ng, S. Engineered imine reductases and methods for the reductive amination of ketone and amine compounds. CN104428313 (A), March 18, 2015.
- (59) Scheller, P. N.; Lenz, M.; Hammer, S. C.; Hauer, B.; Nestl, B. M. *ChemCatChem* **2015**, n/a – n/a.
- (60) Moore, J. T.; Langley, R. H. *Biochemistry For Dummies*; Wiley, 2008.
- (61) Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th edition.; W. H. Freeman: New York, NY, 2008.
- (62) Moore, J. T.; Langley, R. H. *Biochemistry For Dummies*; John Wiley & Sons, 2011.
- (63) Needham, D. M. *Biochem. J.* **1930**, *24* (1), 208.
- (64) Metzler, D. E.; Ikawa, M.; Snell, E. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76* (3), 648–652.
- (65) *Biochem. Educ.* **1978**, *6* (4), 98–98.
- (66) Bitensky, L. *Cell Biochem. Funct.* **1988**, *6* (4), 290–290.
- (67) Percudani, R.; Peracchi, A. *EMBO Rep.* **2003**, *4* (9), 850–854.
- (68) Percudani, R.; Peracchi, A. *BMC Bioinformatics* **2009**, *10* (1), 273.
- (69) Mehta, P. K.; Hale, T. I.; Christen, P. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *186* (1–2), 249–253.
- (70) Mehta, P. K.; Hale, T. I.; Christen, P. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *214* (2), 549–561.
- (71) Grishin, N. V.; Phillips, M. A.; Goldsmith, E. J. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **1995**, *4* (7), 1291–1304.
- (72) Christen, P.; Mehta, P. K. *Chem. Rec.* **2001**, *1* (6), 436–447.
- (73) Heyl, D.; Luz, E.; Harris, S. A.; Folkers, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73* (7), 3430–3433.
- (74) Hellmann, H.; Mooney, S. *Molecules* **2010**, *15* (1), 442–459.
- (75) Lam, H. M.; Winkler, M. E. *J. Bacteriol.* **1990**, *172* (11), 6518–6528.
- (76) Fitzpatrick, T. B.; Amrhein, N.; Kappes, B.; Macheroux, P.; Tews, I.; Raschle, T. *Biochem. J.* **2007**, *407* (1), 1–13.
- (77) Mooney, S.; Leuendorf, J.-E.; Hendrickson, C.; Hellmann, H. *Molecules* **2009**, *14* (1), 329–351.
- (78) Kim, J.; Kershner, J. P.; Novikov, Y.; Shoemaker, R. K.; Copley, S. D. *Mol. Syst. Biol.* **2010**, *6*.
- (79) Eliot, A. C.; Kirsch, J. F. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73* (1), 383–415.
- (80) Kronenberger, T.; Lunev, S.; Wrenger, C.; Groves, M. R. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **2014**, *70* (11), 1550–1555.

- (81) Frey, P. A. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70* (1), 121–148.
- (82) Toney, M. D. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2011**, *1814* (11), 1407–1418.
- (83) Zhou, X.; Jin, X.; Medhekar, R.; Chen, X.; Dieckmann, T.; Toney, M. D. *Biochemistry (Mosc.)* **2001**, *40* (5), 1367–1377.
- (84) Taylor, J. L.; Price, J. E.; Toney, M. D. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2015**, *1854* (2), 146–155.
- (85) Sun, S.; Zabinski, R. F.; Toney, M. D. *Biochemistry (Mosc.)* **1998**, *37* (11), 3865–3875.
- (86) Liu, W.; Rogers, C. J.; Fisher, A. J.; Toney, M. D. *Biochemistry (Mosc.)* **2002**, *41* (41), 12320–12328.
- (87) Jansonius, J. N. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8* (6), 759–769.
- (88) Mehta, P. K.; Christen, P. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*; Purich, D. L., Ed.; John Wiley & Sons, Inc., 2000; pp 129–184.
- (89) Dunathan, H. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1966**, *55* (4), 712.
- (90) Christen, P.; Korpela. *Biochemistry of Vitamin B6: Proceedings of the 7th International Congress on Chemical and Biological Aspects of Vitamin B6 Catalysis, held in Turku, Finland, June 22–26, 1987*; Springer, 2013.
- (91) Ford, G. C.; Eichele, G.; Jansonius, J. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, *77* (5), 2559–2563.
- (92) Watanabe, N.; Sakabe, K.; Sakabe, N.; Higashi, T.; Sasaki, K.; Aibara, S.; Morita, Y.; Yonaha, K.; Toyama, S.; Fukutani, H. *J. Biochem. (Tokyo)* **1989**, *105* (1), 1–3.
- (93) Sugio, S.; Petsko, G. A.; Manning, J. M.; Soda, K.; Ringe, D. *Biochemistry (Mosc.)* **1995**, *34* (30), 9661–9669.
- (94) Alexander, F. W.; Sandmeier, E.; Mehta, P. K.; Christen, P. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *219* (3), 953–960.
- (95) Clausen, T.; Huber, R.; Laber, B.; Pohlenz, H.-D.; Messerschmidt, A. *J. Mol. Biol.* **1996**, *262* (2), 202–224.
- (96) Yoshimura, T.; Nishimura, K.; Ito, J.; Esakik, N.; Kagamiyama, H.; Manning, J. M.; Soda, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (10), 3897–3900.
- (97) Shaw, J. P.; Petsko, G. A.; Ringe, D. *Biochemistry (Mosc.)* **1997**, *36* (6), 1329–1342.
- (98) Schneider, G.; Käck, H.; Lindqvist, Y. *Structure* **2000**, *8* (1), R1–R6.
- (99) Käck, H.; Sandmark, J.; Gibson, K.; Schneider, G.; Lindqvist, Y. *J. Mol. Biol.* **1999**, *291* (4), 857–876.
- (100) Schiroli, D.; Peracchi, A. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2015**.
- (101) Hwang, B.-Y.; Cho, B.-K.; Yun, H.; Koteswar, K.; Kim, B.-G. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2005**, *37* (1–6), 47–55.
- (102) Höhne, M.; Schätzle, S.; Jochens, H.; Robins, K.; Bornscheuer, U. T. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6* (11), 807–813.
- (103) Yonaha, K.; Misono, H.; Yamamoto, T.; Soda, K. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250* (17), 6983–6989.
- (104) Blaser, H. U.; Schmidt, E. *Asymmetric Catalysis on Industrial Scale: Challenges, Approaches and Solutions*; John Wiley & Sons, 2007.
- (105) Lo, H.-H.; Hsu, S.-K.; Lin, W.-D.; Chan, N.-L.; Hsu, W.-H. *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21* (2), 411–415.
- (106) Alaux, S.; Kusk, M.; Sagot, E.; Bolte, J.; Jensen, A. A.; Bräuner-Osborne, H.; Gefflaut, T.; Bunch, L. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (25), 7980–7992.
- (107) Faure, S.; Jensen, A. A.; Maurat, V.; Gu, X.; Sagot, E.; Aitken, D. J.; Bolte, J.; Gefflaut, T.; Bunch, L. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (22), 6532–6538.
- (108) Ahmad, A. L.; Oh, P. C.; Abd Shukor, S. R. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27* (3), 286–296.
- (109) Assaf, Z.; Larsen, A. P.; Venskutonytė, R.; Han, L.; Abrahamsen, B.; Nielsen, B.; Gajhede, M.; Kastrup, J. S.; Jensen, A. A.; Pickering, D. S.; Frydenvang, K.; Gefflaut, T.; Bunch, L. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (4), 1614–1628.
- (110) Xian, M.; Alaux, S.; Sagot, E.; Gefflaut, T. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (20), 7560–7566.
- (111) Sagot, E.; Jensen, A. A.; Pickering, D. S.; Pu, X.; Umberti, M.; Stensbøl, T. B.; Nielsen, B.; Assaf, Z.; Aboab, B.; Bolte, J.; Gefflaut, T.; Bunch, L. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (14), 4085–4092.
- (112) Gefflaut, T.; Assaf, Z.; Sancelme, M. In *Unnatural Amino Acids*; Pollegioni, L., Servi, S., Eds.; Humana Press, 2012; pp 55–72.
- (113) Jenkins, W. T. *Anal. Biochem.* **1979**, *93* (1), 134–138.
- (114) Baldwin, J. E.; Dyer, R. L.; Ng, S. C.; Pratt, A. J.; Russell, M. A. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (32), 3745–3746.
- (115) Passerat, N.; Bolte, J. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (12), 1277–1280.
- (116) Echaliier, F.; Constant, O.; Bolte, J. *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (10), 2747–2750.
- (117) Helaine, V.; Rossi, J.; Bolte, J. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (36), 6577–6580.
- (118) Helaine, V.; Rossi, J.; Gefflaut, T.; Alaux, S.; Bolte, J. *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343* (6–7), 692–697.
- (119) Cho, B.-K.; Cho, H. J.; Park, S.-H.; Yun, H.; Kim, B.-G. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *81* (7), 783–789.

- (120) Caligiuri, A.; D'Arrigo, P.; Gefflaut, T.; Molla, G.; Pollegioni, L.; Rosini, E.; Rossi, C.; Servi, S. *Biocatal. Biotransformation* **2006**, *24* (6), 409–413.
- (121) Lo, H.-H.; Lin, W.-D.; Hsu, S.-K.; Hsu, W.-H. *Biotechnol. Prog.* **2009**, *25* (6), 1637–1642.
- (122) Hong, E. young; Cha, M.; Yun, H.; Kim, B.-G. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2010**, *66* (1–2), 228–233.
- (123) Wang, X.-G.; Zhang, P.; Lynch, S.; Engel, P. C. *Biocatal. Biotransformation* **2010**, *28* (5–6), 293–303.
- (124) Seo, Y.-M.; Yun, H. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *21* (10), 1049–1052.
- (125) Kim, J.-Y.; Lee, Y.-A.; Wittmann, C.; Park, J.-B. *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110* (11), 2846–2855.
- (126) Hanzawa, S.; Oe, S.; Tokuhisa, K.; Kawano, K.; Kobayashi, T.; Kudo, T.; Kakidani, H. *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23* (8), 589–591.
- (127) Meiwes, J.; Schudok, M.; Kretzschmar, G. *Tetrahedron Asymmetry* **1997**, *8* (4), 527–536.
- (128) Ager, D. J.; Li, T.; Pantaleone, D. P.; Senkpeil, R. F.; Taylor, P. P.; Fotheringham, I. G. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2001**, *11* (4–6), 199–205.
- (129) Cameron, M.; Cohen, D.; Cottrell, I. F.; Kennedy, D. J.; Roberge, C.; Chartrain, M. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2001**, *14* (1–3), 1–5.
- (130) Koma, D.; Sawai, T.; Hara, R.; Harayama, S.; Kino, K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *79* (5), 775–784.
- (131) Cho, B.-K.; Seo, J.-H.; Kang, T.-J.; Kim, J.; Park, H.-Y.; Lee, B.-S.; Kim, B.-G. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *94* (5), 842–850.
- (132) Crump, S. P.; Heier, J. S.; Rozzell, J. D. In *Biocatalysis*; Abramowicz, D. A., Ed.; Van Nostrand Reinhold Catalysis Series; Springer Netherlands, 1990; pp 115–133.
- (133) Cho, B.-K.; Park, H.-Y.; Seo, J.-H.; Kinnera, K.; Lee, B.-S.; Kim, B.-G. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *88* (4), 512–519.
- (134) Pinto, J. T.; Krasnikov, B. F.; Alcutt, S.; Jones, M. E.; Dorai, T.; Villar, M. T.; Artigues, A.; Li, J.; Cooper, A. J. L. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (45), 30950–30961.
- (135) Graindorge, M.; Giustini, C.; Jacomin, A. C.; Kraut, A.; Curien, G.; Matringe, M. *FEBS Lett.* **2010**, *584* (20), 4357–4360.
- (136) Graindorge, M.; Giustini, C.; Kraut, A.; Moyet, L.; Curien, G.; Matringe, M. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (6), 3198–3208.
- (137) Tanizawa, K.; Masu, Y.; Asano, S.; Tanaka, H.; Soda, K. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (5), 2445–2449.
- (138) Park, E.-S.; Shin, J.-S. *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356* (17), 3505–3509.
- (139) Simon, R. C.; Richter, N.; Busto, E.; Kroutil, W. *ACS Catal.* **2014**, *4* (1), 129–143.
- (140) Koszelewski, D.; Grischek, B.; Glueck, S. M.; Kroutil, W.; Faber, K. *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17* (1), 378–383.
- (141) Nobili, A.; Steffen-Munsberg, F.; Kohls, H.; Trentin, I.; Schulzke, C.; Höhne, M.; Bornscheuer, U. T. *ChemCatChem* **2015**, *7* (5), 757–760.
- (142) Skalden, L.; Peters, C.; Dickerhoff, J.; Nobili, A.; Joosten, H.-J.; Weisz, K.; Höhne, M.; Bornscheuer, U. T. *ChemBioChem* **2015**, *16* (7), 1041–1045.
- (143) Kohls, H.; Anderson, M.; Dickerhoff, J.; Weisz, K.; Córdova, A.; Berglund, P.; Brundiek, H.; Bornscheuer, U. T.; Höhne, M. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357* (8), 1808–1814.
- (144) Shin, G.; Mathew, S.; Yun, H. *J. Ind. Eng. Chem.* **2015**, *23*, 128–133.
- (145) Shin, J.-S.; Kim, B.-G. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *77* (7), 832–837.
- (146) Lombardo, M. E.; Araujo, L. S.; Juknat, A. A.; Batlle, A. M. del C. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *182* (3), 657–660.
- (147) Petrović, S.; KrajnovićOzretić, M.; Ozretić, B. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1994**, *1207* (2), 201–207.
- (148) Soto-Urdua, L.; Xochinua-Corona, Y. G.; Flores-Encarnacion, M.; Baca, B. E. *Can. J. Microbiol.* **1996**, *42* (3), 294–298.
- (149) Christen, P.; Metzler, D. E. *Transaminases*; Wiley, 1985.
- (150) Constantinou, L.; Gani, R. *AIChE J.* **1994**, *40* (10), 1697–1710.
- (151) Jankowski, M. D.; Henry, C. S.; Broadbelt, L. J.; Hatzimanikatis, V. *Biophys. J.* **2008**, *95* (3), 1487–1499.
- (152) Goldberg, R. N.; Tewari, Y. B. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1994**, *23* (4), 547–617.
- (153) Goldberg, R. N.; Tewari, Y. B.; Bhat, T. N. *Bioinformatics* **2004**, *20* (16), 2874–2877.
- (154) Goldberg, R. N.; Tewari, Y. B.; Bhat, T. N. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **2007**, *36* (4), 1347.
- (155) Tufvesson, P.; Jensen, J. S.; Kroutil, W.; Woodley, J. M. *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109* (8), 2159–2162.
- (156) Shin, J.-S.; Kim, B.-G. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *60* (5), 534–540.
- (157) Seo, J.-H.; Kyung, D.; Joo, K.; Lee, J.; Kim, B.-G. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108* (2), 253–263.

- (158) Tufvesson, P.; Lima-Ramos, J.; Jensen, J. S.; Al-Haque, N.; Neto, W.; Woodley, J. M. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108* (7), 1479–1493.
- (159) Lye, G. J.; Woodley, J. M. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17* (10), 395–402.
- (160) Truppo, M. D.; Rozzell, J. D.; Turner, N. J. *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14* (1), 234–237.
- (161) Shin, J.-S.; Kim, B.-G. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *55* (2), 348–358.
- (162) Shin, J.-S.; Kim, B.-G.; Shin, D.-H. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *29* (4–5), 232–239.
- (163) David Rozzell, J. In *Methods in Enzymology*; Mosbach, K., Ed.; Immobilized Enzymes and Cells, Part C; Academic Press, 1987; Vol. 136, pp 479–497.
- (164) Fadnavis, N. W.; Seo, S.-H.; Seo, J.-H.; Kim, B.-G. *Tetrahedron Asymmetry* **2006**, *17* (15), 2199–2202.
- (165) Green, A. P.; Turner, N. J.; O'Reilly, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (40), 10714–10717.
- (166) Wang, B.; Land, H.; Berglund, P. *Chem. Commun.* **2012**, *49* (2), 161–163.
- (167) Simon, R. C.; Grischek, B.; Zepeck, F.; Steinreiber, A.; Belaj, F.; Kroutil, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (27), 6713–6716.
- (168) Simon, R. C.; Zepeck, F.; Kroutil, W. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19* (8), 2859–2865.
- (169) Shin, J.-S.; Kim, B.-G. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65* (2), 206–211.
- (170) Truppo, M. D.; Turner, N. J. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (6), 1280–1283.
- (171) Mutti, F. G.; Fuchs, C. S.; Pressnitz, D.; Sattler, J. H.; Kroutil, W. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353* (17), 3227–3233.
- (172) Schätzle, S.; Steffen-Munsberg, F.; Thontowi, A.; Höhne, M.; Robins, K.; Bornscheuer, U. T. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353* (13), 2439–2445.
- (173) Mutti, F. G.; Fuchs, C. S.; Pressnitz, D.; Turrini, N. G.; Sattler, J. H.; Lerchner, A.; Skerra, A.; Kroutil, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012* (5), 1003–1007.
- (174) Pressnitz, D.; Fuchs, C. S.; Sattler, J. H.; Knaus, T.; Macheroux, P.; Mutti, F. G.; Kroutil, W. *ACS Catal.* **2013**, *3* (4), 555–559.
- (175) Höhne, M.; Kühn, S.; Robins, K.; Bornscheuer, U. T. *ChemBioChem* **2008**, *9* (3), 363–365.
- (176) Fotheringham, I. G.; Grinter, N.; Pantaleone, D. P.; Senkpeil, R. F.; Taylor, P. P. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7* (10), 2209–2213.
- (177) Sehl, T.; Hailes, H. C.; Ward, J. M.; Wardenga, R.; von Lieres, E.; Offermann, H.; Westphal, R.; Pohl, M.; Rother, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (26), 6772–6775.
- (178) Sehl, T.; Hailes, H. C.; Ward, J. M.; Menyes, U.; Pohl, M.; Rother, D. *Green Chem.* **2014**, *16* (6), 3341–3348.
- (179) Cho, B.-K.; Seo, J.-H.; Kim, J.; Lee, C.-S.; Kim, B.-G. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2006**, *11* (4), 299–305.
- (180) Leskovac, V.; Trivić, S.; Pericin, D. *FEMS Yeast Res.* **2002**, *2* (4), 481–494.
- (181) Cassimjee, K. E.; Branneby, C.; Abedi, V.; Wells, A.; Berglund, P. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (30), 5569–5571.
- (182) Hwang, J.-Y.; Park, J.; Seo, J.-H.; Cha, M.; Cho, B.-K.; Kim, J.; Kim, B.-G. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102* (5), 1323–1329.
- (183) Fotheringham, I.; Oswald, N. Method to increase the yield and improve purification of products from transaminase reactions. US8076106 B2, December 13, 2011.
- (184) Li, T.; Kootstra, A. B.; Fotheringham, I. G. *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6* (4), 533–538.
- (185) Koszelewski, D.; Goritzner, M.; Clay, D.; Seisser, B.; Kroutil, W. *ChemCatChem* **2010**, *2* (1), 73–77.
- (186) Nakajima, N.; Tanizawa, K.; Tanaka, H.; Soda, K. *J. Biotechnol.* **1988**, *8* (3), 243–248.
- (187) Sattler, J. H.; Fuchs, M.; Tauber, K.; Mutti, F. G.; Faber, K.; Pfeffer, J.; Haas, T.; Kroutil, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (36), 9156–9159.
- (188) Banks, B. E. C.; Lawrence, A. J.; Thain, E. M.; Vernon, C. A. *J. Chem. Soc. Resumed* **1963**, No. 0, 5799–5806.
- (189) Diamondstone, T. I. *Anal. Biochem.* **1966**, *16* (3), 395–401.
- (190) Scandurra, R.; Cannella, C. *Anal. Biochem.* **1969**, *27* (2), 253–256.
- (191) Cooper, A. J. L. *Anal. Biochem.* **1978**, *89* (2), 451–460.
- (192) Schätzle, S.; Höhne, M.; Redestad, E.; Robins, K.; Bornscheuer, U. T. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (19), 8244–8248.
- (193) Scheidt, T.; Land, H.; Anderson, M.; Chen, Y.; Berglund, P.; Yi, D.; Fessner, W.-D. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357* (8), 1721–1731.
- (194) Raunio, R. *Acta Chem. Scand.* **1969**, *23* (4), 1168–1174.
- (195) Duggan, D. E.; Wechsler, J. A. *Anal. Biochem.* **1973**, *51* (1), 67–79.
- (196) Matsuzawa, T.; Katunuma, N. *Anal. Biochem.* **1966**, *17* (1), 143–153.
- (197) Sohachi, A.; Yoko, F. Colorimetric Method for the Quantitative Determination of Oxalacetic Acid. US3490874 (A), January 20, 1970.

- (198) Schepartz, B. *Anal. Biochem.* **1969**, *30* (3), 443–448.
- (199) Szkop, M.; Sikora, P.; Orzechowski, S. *Folia Microbiol. (Praha)* **2012**, *57* (1), 1–4.
- (200) Kim, H. R.; Rho, H. W.; Park, J. W.; Park, B. H.; Kim, J. S.; Lee, M. W. *Anal. Biochem.* **1994**, *223* (2), 205–207.
- (201) Ogawa, Y.; Kometani, Y.; Baba, Y. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1968**, *16* (10), 1937–1941.
- (202) Pineda, M.; Piedras, P.; Cardenas, J. *Anal. Biochem.* **1994**, *222* (2), 450–455.
- (203) Truppo, M. D.; Rozzell, J. D.; Moore, J. C.; Turner, N. J. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *7* (2), 395–398.
- (204) Schadewaldt, P.; Adelmeyer, F. *Anal. Biochem.* **1996**, *238* (1), 65–71.
- (205) Schadewaldt, P.; Hummel, W.; Wendel, U.; Adelmeyer, F. *Anal. Biochem.* **1995**, *230* (2), 199–204.
- (206) Luong, T. N.; Kirsch, J. F. *Anal. Biochem.* **1997**, *253* (1), 46–49.
- (207) Yoshida, T.; Mitsunaga, T.; Yamada, H.; Izumi, Y. *Anal. Biochem.* **1993**, *208* (2), 296–299.
- (208) Yagi, T.; Kagamiyama, H.; Ohtawara, S.; Soda, K.; Nozaki, M. *Anal. Biochem.* **1979**, *100* (1), 20–24.
- (209) Yu, X.; Bresser, J.; Schall, I.; Djurdjevic, I.; Buckel, W.; Wang, X.; Engel, P. C. *Anal. Biochem.* **2012**, *431* (2), 127–131.
- (210) Schaeffer, J. M.; Mallorga, P.; Austin, L.; Mandel, P. *Anal. Biochem.* **1978**, *90* (1), 239–245.
- (211) Akabayashi, A.; Kato, T. *Anal. Biochem.* **1989**, *182* (1), 129–135.
- (212) Chapman, J.; Zhou, M. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *402* (1–2), 47–52.
- (213) Walton, C. J. W.; Chica, R. A. *Anal. Biochem.* **2013**, *441* (2), 190–198.
- (214) Cooper, A. J. L.; Conway, M.; Hutson, S. M. *Anal. Biochem.* **2002**, *308* (1), 100–105.
- (215) Juncosa, J. I.; Lee, H.; Silverman, R. B. *Anal. Biochem.* **2013**, *440* (2), 145–149.
- (216) Jeffery, D.; Weitzman, P. D. J.; Lunt, G. G. *Insect Biochem.* **1988**, *18* (4), 347–349.
- (217) Sawai, T.; Koma, D.; Hara, R.; Kino, K.; Harayama, S. *J. Microbiol. Methods* **2007**, *71* (1), 32–38.
- (218) O'Byrne, C. P.; Feehily, C.; Ham, R.; Karatzas, K. A. G. *J. Microbiol. Methods* **2011**, *84* (1), 137–139.
- (219) Rej, R. *Anal. Biochem.* **1982**, *119* (1), 205–210.
- (220) Bommer, M.; Ward, J. M. *Enzyme Microb. Technol.* **2013**, *52* (4–5), 218–225.
- (221) Itoh, H.; Srere, P. A. *Anal. Biochem.* **1970**, *35* (2), 405–410.
- (222) Jain, S.; Rajasingham, R.; Noubary, F.; Coonahan, E.; Schoeplein, R.; Baden, R.; Curry, M.; Afdhal, N.; Kumar, S.; Pollock, N. R. *PLoS ONE* **2015**, *10* (5).
- (223) Mann, S.; Eveleigh, L.; Lequin, O.; Ploux, O. *Anal. Biochem.* **2013**, *432* (2), 90–96.
- (224) Hwang, B.-Y.; Kim, B.-G. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *34* (5), 429–436.
- (225) Luong, J. H. T.; Mulchandani, A.; Male, K. B. *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, *13* (2), 116–122.
- (226) Weinhandl, K.; Winkler, M.; Glieder, A.; Camattari, A. *Tetrahedron* **2012**, *68* (37), 7586–7590.
- (227) Hopwood, J.; Truppo, M. D.; Turner, N. J.; Lloyd, R. C. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (2), 773.
- (228) Barber, J. E. B.; Damry, A. M.; Calderini, G. F.; Walton, C. J. W.; Chica, R. A. *Anal. Biochem.* **2014**, *463*, 23–30.
- (229) Weiß, M. S.; Pavlidis, I. V.; Vickers, C.; Höhne, M.; Bornscheuer, U. T. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (23), 11847–11853.
- (230) Holt, A.; Sharman, D. F.; Baker, G. B.; Palcic, M. M. *Anal. Biochem.* **1997**, *244* (2), 384–392.
- (231) Holt, A.; Palcic, M. M. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (5), 2498–2505.
- (232) Sehl, T.; Simon, R. C.; Hailes, H. C.; Ward, J. M.; Schell, U.; Pohl, M.; Rother, D. *J. Biotechnol.* **2012**, *159* (3), 188–194.
- (233) Schätzle, S.; Höhne, M.; Robins, K.; Bornscheuer, U. T. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (5), 2082–2086.
- (234) Hwang, B. Y.; Park, H. Y.; Lee, B. S. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *18* (1), 48–54.
- (235) Schell, U.; Wohlgemuth, R.; Ward, J. M. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *59* (4), 279–285.
- (236) Emilliozzi, R.; Pichat, L. *Bull. Société Chim. Fr.* **1959**, 1887–1888.
- (237) Benesch, R. E.; Benesch, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80* (7), 1666–1669.
- (238) Hsiao, Y.; Hegedus, L. S. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (11), 3586–3591.
- (239) Myllymäki, V. T.; Lindvall, M. K.; Koskinen, A. M. *Tetrahedron* **2001**, *57* (21), 4629–4635.
- (240) Liu, Y.; Liu, J.; Qi, X.; Du, Y. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (16), 7108–7113.
- (241) McMurray, J.; Cohen-Solal, A.; Dietz, R.; Eichhorn, E.; Erhardt, L.; Hobbs, F. D. R.; Krum, H.; Maggioni, A.; McKelvie, R. S.; Piña, I. L.; Soler-Soler, J.; Swedberg, K. *Eur. J. Heart Fail.* **2005**, *7* (5), 710–721.
- (242) Dagenais, G. R.; Pogue, J.; Fox, K.; Simoons, M. L.; Yusuf, S. *The Lancet* **2006**, *368* (9535), 581–588.
- (243) Lehr, P.; Billich, A.; Charpiot, B.; Ettmayer, P.; Scholz, D.; Rosenwirth, B.; Gstach, H. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (10), 2060–2067.
- (244) Müller, U.; van Assema, F.; Gunsior, M.; Orf, S.; Kremer, S.; Schipper, D.; Wagemans, A.; Townsend, C. A.; Sonke, T.; Bovenberg, R.; Wubbolts, M. *Metab. Eng.* **2006**, *8* (3), 196–208.
- (245) Rojanarata, T.; Opanasopit, P.; Ngawhirunpat, T.; Saehuan, C.; Wiyakrutta, S.; Meevootisom, V. *J. Biotechnol.* **2010**, *150*, 427–427.

- (246) Rojanarata, T.; Opanasopit, P.; Ngawhirunpat, T.; Saehuan, C.; Wiyakrutta, S.; Meevootisom, V. *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *46* (3–4), 292–296.
- (247) Itoh, K.; Kori, M.; Inada, Y.; Nishikawa, K.; Kawamatsu, Y.; Sugihara, H. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1986**, *34* (5), 2078–2089.
- (248) Melillo, D. G.; Larsen, R. D.; Mathre, D. J.; Shukis, W. F.; Wood, A. W.; Colleluori, J. R. *J. Org. Chem.* **1987**, *52* (23), 5143–5150.
- (249) Asano, Y.; Yamada, A.; Kato, Y.; Yamaguchi, K.; Hibino, Y.; Hirai, K.; Kondo, K. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (21), 5567–5571.
- (250) Portsmouth, D.; Stoolmiller, A. C.; Abeles, R. H. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242* (11), 2751–2759.
- (251) Stoolmiller, A. C.; Abeles, R. H. *J. Biol. Chem.* **1966**, *241* (24), 5764–5771.
- (252) Passerat, N.; Bolte, J. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (12), 1277–1280.
- (253) Lehnert, W. *Tetrahedron* **1972**, *28* (3), 663–666.
- (254) Lehnert, W. *Tetrahedron* **1973**, *29* (4), 635–638.
- (255) Kende, A. S.; Journet, M.; Ball, R. G.; Tsou, N. N. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (35), 6295–6298.
- (256) Jadav, J. S.; Srinivas, D. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (44), 7789–7792.
- (257) Nishimura, Y.; Okamoto, Y.; Ikunaka, M.; Ohyama, Y. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2011**, *59* (12), 1458–1466.
- (258) Benfatti, F.; Cardillo, G.; Gentilucci, L.; Mosconi, E.; Tolomelli, A. *Tetrahedron Asymmetry* **2007**, *18* (18), 2227–2232.
- (259) Schoepp, D. D. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *299* (1), 12–20.
- (260) Marek, G. J. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2004**, *4* (1), 18–22.
- (261) Schoepp, D. D.; Wright, R. A.; Levine, L. R.; Gaydos, B.; Potter, W. Z. *Stress* **2003**, *6* (3), 189–197.
- (262) Moldrich, R. X.; Jeffrey, M.; Talebi, A.; Beart, P. M.; Chapman, A. G.; Meldrum, B. S. *Neuropharmacology* **2001**, *41* (1), 8–18.
- (263) Leard, R. E.; Bedenbaugh, J. H.; Bedenbaugh, A. O. *J. Heterocycl. Chem.* **1983**, *20* (5), 1363–1366.
- (264) Woodward, R. B.; Hoffmann, R. J. *Am. Chem. Soc.* **1965**, *87* (2), 395–397.
- (265) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Urchegui, R.; Iturburu, M. *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (5), 1571–1579.
- (266) Hitchcock, P. B.; Papadopoulos, K.; Young, D. W. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (15), 2670–2681.
- (267) Vergne-Vaxelaire, C.; Bordier, F.; Fossey, A.; Besnard-Gonnet, M.; Debard, A.; Mariage, A.; Pellouin, V.; Perret, A.; Petit, J.-L.; Stam, M.; Salanoubat, M.; Weissenbach, J.; De Berardinis, V.; Zaparucha, A. *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355* (9), 1763–1779.
- (268) Baud, D.; Saaïdi, P.-L.; Monfleur, A.; Harari, M.; Cuccaro, J.; Fossey, A.; Besnard, M.; Debard, A.; Mariage, A.; Pellouin, V.; Petit, J.-L.; Salanoubat, M.; Weissenbach, J.; de Berardinis, V.; Zaparucha, A. *ChemCatChem* **2014**, *6* (10), 3012–3017.
- (269) Guérard-Hélaine, C.; de Berardinis, V.; Besnard-Gonnet, M.; Darii, E.; Debacker, M.; Debard, A.; Fernandes, C.; Hélaine, V.; Mariage, A.; Pellouin, V.; Perret, A.; Petit, J.-L.; Sancelme, M.; Lemaire, M.; Salanoubat, M. *ChemCatChem* **2015**, *7* (12), 1871–1879.
- (270) Reignier, T.; de Berardinis, V.; Petit, J.-L.; Mariage, A.; Hamzé, K.; Duquesne, K.; Alphanh, V. *Chem Commun* **2014**, *50* (58), 7793–7796.
- (271) Karsten, W. E.; Reyes, Z. L.; Bobyk, K. D.; Cook, P. F.; Chooback, L. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *516* (1), 67–74.
- (272) Ouchi, T.; Tomita, T.; Miyagawa, T.; Kuzuyama, T.; Nishiyama, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *388* (1), 21–27.
- (273) Binter, A.; Oberdorfer, G.; Hofzumahaus, S.; Nerstheimer, S.; Altenbacher, G.; Gruber, K.; Macheroux, P. *FEBS J.* **2011**, *278* (21), 4122–4135.
- (274) Kim, J.; Kyung, D.; Yun, H.; Cho, B.-K.; Seo, J.-H.; Cha, M.; Kim, B.-G. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73* (6), 1772–1782.
- (275) Lee, S. G.; Hong, S. P.; Song, J. J.; Kim, S. J.; Kwak, M. S.; Sung, M. H. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72* (2), 1588–1594.
- (276) Hester, G.; Stark, W.; Moser, M.; Kallen, J.; Marković-Housley, Z.; Jansonius, J. N. *J. Mol. Biol.* **1999**, *286* (3), 829–850.
- (277) Uchida, Y.; Hayashi, H.; Washio, T.; Yamasaki, R.; Kato, S.; Oikawa, T. *Extremophiles* **2014**, *18* (3), 589–602.
- (278) Hecquet, L.; Bolte, J.; Demuyne, C. *Tetrahedron* **1996**, *52* (24), 8223–8232.
- (279) Sayer, C.; Bommer, M.; Isupov, M.; Ward, J.; Littlechild, J. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2012**, *68* (7), 763–772.
- (280) 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. *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355* (1), 116–128.
- (281) Aslanidis, C.; de Jong, P. J. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18* (20), 6069–6074.



# **Annexes**







Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 8689

## Profiling substrate specificity of two series of phenethylamine analogs at monoamine oxidase A and B†

Egon Heuson,<sup>a,b</sup> Morten Storgaard,<sup>c</sup> Tri H. V. Huynh,<sup>c</sup> Franck Charmantray,<sup>a,b</sup> Thierry Gefflaut<sup>\*a,b</sup> and Lennart Bunch<sup>\*c</sup>

The membrane bound enzyme *monoamine oxidase* exist in two splice variants designated A and B (MAO-A and MAO-B) and are key players in the oxidative metabolism of monoamines in mammals. Despite their importance and being a prevalent target for the development of inhibitors as drugs, no systematic study of substrate specificity has been reported. In this study we present a systematic study of the MAO-A and MAO-B substrate specificity profile by probing two series of phenethylamine analogs.  $K_m$  and  $k_{cat}$  values were determined for four *N*-alkyl analogs **2–5** and four aryl halide analogs **6–9** at MAO-A and MAO-B. A following *in silico* study disclosed a new adjacent compartment to the MAO-B substrate pocket defined by amino acids Tyr188, Tyr435, Tyr398, Thr399, Cys172 and Gly434. This new insight is important for the understanding of the substrate specificity of the MAO-B enzyme and will be relevant for future drug design within the field of monoamines.

Received 2nd July 2014,  
Accepted 11th September 2014

DOI: 10.1039/c4ob01377h

www.rsc.org/obc

### Introduction

Monoamine oxidase (MAO) is a flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent enzyme bound to the outer mitochondrial membrane and is responsible for the oxidative deamination of monoamines such as monoaminergic neurotransmitters, dietary amines and hormones.<sup>1,2</sup> The enzyme exists in two isoforms, MAO-A and MAO-B, which display 70% amino acid residue identity.<sup>3</sup> While MAO-A is found in the brain, liver, the gastrointestinal tract and in placenta, MAO-B is only found in the brain and blood platelets.<sup>4</sup> Aside from differences in tissue distribution, the A/B isoforms also differ in substrate specificity. MAO-A is the predominant isoform for deamination of *e.g.* the neurotransmitters serotonin, adrenalin and noradrenalin,<sup>4</sup> whereas MAO-B preferentially deaminates lipophilic monoamines *e.g.* benzylamine, phenethylamine (PEA, **1**) and octylamine. The primary amines, dopamine, tyramine, kynuramine and tryptamine are common substrates for both

isoforms.<sup>5</sup> Because the MAO enzymes are key actors in the metabolism of the monoaminergic neurotransmitters, a large number of inhibitors have been synthesized to discover novel drugs for the treatment of psychiatric and/or neurological disorders.<sup>6,7</sup> MAO-A inhibitors have found use as antidepressant<sup>8,9</sup> and anxiolytic drugs,<sup>10,11</sup> whereas MAO-B inhibitors are used for the treatment of Parkinson's<sup>12,13</sup> and Alzheimer's diseases.<sup>7</sup>

In contrast, a limited number of MAO substrates have been reported: Kynuramine<sup>14</sup> (Fig. 1), a metabolite of melatonin,<sup>15</sup> is a substrate for both MAO-A and B and used in *in vitro* MAO assays.<sup>16</sup> The substrate 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)<sup>17</sup> is converted into a neurotoxin by MAO-B<sup>18</sup> and has been explored as a scaffold for the synthesis of other MAO-substrates including 1-methyl-3-phenyl-2,5-dihydro-1*H*-pyrrole,<sup>19,20</sup> 2-methylisoindolines,<sup>19</sup> 4-(1-methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-1-(prop-2-yn-1-yl)piperidine,<sup>21</sup> 3,4-cyclopropyl analogs of MPTP<sup>22</sup> as well as 1-methyl-3-phenylpyrrolidine and the 3,4-cyclopropyl analogs hereof<sup>23</sup> (Fig. 1). Finally the MAO A/B substrate specificity of some neurological drugs have been investigated in order to get a more detailed understanding of the drug's pharmacokinetic properties (Sumatriptan – an anti-migraine drug<sup>24</sup> and Citalopram – an antidepressive drug,<sup>25</sup> Fig. 1).

Systematic studies of MAO-A and MAO-B substrate specificities find applications in diverse research areas such as drug discovery, development of enzyme activity assays, and new enzyme-based synthetic methodology. In contrast to the diverse and chemically complex MAO substrates depicted in

<sup>a</sup>Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup>CNRS, UMR 6296, ICCF, 63177 Aubière, France.

E-mail: thierry.gefflaut@univ-bpclermont.fr; Fax: +33 473407717; Tel: +33 473407866

<sup>c</sup>Department of Drug Design and Pharmacology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Universitetsparken 2, DK-2100 Copenhagen Ø, Denmark. E-mail: lebu@sund.ku.dk; Tel: +45 35336244

† Electronic supplementary information (ESI) available: <sup>1</sup>H NMR of compounds **3** and **4**. See DOI: 10.1039/c4ob01377h

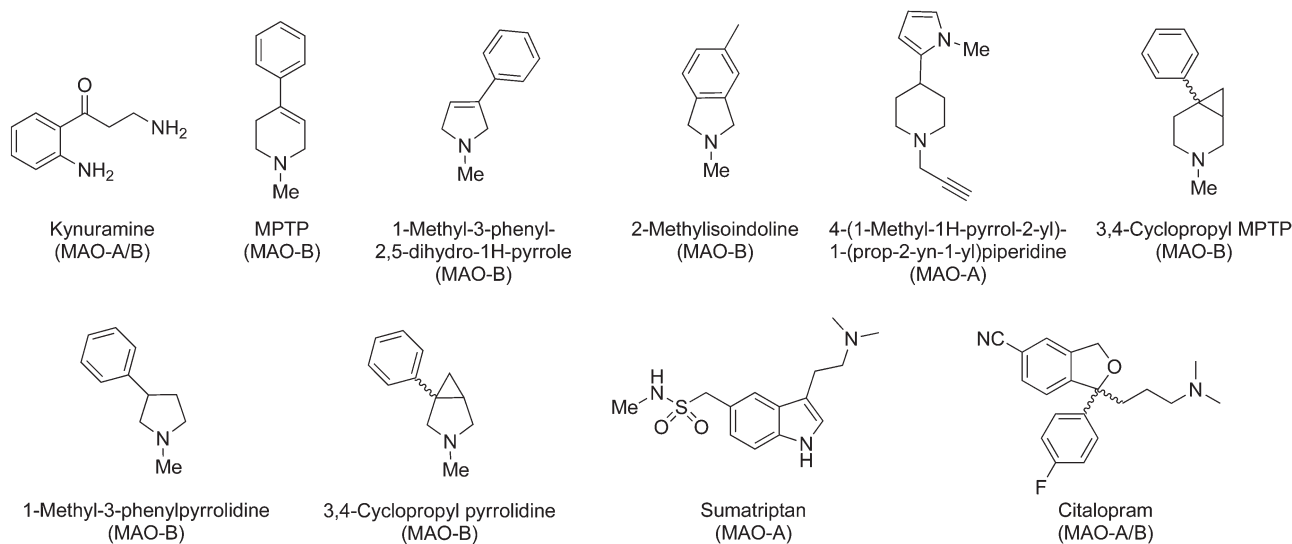


Fig. 1 Examples of MAO substrates include endogenous metabolites, synthetic compounds and drugs.

Fig. 1, phenethyl amine (PEA, **1**) is a simple arylalkyl amine which comprises the chemical features commonly found in MAO-A and MAO-B substrates. Therefore it attracted our attention to investigate the substrate specificity of two series of PEA analogs (*N*-alkyl analogs **2–5** and aryl halide analogs **6–9**, Fig. 2) at the MAO-A and MAO-B enzymes, and follow-up these results with an *in silico* study.

## Results and discussion

It has previously been shown that PEA (**1**, Fig. 2) is a preferred substrate for MAO-B over MAO-A.<sup>26</sup> We designed two distinct series of PEA (**1**) analogs to probe the substrate specificity of the MAO-A and -B enzymes: PEA analogs **2–5** (Fig. 2) are simple aliphatic *N*-alkyl analogs increasing the chain length

and bulkiness, while PEA analogs **6–9** (Fig. 2) were included in the study to explore the influence on substrate specificity of a aryl halide substituent.

### Synthesis of *N*-alkyl PEA (**1**) analogs

Whereas PEA (**1**), *N*-methyl analog **2**, *N,N*-dimethyl analog **5**, and aryl halide analogs **6–9** were purchased from commercial suppliers, the *N*-ethyl analog **3** and *N*-propyl analog **4** were synthesized, following a standard protocol of reductive amination of PEA (**1**) and the respective aldehyde, using NaBH<sub>3</sub>CN as the reducing agent (Scheme 1).<sup>27</sup> The desired secondary amines **3** and **4** were obtained in modest yields with the corresponding tertiary amines as the major side products (not shown).

### MAO-A and B substrate profiling

The four *N*-alkyl PEA analogs **2–5** were then investigated as potential substrates of both MAO-A and MAO-B. Kinetic constants for the MAO-catalyzed oxidation of substrates **2–9** with O<sub>2</sub> were estimated using a continuous fluorescence assay based on hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) co-product titration. Horseradish peroxidase was used to catalyse a non-rate-limiting coupled reaction between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex® Red) producing the fluorescent resorufin. This assay was previously used for the evaluation of MAO substrates or inhibitors.<sup>28</sup> PEA (**1**) and kynuramine were

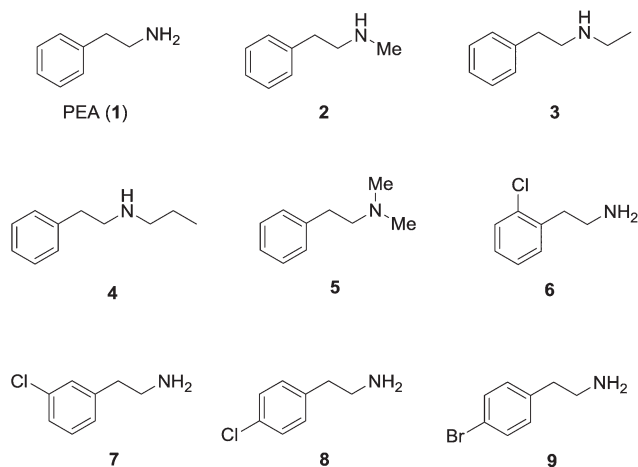
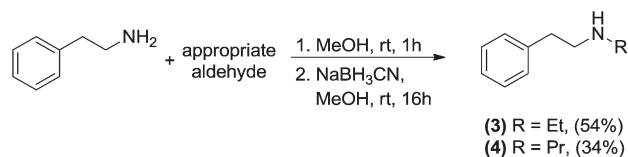
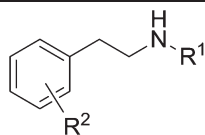


Fig. 2 Chemical structure of *N*-alkyl PEA (**1**) analogs **2–5** and aryl halide analogs **6–9**.



Scheme 1 Synthesis of *N*-alkyl analogs **3** and **4** via a one-pot reductive amination of PEA (**1**) with appropriate aldehydes.

**Table 1** MAO-A and -B substrate activities of kynuramine, PEA (**1**), *N*-alkyl analogs **2–5**, and aryl halide analogs **6–9**.  $K_m$  in [ $\mu\text{M}$ ],  $k_{\text{cat}}$  in [ $\text{min}^{-1}$ ] and  $k_{\text{cat}}/K_m$  in [ $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1} \times 1000$ ]**1-9**

Cmpd no.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	MAO-A			MAO-B		
			$K_m$	$k_{\text{cat}}$	$k_{\text{cat}}/K_m$	$K_m$	$k_{\text{cat}}$	$k_{\text{cat}}/K_m$
Kynuramine	—	—	378 ± 17.3	7.90 ± 0.22	20.9 ± 1.1	37.3 ± 1.4	1.36 ± 0.02	36.4 ± 1.5
PEA, <b>1</b>	H	H	4550 ± 549	9.63 ± 1.09	2.1 ± 0.4	7.0 ± 0.4	3.12 ± 0.10	444 ± 27.6
<b>2</b>	Me	H	402 ± 9.9	5.84 ± 0.10	14.5 ± 0.4	5.4 ± 0.4	2.25 ± 0.07	419 ± 32.2
<b>3</b>	Et	H	n.s.	n.s.	n.s.	343 ± 22.6	2.20 ± 0.10	6.4 ± 0.5
<b>4</b>	Pr	H	n.s.	n.s.	n.s.	515 ± 61.9	1.26 ± 0.12	2.4 ± 0.4
<b>5</b>	Me, Me	H	n.s.	n.s.	n.s.	112 ± 15.1	0.96 ± 0.03	8.5 ± 1.2
<b>6</b>	H	<i>o</i> -Cl	70.9 ± 2.5	16.8 ± 0.27	237 ± 9.0	2.9 ± 0.2	1.85 ± 0.07	638 ± 45.9
<b>7</b>	H	<i>m</i> -Cl	24.3 ± 1.4	5.21 ± 0.09	214 ± 13.1	3.2 ± 0.3	1.97 ± 0.14	623 ± 68.1
<b>8</b>	H	<i>p</i> -Cl	152 ± 8.1	1.87 ± 0.06	12.3 ± 0.8	2.4 ± 0.2	3.41 ± 0.12	1430 ± 117
<b>9</b>	H	<i>p</i> -Br	178 ± 14.0	1.46 ± 0.07	8.2 ± 0.7	2.3 ± 0.2	3.84 ± 0.15	1690 ± 147

n.s.: not substrate.

included as reference substrates, and results summarized in Table 1. As *N*-alkyl PEA analogues **2–5** release simple *N*-alkylamines upon MAO-catalyzed oxidation and hydrolysis, the MAO activity with *N*-methyl-, *N*-ethyl-, *N*-propyl- and *N,N*-dimethylamine was needed to be addressed. For both MAO-A and MAO-B isoforms, no activity was detected with any of these four *N*-alkyl amines.

In summary for MAO-A activity, the *N*-Me analog **2** displays a 10-fold increase in affinity ( $K_m$ ) compared to PEA (**1**). On the other hand, the turnover number ( $k_{\text{cat}}$ ) for **2** is roughly 50% lower. Elongation of the *N*-alkyl chain (*N*-ethyl analog **3** and *N*-propyl analog **4**) resulted in complete loss of MAO-A activity. Furthermore, the more bulky *N,N*-dimethyl analog **5** was not a substrate for the MAO-A enzyme. Exploration of an aryl halide substituent, analogs **6–9**, resulted in a 25–200-fold increase in affinity for MAO-A. The effect on  $k_{\text{cat}}$  spanned from a 2-fold increase (*o*-Cl, compound **6**), over a 2-fold decrease (*m*-Cl, compound **7**) to a 6-fold decrease (*p*-Cl and *p*-Br, compound **8** and **9**) (Table 1). Overall, compared to PEA, **6** and **7** were 100-fold better substrates for MAO-A, while **8** and **9** were only 4–6 fold better.

The activity profile observed for MAO-B with the substrate series **2–9** was highly different. The activity measured with the *N*-methyl analog **2** was comparable with that of **1** both with respect to  $K_m$  and  $k_{\text{cat}}$ . Extending the *N*-alkyl chain to an *N*-ethyl group, compound **3**, gave a significant (50-fold) drop in affinity ( $K_m$ ) for MAO-B. With a further extension to *N*-propyl, compound **4**, a 70-fold drop in  $K_m$  was observed in comparison with **1**. On the other hand, *N,N*-dimethyl analog **5** displayed only a 15-fold drop in affinity ( $K_m = 112 \mu\text{M}$ ) as compared with **1**. For all four analogs **2–5**, the turnover number, was determined to be within the same range ( $k_{\text{cat}} = 0.96\text{--}2.25 \text{ min}^{-1}$ ) – slightly lower than for **1**. The effect of an aryl chloride or bromide, analogs **6–9**, was manifested in a 2 to 3-fold increase

in affinity ( $K_m$ ), while the turnover number was roughly the same ( $k_{\text{cat}}$ ) in comparison to **1**. In summary, a chloride in either the *o*- or *m*-position gave little change in activity, whereas a halide in the *p*-position improved MAO-B activity by 4-fold.

The comparison of the activities of the two isoforms MAO-A and B towards this substrate series confirms that MAO-B shows a much stronger affinity for PEA, and analogs thereof, than MAO-A. A  $K_m$  ratio of 650 was obtained for PEA, whereas, the different analogues **2** and **6–9** showed a drop in selective affinity with  $K_m$  ratio ranging from 7.6 to 77. Conversely, higher  $k_{\text{cat}}$  values were measured with MAO-A for several compounds. *N*-Methyl analog **2**, *m*-chloro derivative **7** and PEA itself displayed a 2 to 3 fold higher value, whereas the *o*-chloro PEA derivative **6** showed a nine fold higher  $k_{\text{cat}}$  value for MAO-A compared to MAO-B. However, the  $k_{\text{cat}}$  values which are calculated from protein content independently for each enzyme should be compared with some carefulness, even though commercial MAO-A and MAO-B batches are reported to be of high purity and to display the same level of activity in the microsomal expression system. Besides, regarding the  $k_{\text{cat}}/K_m$  values, compounds **6** and **7** clearly appear as good substrates for both enzymes, much better than kynuramine which is commonly used as a non-selective substrate in MAO assays. In addition, the *p*-bromo derivative **9**, displays a high selectivity for MAO-B with  $k_{\text{cat}}/K_m$  200 times higher compared to MAO-A. Although this selectivity ratio is similar to that observed with PEA, compound **9** shows a 4 times higher activity and constitute therefore a new valuable substrate for MAO-B selective assays.

In regard to already published studies on the role of MAO-A and MAO-B enzymes in drug metabolism, the results of *N*-alkyl PEA analogs **2–5** are intriguing. It has been shown, that the anti-migraine drug Sumatriptan, which comprises an

*N,N*-dimethyl amine moiety, is metabolized primarily by MAO-A.<sup>24</sup> Furthermore, it has been shown that the antidepressant drug Citalopram, which also comprises an *N,N*-dimethyl amine moiety, is metabolized by both the MAO-A and MAO-B enzymes.<sup>2</sup>

**Modeling.** The MAO-B enzyme has previously been crystallized with covalently bound FAD (PDB code: 2VRL).<sup>29</sup> In the proximity of the covalently bound FAD molecule the *substrate binding pocket* has been identified and is of lipophilic nature (Fig. 3). In connection hereto, a second pocket has been defined and following named the *entrance pocket*. The *substrate* and *entrance* pockets are narrowed in at the site of their joining by the side chains of amino acid residues Leu171, Tyr326 and Ile199, although the latter is in its open form.<sup>29</sup>

Two distinct mechanisms have been suggested for the catalytic action of the MAO-A and MAO-B enzymes; a radical reaction and a polar nucleophilic mechanism.<sup>2</sup> While the latter is the most commonly accepted one, details on nitrogen protonation states are disputed.<sup>2</sup> Earlier it has been proposed that the substrate is at its free amine form when it is directed to the substrate pocket. However, based on the fact that  $\pi$ -cation

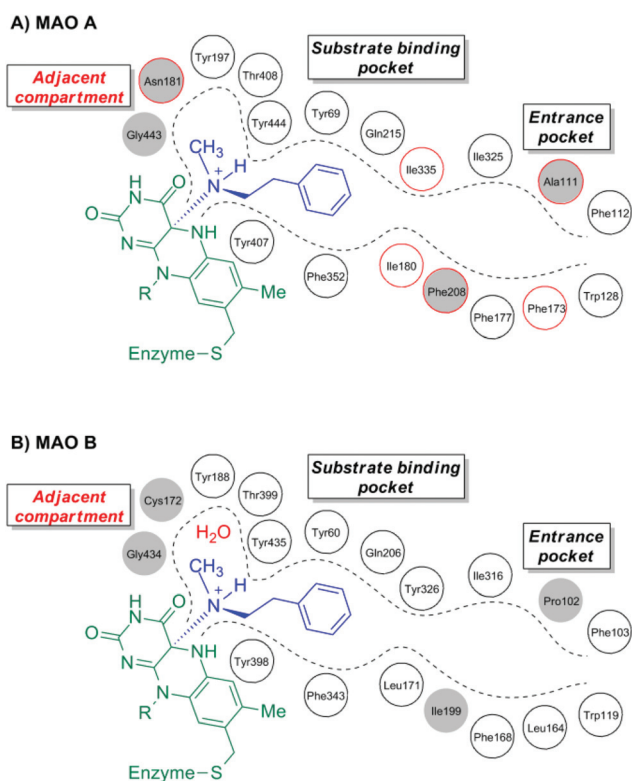
interactions are of stabilizing nature in contrast to repulsive  $\pi$ -electron-free-amine interactions, the amine substrates likely remain protonated at the stage of entrance and are directed to the substrate pocket by exchanging  $\pi$ -cation interactions with the aromatic residues in the entrance and substrate pockets. Approaching the FAD, the ammonium group protonates *N*(5) preceding its nucleophilic attack on C(4a) to form key intermediate A (Scheme 2). This covalently-bound FAD-substrate complex was selected as the starting point for a computational searching for binding mode of the active substrates reported herein.

While X-ray crystal structure determination of an enzyme-bound substrate is not possible due to its transient nature, the crystal structure of covalently-bound inhibitor, benzylhydrazine with MAO-B (PDB code: 2VRL), has been reported<sup>29</sup> and was selected as a suitable starting template for the modeling study. Firstly, structural changes were made to the FAD-ligand complex as to represent key intermediate A (Scheme 2) comprising the appropriate *N*-substituent. For analogs 2–4 both geometries of the positively charged nitrogen were built and modeled independently, while the symmetry of dimethyl analog 5 allowed for building of only one. Each structural complex was submitted to a LowModeMD simulation and the sample of conformers was examined. Overall, analogs 2–5 were well-accommodated by the MAO-B enzyme.

In details, the *in silico* study concluded that the *N*-alkyl moieties reach into an adjacent hydrophobic compartment defined by the side chains of amino acids Tyr188, Tyr435, Tyr398 and Thr399, and backbone carbonyl groups of Cys172 and Gly434 (Fig. 3B). It is noteworthy that a water molecule is located in this compartment and it engages in a hydrogen bonding interaction with the carbonyl group of Cys172. Thus, for *N*-alkyl group larger than methyl this water molecule must be displaced. Moreover, the *N*-phenethyl groups are well-fitted in the substrate binding pocket. For analogs 2–4 the major difference between their two protonated states is the orientation of the *N*-proton, which engages in  $\pi$ -cation interactions with residues Tyr398 or Tyr435. We propose that the protonated state, which forms  $\pi$ -cation interaction with Tyr435 (Fig. 3B and 4) is favorable due to the spatial orientation of the  $\alpha$ -hydrogen atom, as this is believed to undergo *N*(5)-base catalyzed elimination (Scheme 2, step c).

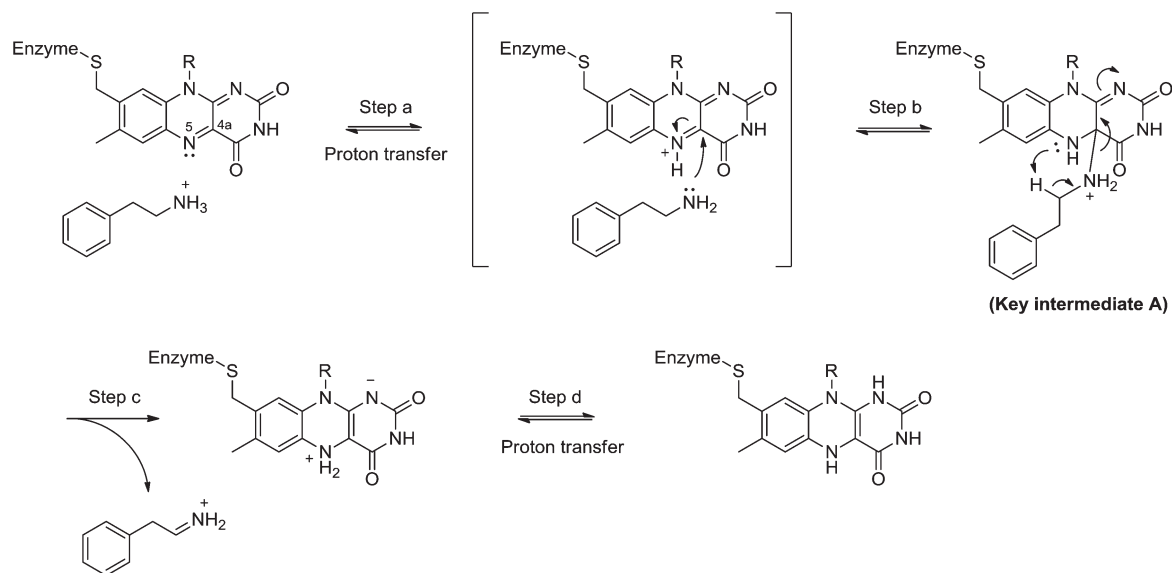
Positively charged quaternary amine 5 revealed similar binding modes as described above for analogs 2–4, but orienting one *N*-methyl group towards Tyr435 or Tyr398. The spatial orientation of the phenethyl moiety is similar but the conformation of the methyl groups suggests that the conformer in which the *N*-methyl group points towards Tyr435 is favored due to the *N*(5)-base catalyzed elimination of  $\alpha$ -hydrogen atom (Scheme 2, step c). The 20-fold loss in affinity (compound 2 vs. compound 5) could be due to a possible steric clash between the one *N*-methyl group of 5 and Tyr435.

To investigate the observed differences in binding affinity of 2–5 at MAO-A and MAO-B, the amino acid sequence of human MAO-A was aligned with the X-ray structure of MAO-B used in the *in silico* study (2VRL) (Fig. 3A). Only the Cys172

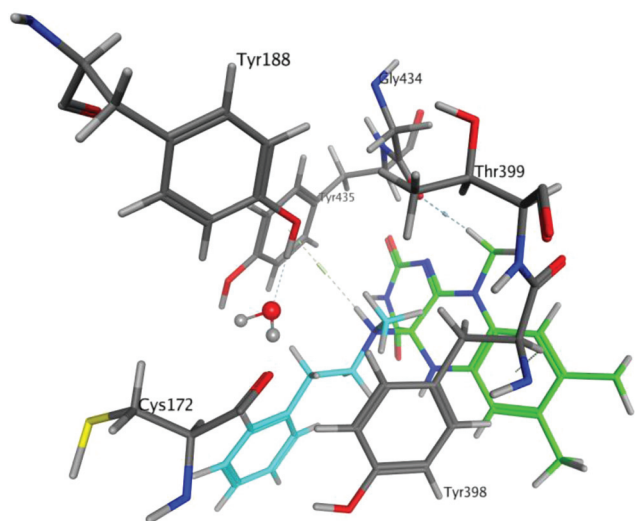


**Fig. 3** Amino acid residues forming the entrance pocket, the substrate binding pocket and the newly discovered adjacent compartment of the MAO-A/B enzymes. Filled circles designate residue backbone as pocket wall and unfilled circles designate residue side chain as pocket wall. Red circles designate residue of differentiation between MAO-A and MAO-B. (A) MAO-A amino acid residue alignment onto X-ray structure of MAO-B (2VRL). (B) X-Ray structure of MAO-B (2VRL) with covalently-bound FAD in green and covalently bound protonated substrate *N*-methyl-phenethylamine (2) in blue.





**Scheme 2** Suggested polar nucleophilic mechanism for MAO-B-catalyzed oxidation of amines.



**Fig. 4** Amino acids occluding the adjacent compartment in MAO-B. Covalently-bound FAD in green with covalently-bound protonated substrate *N*-methyl-phenethylamine (**2**) in blue. Key water molecule in type code.

residue of MAO-B is altered to an Asn181 in MAO-A. Indeed Asn181 comprises a more bulky side chain, but since it is the backbone carbonyl group which defines the adjacent compartment, the chemical nature of the side chain must have little direct involvement. However, the water molecule found in the X-ray of MAO-B is believed also to be present in MAO-A. Herein it could be more tightly bound due to the before described difference in amino acid residue. Displacement for larger *N*-alkyl groups than methyl would then be disfavored, rendering such *N*-alkyl analogs inactive as substrates for MAO-A.

The *ortho* and *meta* aryl positions direct substituents into conserved space between MAO-A and MAO-B (Fig. 3) and a

chloride increases affinity in both cases. However, both *para* aryl chloride and bromide are disfavored for MAO-A, but well-accepted for MAO-B. These difference are likely to be explained by the distinct amino acid residues defining the doorstep between the substrate pocket and the entrance pocket of MAO-A and MAO-B (Fig. 3, MAO-B → MAO-A: Leu171 → Ile180, Ile199 → Phe208 and Tyr326 → Ile335).

## Conclusion

In conclusion, the MAO-A and MAO-B substrate specificity profile was studied for two series of PEA (**1**) analogs: for the *N*-alkyl PEA series, analogs **2–5**, an *N*-methyl group, compound **2**, was tolerated by both isoforms. On increasing the alkyl chain length or bulkiness complete loss of enzymatic activity at MAO-A was observed while the affinity for MAO-B was lowered by 20–70 fold. The series comprising analogs with an aryl halide substituent, compounds **6–9**, showed that the position of substitution has a strong influence on isoform preference, with the *para* position favoring substrate specificity towards the MAO-B isoform. An *in silico* study suggested that the *N*-alkyl substituents occupy an adjacent compartment to the substrate pocket defined by amino acids Tyr188, Tyr435, Tyr398, Thr399, Cys172 and Gly434 (Fig. 3B and 4). This new insight is relevant to the understanding of MAO-B substrate specificity and will be of importance to future drug design within the field of monoamines.

## Experimental section

### Chemistry

Chemicals and reagents purchased from commercial suppliers were used without further purification. Solvents were of HPLC

quality and used as received. Evaporation *in vacuo* was performed on a rotary evaporator at approx. 40 °C (pressure: 20 mbar). TLC was performed using silica gel 60 F<sub>254</sub> aluminium sheets. The plates were visualized in under UV light (254 nm) followed by staining with KMnO<sub>4</sub> or 0.5% ninhydrin in EtOH. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (75 MHz) spectra were recorded on a Varian Mercury Plus and on a Varian Gemini 2000 instrument, respectively, using deuterated solvents as internal references. Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in ppm and coupling constants ( $J$ ) in Hertz. LC-MS was recorded on an Agilent 1200 series solvent delivery system equipped with an Agilent 6400 series triple quadrupole mass spectrometer (ESI) using a 10→90% MeCN gradient in H<sub>2</sub>O containing 0.05% HCOOH.

**N-Ethyl-2-phenethylamine (3).** Acetaldehyde (0.20 mL, 3.5 mmol, 1.00 equiv.) was added to a stirred solution of PEA (1) (1.34 mL, 1.29 g, 10.6 mmol, 3.03 equiv.) in dry MeOH (30 mL) at 0 °C under a N<sub>2</sub> atmosphere. The reaction mixture was stirred for 30 min at 0 °C and for 1.5 hours at rt. NaBH<sub>3</sub>CN (245 mg, 3.9 mmol, 1.11 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred at rt for 28 hours. After concentration *in vacuo*, the crude product was purified by flash chromatography using isocratic EtOAc–MeOH–Et<sub>3</sub>N (10 : 1 : 0.1). This afforded the titled compound (287 mg, 54%) as a colorless oil.  $R_f$  0.28 (EtOAc–MeOH–Et<sub>3</sub>N 10 : 1 : 0.1). <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.40 – 7.25 (m, 5H), 3.25 (t,  $J$  = 7 Hz, 2H), 3.05 (q,  $J$  = 7 Hz, 2H), 2.95 (t,  $J$  = 7 Hz, 2H), 1.18 (t,  $J$  = 7 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  140.5, 129.0, 128.8, 126.5, 51.5, 44.4, 36.9, 15.7. MS ( $m/z$ ) calcd for C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N [M + H]<sup>+</sup> 150.1, found: 150.2.

**N-Propyl-2-phenethylamine (4).**<sup>27</sup> Propionaldehyde (0.3 mL, 5.2 mmol, 1.00 equiv.) was added to a stirred solution of PEA (1) (2.0 mL, 1.92 g, 15.5 mmol, 2.98 equiv.) in dry MeOH (45 mL) at rt under a N<sub>2</sub> atmosphere. The reaction mixture was stirred for 1 hour at rt. NaBH<sub>3</sub>CN (357 mg, 5.7 mmol, 1.10 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred at rt for 5 hours. The reaction mixture was concentrated *in vacuo*. H<sub>2</sub>O (25 mL) was added and the solution was extracted with DCM (3 × 30 mL). The combined organic phases were washed with H<sub>2</sub>O (30 mL) and brine (30 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After concentration *in vacuo*, the crude product was purified by flash chromatography using isocratic EtOAc–MeOH–Et<sub>3</sub>N (10 : 1 : 0.1) and the product was further distilled under reduced pressure (b.p. 168 – 170 °C/250 mmHg) to afford the titled compound (232 mg, 34%) as a colorless oil.  $R_f$  0.14 (EtOAc–MeOH–Et<sub>3</sub>N 10 : 1 : 0.1). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.30 – 7.16 (m, 5H), 2.91 – 2.85 (m, 2H), 2.83 – 2.77 (m, 2H), 2.58 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 1.48 (sextet,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 0.89 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  140.2, 128.8, 128.5, 126.3, 51.9, 51.4, 36.6, 23.3, 11.9. MS ( $m/z$ ) calcd for C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N [M + H]<sup>+</sup> 164.1, found: 164.2.

#### MAO-A and B substrate assays

Human monoamine oxidase A and B (MAO-A and MAO-B) supersomes were purchased from BD Biosciences. Amplex red® was purchased from Invitrogen. Horseradish peroxidase (HRP)

was purchased from Sigma-Aldrich. The batches (0.5 mL, 2.5 mg) were thawed rapidly in a 37 °C water bath upon arrival, aliquoted and quickly refrozen to –80 °C until further use. Before use, MAOs were thawed and then diluted to obtain a 0.16 mg mL<sup>-1</sup> solution in 50 mM phosphate buffer pH = 7.4. A 2 mM solution of Amplex red was prepared in 50 mM phosphate buffer pH = 7.4, 10% v/v DMSO. A 4  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> solution of HRP was prepared in 50 mM phosphate buffer pH = 7.4. A mixed solution of 0.5 mM Amplex red®, 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> HRP in 50 mM phosphate buffer pH = 7.4, 2.5% v/v DMSO, was prepared just before use from the two previous solutions. 2 mM solutions of the various amino substrates were prepared in 50 mM phosphate buffer pH = 7.4, 4% v/v DMSO. 1  $\mu$ M to 2 mM amino substrates solutions were then prepared by dilution in the same buffer.

MAO activity fluorescence assays was automated on a monochromator-based fluorescence microplate reader (Safire™, Tecan) using 96-well fluorescence microplates, incubated at 37 °C in the dark. The reaction mixture was composed of 20  $\mu$ L of MAO solution, 80  $\mu$ L of the mixed solution containing HRP and Amplex red®, and 100  $\mu$ L of substrate solution. Enzymatic reactions were initiated with the substrate and monitored over 30 min by fluorimetry using excitation at  $\lambda$  = 563 ± 10 nm and detection at  $\lambda$  = 587 ± 10 nm.

For each substrate, kinetic parameters were determined using at least 7 different concentrations close to the estimated  $K_m$  value. Each experiment was reproduced three times using substrate mother solutions prepared independently. Maximal slope were measured within the first 15 min (RFU min<sup>-1</sup>) and converted to initial reaction velocities ( $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>), using a standard curve obtained with titrated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions under the same assay conditions. Kinetic parameters and standard errors were calculated from the Hanes–Wolf plot according to the least-squares method and Gauss's error propagation law.

#### Modeling

The comprehensive molecular modeling suite MOE (version 2011.10, Chemical Computing Group) running on a Windows 7 Professional 32 bit PC platform was used. The force field PFROSST was used with solvation set to *distance*. For each analog 2–5, PDB file 2VRL was imported and altered chemically to represent key intermediate A with the appropriate *N*-substituent. In cases where two protonation states were possible, both were built and considered independently. Each generated structural complex was first submitted to the LigX command to restrain atoms further away than 8 Å from the ligand (standard setup). Subsequently a conformational search by LowModeMD (a short molecular dynamics simulation using velocities with little kinetic energy on the high-frequency vibrational modes<sup>30</sup>) was carried out using standard setup with the following changes: RMS gradient = 0.1 and Energy window = 1000.

Alignment of human MAO-A amino acid sequence onto MAO-B (2VRL) was done by standard setup of alignment function in MOE (hMAO-A: 527).

## Abbreviations

FAD	Flavin adenine dinucleotide
MAO	Monoamine oxidase
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
PAA	2-Phenylacetaldehyde
PEA	Phenethylamine

## References

- J. Wouters, *Curr. Med. Chem.*, 1998, **5**, 137–162.
- D. E. Edmondson, A. Mattevi, C. Binda, M. Li and F. Hubálek, *Curr. Med. Chem.*, 2004, **11**, 1983–1993.
- A. W. Bach, N. C. Lan, D. L. Johnson, C. W. Abell, M. E. Bembenek, S. W. Kwan, P. H. Seeburg and J. C. Shih, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1988, **85**, 4934–4938.
- M. Da Prada, R. Kettler, H. H. Keller, A. M. Cesura, J. G. Richards, J. Saura Marti, D. Muggli-Maniglio, P. C. Wyss, E. Kyburz and R. Imhof, *J. Neural Transm., Suppl.*, 1990, **29**, 279–292.
- L. W. Elmer and J. M. Bertoni, *Expert Opin. Pharmacother.*, 2008, **9**, 2759–2772.
- A. Bolasco, S. Carradori and R. Fioravanti, *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2010, **20**, 909–939.
- M. Bortolato, K. Chen and J. C. Shih, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2008, **60**, 1527–1533.
- J. D. Amsterdam and J. Shults, *J. Affective Disord.*, 2005, **89**, 183–188.
- R. Amrein, W. Hetzel, M. Stabl and W. Schmid-Burgk, *Int. Clin. Psychopharmacol.*, 1993, **7**, 123–132.
- M. A. Jenike, O. S. Surman, N. H. Cassem, P. Zusky and W. H. Anderson, *J. Clin. Psychiatry*, 1983, **44**, 131–132.
- M. Cyr and M. K. Farrar, *Ann. Pharmacother.*, 2000, **34**, 366–376.
- A. M. Cesura and A. Pletscher, *Prog. Drug Res. Fortschr. Arzneimittelforsch. Prog. Rech. Pharm.*, 1992, **38**, 171–297.
- J. Knoll, *Neurobiology*, 2000, **8**, 179–199.
- H. Weissbach, T. E. Smith, J. W. Daly, B. Witkop and S. Udenfriend, *J. Biol. Chem.*, 1960, **235**, 1160–1163.
- R. Hardeland, D.-X. Tan and R. J. Reiter, *J. Pineal Res.*, 2009, **47**, 109–126.
- I. Mahmood, S. H. Neau and W. D. Mason, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1994, **12**, 895–899.
- J. Lee and A. Ziering, *J. Org. Chem.*, 1947, **12**, 885–893.
- M. O. Ogunrombi, S. F. Malan, G. Terre'Blanche, K. Castagnoli, N. Castagnoli, J. J. Bergh and J. P. Petzer, *Life Sci.*, 2007, **81**, 458–467.
- Y. X. Wang, S. Mabic and N. Castagnoli, *Bioorg. Med. Chem.*, 1998, **6**, 143–149.
- Y. Lee, K.-Q. Ling, X. Lu, R. B. Silverman, E. M. Shepard, D. M. Dooley and L. M. Sayre, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 12135–12143.
- P. Bissel, M. C. Bigley, K. Castagnoli and N. Castagnoli, *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, **10**, 3031–3041.
- J. M. Rimoldi, S. G. Puppali, E. Isin, P. Bissel, A. Khalil and N. Castagnoli, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 5808–5813.
- A. Pretorius, M. O. Ogunrombi, H. Fourie, G. Terre'blanche, N. Castagnoli, J. J. Bergh and J. P. Petzer, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 4111–4118.
- C. M. Dixon, G. R. Park and M. H. Tarbit, *Biochem. Pharmacol.*, 1994, **47**, 1253–1257.
- B. Rochat, M. Kosel, G. Boss, B. Testa, M. Gillet and P. Baumann, *Biochem. Pharmacol.*, 1998, **56**, 15–23.
- K. Orito, A. Horibata, T. Nakamura, H. Ushito, H. Nagasaki, M. Yuguchi, S. Yamashita and M. Tokuda, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 14342–14343.
- M. Zhou and N. Panchuk-Voloshina, *Anal. Biochem.*, 1997, **253**, 169–174.
- C. Binda, J. Wang, M. Li, F. Hubálek, A. Mattevi and D. E. Edmondson, *Biochemistry*, 2008, **47**, 5616–5625.
- F. Hubálek, C. Binda, A. Khalil, M. Li, A. Mattevi, N. Castagnoli and D. E. Edmondson, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 15761–15766.
- P. Labute, *J. Chem. Inf. Model.*, 2010, **50**, 792–800.





# Continuous colorimetric screening assays for the detection of specific L- or D- $\alpha$ -amino acid transaminases in enzyme libraries

Egon Heuson<sup>1,2</sup> · Jean-Louis Petit<sup>3,4,5</sup> · Adrien Debard<sup>3,4,5</sup> · Aurélie Job<sup>1,2</sup> · Franck Charmantray<sup>1,2</sup> · Véronique de Berardinis<sup>3,4,5</sup> · Thierry Gefflaut<sup>1,2</sup>

Received: 12 May 2015 / Revised: 25 August 2015 / Accepted: 4 September 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Abstract** In the course of a project devoted to the stereoselective synthesis of non-proteinogenic  $\alpha$ -amino acids using  $\alpha$ -transaminases ( $\alpha$ -TA), we report the design and optimization of generic high-throughput continuous assays for the screening of  $\alpha$ -TA libraries. These assays are based on the use of L- or D-cysteine sulfinic acid (CSA) as irreversible amino donor and subsequent sulfite titration by colorimetry. The assays' quality was assessed under screening conditions. Hit selection thresholds were accurately determined for every couple of substrates and a library of 232 putative transaminases expressed in *Escherichia coli* host cells was screened. The reported high throughput screening assays proved very sensitive allowing the detection with high confidence of activities as low as 10  $\mu$ U (i.e., 0.01 nmol substrate converted per min). The assays were also evidenced to be stereochemically discriminant since L-CSA and D-CSA allowed the exclusive detection of L-TA and D-TA,

respectively. These generic assays thus allow testing the stereoselective conversion of a wide range of  $\alpha$ -keto acids into  $\alpha$ -amino acids of interest. As a proof of principle, the use of 2-oxo-4-phenylbutyric acid as acceptor substrate led to the identification of 54 new  $\alpha$ -TA offering an access to valuable L- or D-homophenylalanine.

**Keywords** Aminotransferase · Transaminase · Cysteine sulfinic acid · High-throughput screening · Enzyme library · Colorimetric assay

## Introduction

Transaminases (TA) have proven useful for the synthesis of various non-canonical amino acids and chiral amines (Koszelewski et al. 2010; Hwang et al. 2005; Taylor et al. 1998). The TA family is highly diverse, comprising many ubiquitous L- $\alpha$ -transaminases (L- $\alpha$ -TA) that play a key role in most proteinogenic L- $\alpha$ -amino acids metabolism. Some microbial TA (D- $\alpha$ -TAs) are also active with amino acids of the D-series, and amine-TA (also called  $\omega$ -TA) accept as substrates, various amino compounds lacking the  $\alpha$ -carboxylic acid moiety. TA have been shown to belong to fold types I and IV within the pyridoxal-phosphate (PLP)-dependent enzyme family. Based on sequence homology, they have been divided in six subgroups in Pfam databases (Punta et al. 2012), four of which include most known TAs and correspond to five classes (I–II, III, IV, and V) (Hwang et al. 2005; Mehta et al. 1993). Although L- $\alpha$ -TA are distributed over these five classes, known D- $\alpha$ -TA belong exclusively to class IV. On the other hand, most amine-TA belong to class III, although some of them showing unusual stereoselectivity (*R*-amine-TA) have been recently found in class IV using a genome mining approach (Höhne et al. 2010). All the described TA are highly

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00253-015-6988-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Thierry Gefflaut  
thierry.gefflaut@univ-bpclermont.fr  
Véronique de Berardinis  
vberard@genoscope.cns.fr

<sup>1</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448, Clermont-Ferrand F 63000, France

<sup>2</sup> CNRS, UMR6296, ICCF, BP 80026, Aubière F-63177, France

<sup>3</sup> CEA, DSV, IG, Genoscope, 2 rue Gaston Crémieux, Evry 91057, France

<sup>4</sup> CNRS-UMR8030, 2 rue Gaston Crémieux, Evry 91057, France

<sup>5</sup> Université d'Evry Val d'Essonne, Boulevard François Mitterrand, Evry 91057, France

stereoselective and are usually characterized by relaxed substrate specificity, making them valuable catalysts to access a wide range of products. However, one major drawback of transamination reactions lies in their equilibrium constant, often close to unity, and resulting in limited yields and purification problems. To overcome these thermodynamic limitations, an equilibrium shift strategy is often needed. For example, in reports of amine-TA applications, the use of isopropylamine as amino donor afforded the equilibrium shift through an easy removal of acetone formed as the co-product (Matcham et al. 1999; Savile 2010; Park et al. 2013). Alternatively, equilibrium shift was commonly obtained through a chemical transformation of the co-product. Most often, transaminations were coupled with auxiliary, thermodynamically favored enzymatic reactions to reach high yields. In some particular cases, spontaneous transformations of the co-product proved efficient, including cyclizations of  $\gamma$ - or  $\delta$ -amino ketones formed from diamino or dicarbonyl compounds (Green et al. 2014; Simon et al. 2012; Lo et al. 2005; Li et al. 2002), or decomposition of  $\beta$ -keto acids resulting from the use of  $\beta$ -amino acids as donor substrates (Fadnavis et al. 2006; Kim et al. 2007). In this context, we notably developed the synthesis of a series of neuroactive glutamate (Glu) analogues with aspartate aminotransferase (AspAT) using L-cysteine sulfinic acid (L-CSA) as amino donor (Assaf et al. 2013; Gefflaut et al. 2012); this close analogue of aspartic acid (Asp) is converted upon transamination into an unstable  $\alpha$ -keto sulfinic acid which spontaneously releases sulfur dioxide. This chemical transformation not only affords the equilibrium shift but also offers a simple way to monitor the reaction through colorimetric  $\text{SO}_2$  titration that can be achieved with various reagents. Therefore, L-CSA was already used as amino donor for the development of human AspAT or other TA in vitro assays (Maupin 1992; Odstrchel and Leung 1994).

Herein, we report the design and validation of colorimetric and continuous high-throughput assays for the screening of D/L- $\alpha$ -TA libraries. These assays are based on the use of L- or D-CSA as irreversible amino donor and the specific colorimetric titration of sulfite ions produced from CSA upon enzymatic transamination reactions. As shown in Fig. 1, two complementary assays were developed to monitor the enzymatic transamination reaction, i.e., the conversion of  $\alpha$ -keto acids, used as acceptor substrates, into the corresponding  $\alpha$ -amino acids, in the presence of  $\alpha$ -TA as catalyst. In the chemically coupled assay, L- or D-CSA is used as unique amino donor substrate and leads upon transamination to the release of sulfur dioxide, itself converted into sulfite ions by hydration. Subsequently, the nucleophilic sulfites specifically reacts with Ellman's reagent (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB) to give a colored thiolate anion ( $\lambda=412$  nm,  $\varepsilon=14150$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (Ellman 1959; Humphrey et al. 1970). Noteworthy, the use of L- or D-CSA offers the opportunity to identify TA with complementary stereoselectivities opening

access to  $\alpha$ -amino acids of the L- or D-series from a wide range of keto acids tested as acceptor substrates. In the enzymatically coupled assay, Glu is used as primary amino donor and gives upon transamination ketoglutaric acid (KG), which is converted back to Glu using AspAT as an auxiliary enzyme and L-CSA as secondary amino donor. The first enzymatic transamination reaction can therefore be monitored by colorimetric sulfite titration in the presence of DTNB, as described above for the chemically coupled assay. Therefore, the chemically coupled assay allows the detection of TA catalyzing an irreversible transamination with CSA as donor, whereas the enzymatically coupled assay offers access to a broader TA variety since Glu is a preferred donor for most known  $\alpha$ -TA. These two new complementary assays were used for the screening of a large collection of putative TA and led to the identification of several new enzymes that would be efficient for the synthesis of L- or D-homophenylalanine.

## Material and methods

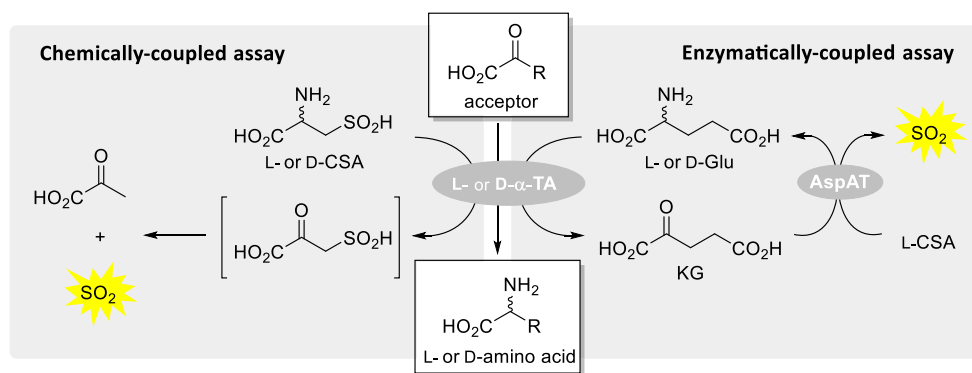
### Enzymes and reagents

*Escherichia coli* AspAT (EC: 2.6.1.1) and *E. coli* branched chain aminotransferase (BCAT, EC: 2.6.1.42) were produced and purified following described procedures from overexpressing *E. coli* strains TY103 transformed with pUC19-aspC (AspAT) (Kamitori et al. 1987) and pUC19-ilvE (BCAT) (Inoue et al. 1988), respectively. Lactate dehydrogenase from rabbit muscle (LDH, EC: 1.1.1.27) and glutamic dehydrogenase from bovine liver (GluDH, EC: 1.4.1.3) were purchased from Sigma-Aldrich. L- and D-CSA were prepared from L- and D-cystine, respectively, following a described procedure (Emilliozzi and Pichat 1959).  $\alpha$ -Ketoglutarate (KG), glutamate (Glu), L- and D-cystine, 4-methyl-2-oxopentanoic acid (MOPA), pyridoxal phosphate (PLP), nicotinamide adenine dinucleotide hydride form (NADH), 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 2-oxo-4-phenylbutanoic acid (OPBA), L- and D,L-homophenylalanine (HPhe), and all other chemicals were purchased from various commercial sources and used without further purification.

### Equipment and general methods

Enzyme assays were automated on a Tecan Freedom EVO™ robotic platform. The workstation included a multimode microplate reader (Safire™ II, Tecan) for UV/Vis absorbance measurement. All the experiments were performed in Greiner® 96-well plates incubated at 30±2 °C and stirred 90 s before measurement. All measurements were performed in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) in a total volume of 200  $\mu$ L. For kinetic assays, absorbance variations were recorded at 412 nm (DTNB) or 340 nm (NADH) over

**Fig. 1** Principle of chemically and enzymatically coupled screening assays



30 min and slopes were calculated from the linear part. Enzyme activities were calculated using  $\varepsilon = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  for the thiolate formed from DTNB and  $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  for NADH.

### Construct of the TA library

A set of 18 well experimentally described TA from class I to IV known to use aspartate or other  $\beta$ -amino acids as substrate was set up (see Table S1 in the supplementary material). These enzymes were used for protein-versus-protein alignments with the BL2 option (BLAST allowing gaps) and a BLOSUM62 scoring matrix against the UniProtKB database. Parameters of BLAST were adapted according to the number of proteins obtained for each class (preliminary study) in order to have an equilibrated repartition of each TA class in the library (see Table S2 in the supplementary material). This analysis allowed retaining 5867 proteins. To minimize the number of candidates, protein sequences were clustered (80 % of identity) as described previously (Vergne-Vaxelaire et al. 2013). A set of 463 proteins representative of these clusters and for which genomic DNA was available in the Genoscope strain collection were selected, and the corresponding genes were cloned in an expression vector. All steps were performed in 96-microwell plates. Primers were chosen by using the Primer3 program (Rozen and Skaletsky 2000). Oligonucleotides were obtained from Sigma-Genosys (St Quentin Fallavier, France). Specific extensions were added to the primers for cloning into the plasmid pET-22b(+) (Novagen, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) modified for ligation-independent cloning (Aslanidis and de Jong 1990). A set of 403 genes were cloned with success. Cell cultures, isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside induction for protein production, and cell extraction were performed as reported previously (Kreimeyer et al. 2006). Briefly, a cell culture (1.6 mL) into 96-microwell plate was induced for recombinant protein production in each well. After centrifugation, cells were suspended in 300  $\mu\text{L}$  potassium phosphate buffer (100 mM, pH 7.6) containing NaCl (50 mM), glycerol (10 %), Pefabloc SC (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) (1 mM),

and Lysonase bioprocessing reagent (0.2 mL; Merck) and then sonicated in an ultrasonic bath (Branson Ultrasonic Cleaner). For each 96-well plate, experiments were done five times and induced independently. After centrifugation, cell-free extracts were pooled by plates and the supernatants were analyzed by using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis to check for recombinant protein production. Then, the cell-free extracts were aliquoted in 96-well plates in order to ensure identity of samples along the experiments. A set of 232 proteins were overexpressed and found in a soluble form in cell-free extracts. Primers used for the cloning of the corresponding genes are reported in Table S3 in the supplementary material. Protein concentrations were determined by using the Bradford method with bovine serum albumin as standard (Bio-Rad). The samples were stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

### Dynamic range and limit of detection measurements

All the experiments were performed in triplicate. Limit of detection (LOD) of sulfite ions and L-CSA were determined independently (see Fig. S1 and S2 respectively in the supplementary material) using 1–100  $\mu\text{M}$  of analyte (L-CSA or NaHSO<sub>3</sub>), 2 mM KG, 0.05 mM PLP, 1 mM DTNB, 1 % EtOH, and 0.16 U AspAT. Reactions were initiated by analyte addition and optical density (OD) measured after reaction completion (10 min). OD values were plotted as a function of added analyte, and LOD were calculated from this graph using  $\text{LOD} = 3.3 \cdot Sb/m$ , where  $m$  and  $Sb$  are the slope and standard deviation of the ordinate intercept, respectively, which were calculated according the least squares method.

Dynamic range and LOD of AspAT were determined using 50 mM L-CSA, 2 mM KG, 0.05 mM PLP, 1 mM DTNB, 1 % EtOH, and 0.05–17 mU AspAT. Alternatively, AspAT dynamic range and LOD were determined for the LDH-NADH assay (see Fig. S3 in the supplementary material) using 50 mM L-CSA, 2 mM KG, 0.05 mM PLP, 0.85 mM NADH, 2 U LDH, and 0.2–40 mU AspAT. BCAT dynamic range and LOD were determined using 50 mM L-Glu, 2 mM MOPA, 6.25 mM L-CSA, 0.05 mM PLP, 1 mM DTNB, 1 % EtOH, 2 U AspAT, and 0.1–16 mU BCAT. Alternatively, BCAT dynamic range

and LOD were determined for the GluDH-NADH assay (see Fig. S4 in the supplementary material) using 50 mM L-Glu, 2 mM MOPA, 0.05 mM PLP, 0.85 mM NADH, 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 U GluDH, and 0.1–40 mU BCAT. Linear absorbance variations were recorded, and slopes were plotted as a function of added AspAT or BCAT. LOD of both enzymes was calculated as described above for L-CSA.

### Steady-state kinetics

All kinetic assays were performed in triplicate. Using the chemically coupled assay, solutions contained 0.05 mM PLP, 1 mM DTNB, 1 % EtOH, 0.025–1.6 mM KG, 0.5–32 mM L-CSA, and 2 mU AspAT. Using the enzymatically coupled assay, solutions contained 0.05 mM PLP, 1 mM, DTNB, 1 % EtOH, 0.2–2 mM MOPA, 6.25 mM L-CSA, 50 mM L-Glu, 0.2 U AspAT, and 2 mU BCAT. Using the LDH-NADH assay, solutions contained 0.05 mM PLP, 0.2–2 mM KG, 0.5–32 mM L-CSA, 0.85 mM NADH, 4 mU AspAT, and 1 U LDH. Using the GluDH-NADH assay, solutions contained 0.05 mM PLP, 0.2–2 mM MOPA, 50 mM L-Glu, 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1 U GluDH, 2 mU BCAT. Kinetic parameters and standard errors were calculated from the Hanes-Woolf plot according to the least-squares method and Gauss's error propagation law (see Figs. S5, S6, S7, S8, and S9 in the supplementary material).

### BCAT calibration curve in screening conditions

Solutions contained 0.05 mM PLP, 1 mM, DTNB, 1 % EtOH, 2 mM MOPA, 20 mM L-CSA, 20 mM L-Glu, 0.02 U AspAT, and 0.25–37 mU BCAT. Linear absorbance variations were recorded and activities calculated using the Beer-Lambert law. Measured activities were plotted as a function of activities measured in the conditions used for BCAT dynamic range and LOD calculations with the enzymatically coupled assay.

### Assay quality and statistical parameters

Cell lysates obtained from independent cultures of *E. coli* cells harboring an expression vector that did not contain any TA gene were used as negative controls ( $n=32$ ) to calculate means ( $\mu_c$ ) and standard deviation ( $\sigma_c$ ) for each substrate couple. Lysates from independent cultures ( $n=32$ ) of *E. coli* cells overexpressing AspAT were used as positive control with KG and L-CSA as substrates. The hit threshold (HT) values were defined as  $\mu_c+3\sigma_c$ , except when the relative standard deviation (RSD) of the negative control was found lower than 25 %. In such case, this latter variability was considered to prevent false positives and HT was fixed at  $1.75\mu_c$  (overestimating  $\sigma_c=0.25\mu_c$ ). For each enzyme of the collection, the activity measured with the donor (L- or D-CSA, L-

Glu) in the absence of acceptor ( $A_0$ ) was also considered as supplementary negative control to exclude enzymes able to catalyze the production of  $\text{SO}_2$  from CSA in the absence of acceptor. A complementary threshold was fixed at  $4A_0$ , considering a RSD of 25 % for enzyme expression levels and the worst case where  $A_0=\mu_0-3\sigma_0$ , with  $\mu_0$  and  $\sigma_0$  being the mean activity and standard deviation that would be measured without acceptor. Enzymes showing activities  $\leq 4A_0$  were discarded.

### Screening of the TA library

The chemically coupled assay was implemented using 20 mM L- or D-CSA, 2 mM keto acid (KG or OPBA), 0.05 mM PLP, 1 mM DTNB, 1 % EtOH, and 2  $\mu\text{L}$  of cell lysate from the TA library. The enzymatically coupled assay was implemented using 20 mM L-glutamate, 20 mM L-CSA, 2 mM KG or OPBA, 0.05 mM PLP, 1 mM DTNB, 1 % EtOH, 20 mU AspAT, and 2  $\mu\text{L}$  of cell lysate from the TA library. Lysates from 32 independent cultures of *E. coli* cells bearing an empty plasmid were used in the same conditions as negative control for all assays. Moreover, lysates from 32 independent cultures of *E. coli* cells overexpressing AspAT were used as positive control for the chemically coupled assay with KG as acceptor and applying various lysate dilutions (80- to 320-fold). Another control experiment was performed for both chemically and enzymatically coupled assays and each enzyme of the library in the same conditions but without any keto acid. *E. coli* cell lysates without overexpressed enzyme (negative control) were also used in NADH-based assays. The LDH-NADH assay was implemented using 20 mM L-CSA, 2 mM keto acid, 0.05 mM PLP, 0.85 mM NADH, 1.6 U LDH, and 2  $\mu\text{L}$  lysate. The GluDH-NADH assay was implemented using 20 mM L-Glu, 2 mM keto acid, 0.05 mM PLP, 0.85 mM NADH, 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 mU GluDH, and 2  $\mu\text{L}$  lysate.

### Analysis of HPhE formation

The HPhE syntheses were carried out using four hits. For two of them (entries 2 and 18, Table 2), the enzymatically coupled assay screening conditions were used. For two others (entries 20 and 35, Table 2), the chemically coupled assay screening conditions were used with either D- or L-CSA. Reactions were performed in 2 mL volume, and lysates volumes were adjusted to 10 mU/mL. Five hundred-microliter aliquots were regularly taken out of the reaction mixture, heated at 70 °C for 10 min, and centrifuged at 14,000 $\times$ g for 5 min. Twenty microliters of the supernatant was analyzed by HPLC using a C18 upisphere ODB column (4.6 $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), at 40 °C, with a acetonitrile/water (0.1 % TFA) gradient, from 10 to 90 % in acetonitrile over 14 min. Detection was performed at  $\lambda=220$  nm. Under these conditions, HPhE standard



retention time was found at 7.18 min. HPhe concentration was determined using a 0–2-mM HPhe calibration curve (see Fig. S10 in the supplementary material).

### CSA desulfination reaction study by NMR

To a 2.5 mL reaction mixture containing 10 mM L- or D-CSA and 0.05 mM PLP was added 0.3 U (as determined with the chemically coupled assay in the absence of acceptor) of dialysed TA (E6LHY8, entry 20, Table 2). The reaction mixtures were incubated at 30 °C and 450  $\mu$ L aliquots were regularly taken out of the reaction mixture, heated at 70 °C for 10 min, and centrifuged at 14,000 $\times$ g for 5 min. Fifty microliters of 10 mM TSPD<sub>4</sub> solution in D<sub>2</sub>O was added as internal standard. The resulting mixtures were analyzed by <sup>1</sup>H NMR (see Figs. S12, S13, S14, and S15 in the supplementary material).

## Results

### Assay performances and validation

All reaction assays were performed in 96-well microplate in a total volume of 200  $\mu$ L. For the chemically coupled assay, we chose *E. coli* AspAT as a model enzyme and the transamination between KG and L-CSA as a model reaction. This assay was first used for L-CSA titration by measuring the increase in optical density at 412 nm following the transamination reaction. A perfect linearity was observed for concentrations from 1 to 100  $\mu$ M L-CSA with a calculated molar extinction coefficient ( $\epsilon$ ) of 12,525 $\pm$ 136 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> and a limit of detection (LOD) of 2.8  $\mu$ M (0.56 nmol). These values were very close to those measured in the direct titration of sulfite ions with DTNB ( $\epsilon$ =13,322 $\pm$ 136 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> and LOD of 1.7  $\mu$ M). This indicates a quantitative conversion of L-CSA into sulfite upon transamination along with an efficient sulfite titration with DTNB in the presence of transaminase. Moreover, no reaction was observed between L-CSA (50 mM) and DTNB (1 mM) as evidenced by a deviation of less than 0.001 AU min<sup>-1</sup> at 412 nm.

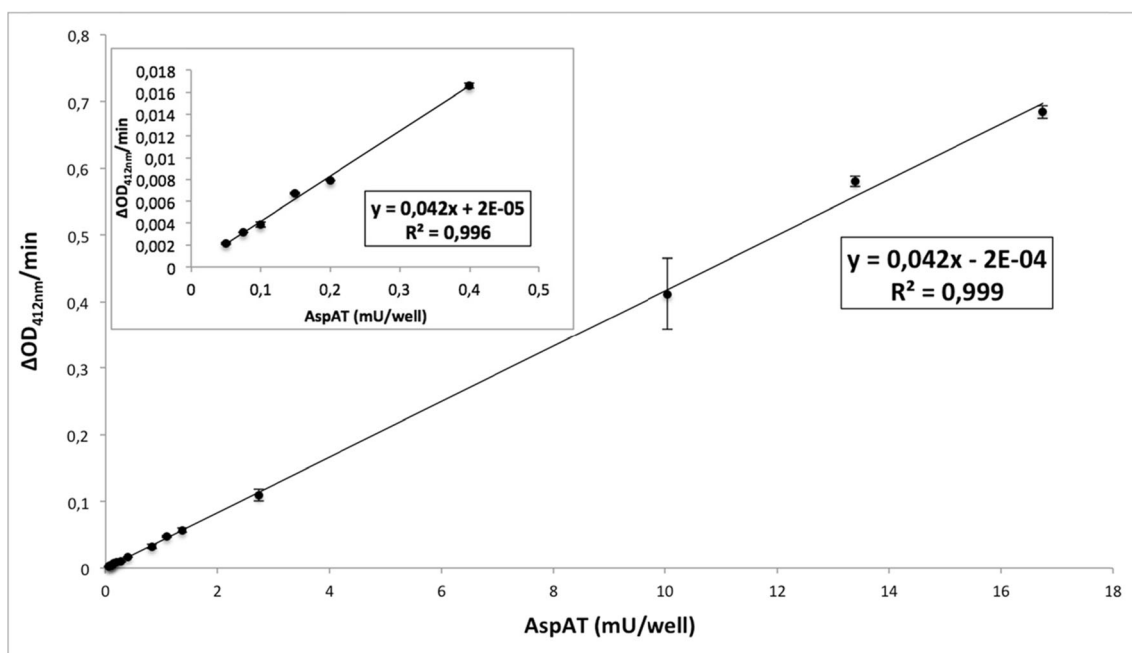
Then, in order to determine the dynamic range of measurable enzyme activities, various concentrations of purified *E. coli* AspAT were used with L-CSA and KG as substrates. Overall, desulfination of the keto sulfinate intermediate, then hydration and sulfite reaction with DTNB proved fast enough reactions to be non-limiting and allow TA activity measurement under steady state conditions. Indeed, as shown in Fig. 2, a perfect linearity was observed over a broad enzyme concentration range. The LOD of AspAT was found at 0.01 mU/well (i.e., 0.01 nmol of substrate converted per minute and per well). The maximum measurable activity was found at 16 mU/well. This latter value corresponds to the absorbance saturation attained in the minimum time needed to measure a reliable activity under the experimental conditions used. To evaluate the performances

of our screening test, it was then compared with an NADH-based assay involving the titration of pyruvate formed from L-CSA. As shown in Fig. 3, lactate dehydrogenase (LDH) was used as an auxiliary enzyme and NADH concentration decrease was monitored at 340 nm. Higher activities could be measured at absorbance saturation due to the lower value of  $\epsilon_{\text{NADH}}$  (6220 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> vs 14150 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> for the thiolate formed from DTNB). However, we failed to quantify accurately lowest activities using this latter assay. Both higher LOD and narrower dynamic range (0.14 to 36 mU/well) were thus obtained with the LDH-NADH assay (see Fig. S3). Finally, the chemically coupled assay was assessed for kinetic parameters measurements (see Table 1).  $K_m$  values of 1.0 $\pm$ 0.1 mM and 10.2 $\pm$ 0.4 mM were measured for KG and L-CSA, respectively, with  $k_{\text{cat}}$ =13,700 $\pm$ 700 min<sup>-1</sup>. The same parameters were also determined using the LDH-NADH assay. Close values were obtained ( $K_{m_{\text{KG}}}$ =0.6 $\pm$ 0.1 mM,  $K_{m_{\text{CSA}}}$ =6.5 $\pm$ 1.5 mM,  $k_{\text{cat}}$ =11,400 $\pm$ 200 min<sup>-1</sup>) thus demonstrating that AspAT activity is only slightly affected by DTNB and that this new chemically coupled assay is therefore a convenient and reliable method for AspAT substrate studies.

In order to develop the enzymatically coupled assay, branched chain aminotransferase (BCAT) from *E. coli* was taken as model enzyme. Indeed, BCAT shows negligible activity when L-CSA (or Asp) is used as amino donor. The transamination between L-Glu and 4-methyl-2-oxopentanoic acid (MOPA) was chosen as model reaction. To note, MOPA and L-Glu are preferred natural substrates of BCAT, whereas no reaction was observed between these two compounds in the presence of AspAT. A perfect linearity was obtained from 0.05 to 16 mU/well (see Fig. 4). The enzymatically coupled assay was also implemented for kinetic parameters measurement. Using various concentrations of MOPA at fixed 50 mM Glu,  $K_m^{\text{APP}}_{\text{MOPA}}$ =0.33 $\pm$ 0.02 mM, and  $k_{\text{cat}}$ =268 $\pm$ 5 min<sup>-1</sup> were measured. Another standard assay for BCAT substrate studies was also used for comparison: it is based on the reductive amination of KG catalyzed by glutamate dehydrogenase (GluDH) in the presence of ammonium ions and NADH (Fig. 3) (Kagamiyama and Hayashi 2000). A dynamic range from 0.08 to 36 mU was determined for this GluDH-NADH assay (see Fig. S4), whereas close kinetic parameters were measured (see Table 1), thus demonstrating the validity of the new enzymatically coupled assay for TA-substrate studies. To perform the screening of the TA library, the auxiliary enzyme (AspAT) concentration was fixed at 20 mU/well. As shown in Fig. 5, under these conditions, the measured and theoretical BCAT activities were found identical up to 1 mU/well.

### Screening implementations and results

The optimized assay conditions were used to develop a high throughput screening (HTS) assay aiming to detect D- or L- $\alpha$ -TA activity directly on cell-free extracts obtained from a library



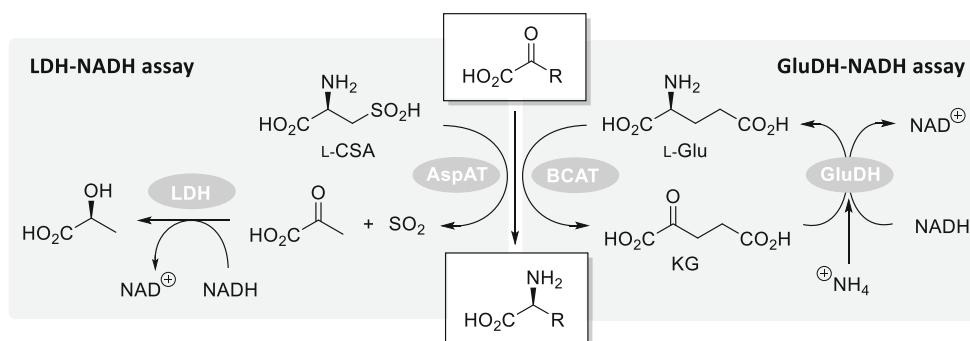
**Fig. 2** AspAT calibration curve with chemically coupled assay, *inset* for low activities

of 232 well overexpressed putative  $\alpha$ -TA from biodiversity (see “**Material and methods**” section for the library construction). Several screenings were performed by varying both the amino donor (D- or L-CSA in the chemically coupled assay, L-Glu for the enzymatically coupled assay) and the  $\alpha$ -keto acid used as acceptor. KG was first used as a standard acceptor in the chemically coupled assay with L- or D-CSA in order to highlight CSA-accepting enzymes present in the library. Moreover, 2-oxo-4-phenylbutyric acid (OPBA) was chosen as example to assess both chemically and enzymatically coupled assay performances for new valuable TA identification.

For each couple of substrates, we needed to accurately determine a hit threshold (HT), i.e., a lower limit for reliable enzyme activity detection in only one trial. For that purpose, a statistical approach was used, taking into account the data variability of both negative and positive controls. All the statistical parameters are reported in Table 2 (see “**material and methods**” section for detailed calculation). Low levels of noise ranging from 0.006 to 0.104 nmol min<sup>-1</sup>/well were measured

for all substrates except for KG-L-CSA couple. In this latter case, high background and variability ( $2.122 \pm 1.57$  nmol min<sup>-1</sup>/well) were observed and were attributed to the natural expression level of endogenous *E. coli* AspAT in host cells. Using *E. coli* cells overexpressing AspAT as positive control, a 125-fold increase in activity was observed, together with a lower variability compared to the negative control. A relative standard deviation (RSD) of 25 % was calculated for this positive control. It was found independent from the level of measured activity (at various lysate dilutions) and may reflect differences in both cell densities and enzyme expression levels. We assumed that this relative standard deviation may be at the same order of magnitude for any single overexpressed enzyme from the TA library and any couple of substrates. As shown in Table 2, low HT values (<0.2 nmol min<sup>-1</sup>/well) were calculated for all substrates except for KG-L-CSA couple (6.83 nmol min<sup>-1</sup>/well) for which high noise level and variability were observed as mentioned above. Aside from this latter case, these low HT values offered a broad dynamic range for

**Fig. 3** Principle of NADH-based assays



**Table 1** Parameters comparison for the different assays

Reactions and assays	TA LOD (mU <sup>a</sup> /well)	Acceptor <i>K<sub>m</sub></i> (mM)	Donor <i>K<sub>m</sub></i> (mM)	<i>k<sub>cat</sub></i> (min <sup>-1</sup> )
$\text{KG}_{\text{acceptor}} + \text{L-CSA}_{\text{donor}} \xrightarrow{\text{AspAT}} \text{L-Glu} + \text{Pyr} + \text{SO}_2$				
Chemically coupled assay with DTNB	0.01	1.0±0.1	10.2±0.4	13,700±700
LDH-NADH assay	0.14	0.6±0.1	6.5±1.5	11,400±200
$\text{MOPA}_{\text{acceptor}} + \text{L-Glu}_{\text{donor}} \xrightarrow{\text{BCAT}} \text{L-Leu} + \text{KG}$				
Enzymatically coupled assay with DTNB	0.05	0.33±0.02	nd	268±5
GluDH-NADH assay	0.08	0.14±0.01	nd	365±11

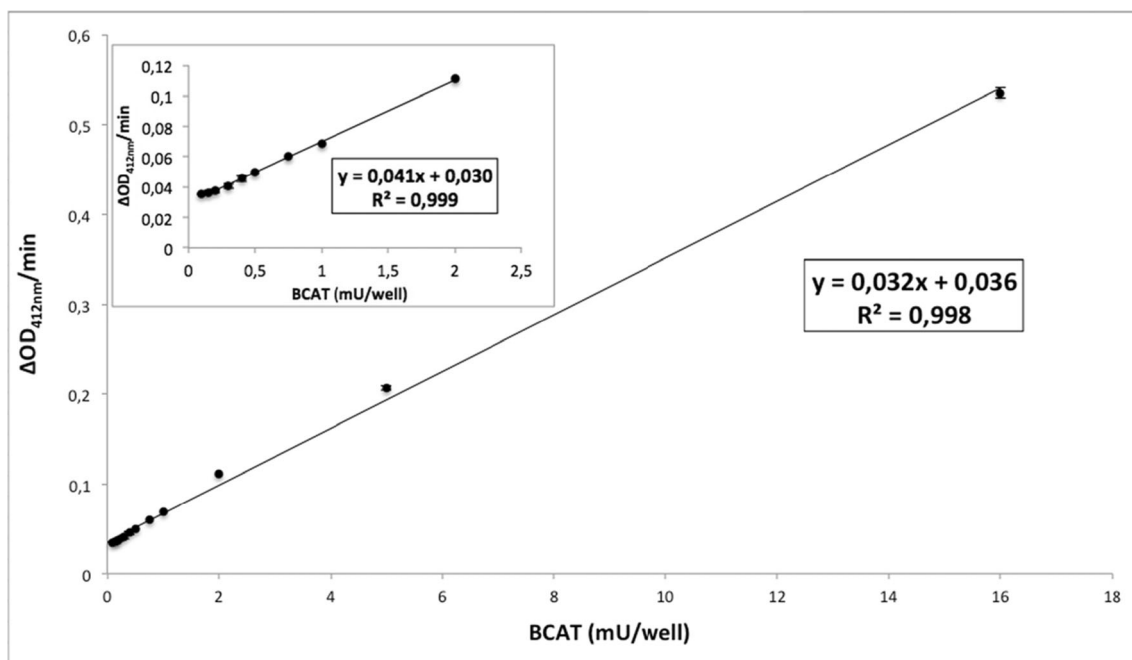
nd not detected

<sup>a</sup> One mU of TA (AspAT or BCAT) correspond to 1 nmol of substrate converted per min

activity measurements. For comparison, HT values were also calculated using the same approach for NADH-based assays. In order to compare with our chemically coupled assay, L-CSA and OPBA were used as substrates and LDH as auxiliary enzyme to catalyze the reduction of pyruvic acid by NADH. A tenfold higher HT value (0.228 vs 0.022 nmol min<sup>-1</sup>/well) was determined resulting from higher values of both control mean and standard deviation ( $\mu_c=0.104$ ,  $\sigma_c=0.040$  nmol min<sup>-1</sup>/well). For comparison with the enzymatically coupled assay, Glu and OPBA were used as substrates and GluDH was used as auxiliary enzyme to catalyze the reductive amination of KG in the presence of NADH and ammonium ions. A close HT value was obtained in that case (0.204 vs 0.182 nmol min<sup>-1</sup>/well), thus confirming the high sensitivity of our new enzymatically coupled assay using AspAT and DTNB.

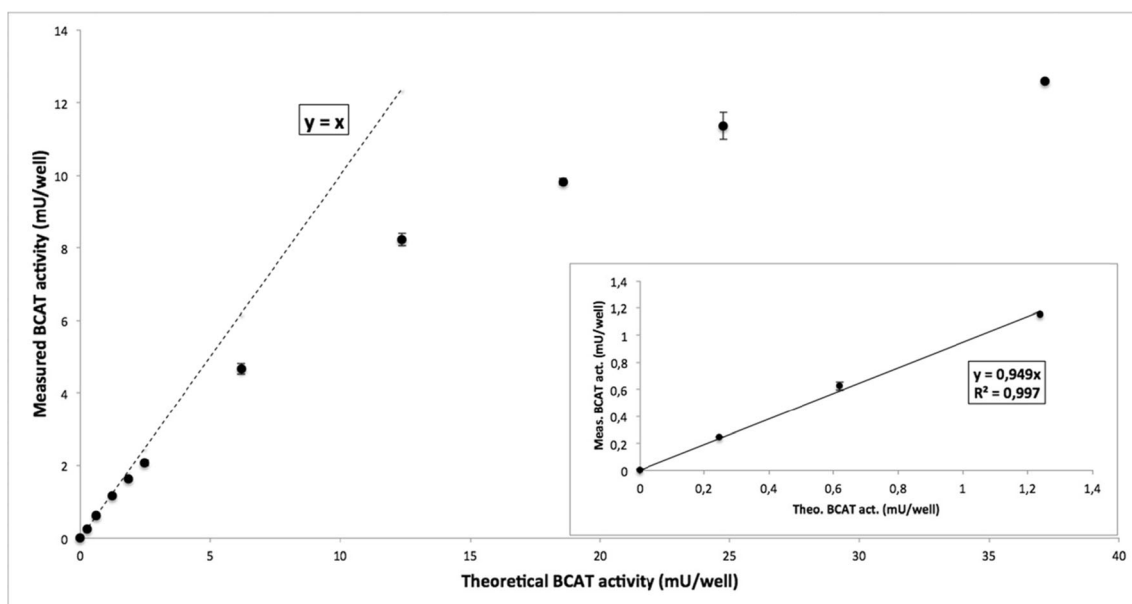
The best hits identified for each substrate couple are listed in Table 2 and classified according annotations found in UniprotKB databases and which are based on sequence homology with known enzymes. For every hit, the activity measured with the donor (L- or D-CSA, L-Glu) in the absence of acceptor is also included.

To confirm the screening results, transamination reactions between OPBA and various donors were performed with the best hits (entries 2, 18, 20, and 35) under screening conditions. D- or L-HPhe formation was evidenced by HPLC analysis using a commercial standard (*R<sub>t</sub>*=7.18 min). Using a normalized TA activity (10 mU/mL, based on the screening results), we observed after 4 h the formation of similar quantities of HPhe (1.6–2 mM) (see Fig. S11 in the supplementary material).



**Fig. 4** BCAT calibration curve with enzymatically coupled assay, inset for low activities





**Fig. 5** BCAT calibration curve in the screening conditions, *inset* for low activities

The production of  $\text{SO}_2$  observed in the absence of acceptor with several enzymes annotated in the D-series (entries 19–23, 27) led us to perform complementary experiments to confirm a CSA desulfination reaction. A cell lysate containing the best hit of the D-TA series (E6LHY8, entry 20) was submitted to dialysis to remove possible keto acid acceptors and L- or D-CSA enzymatic transformation was investigated using *in situ*  $^1\text{H}$  NMR analysis (see Fig. S12 and S13 in the supplementary material). We observed a decrease in CSA concentration over time together with the formation of Ala as the unique organic product. This reaction was >100 times faster with D-CSA compared to the L-enantiomer (see Fig. S14 and S15 in the supplementary material).

## Discussion

The identification of novel  $\alpha$ -TA requires the development of high-throughput screening assays which ideally allow the determination of TA activity with high sensitivity, reproducibility, and reliability. Over the last years, several continuous coupled enzyme assays have been reported. They are usually based on the detection of one of the reaction products, here either an  $\alpha$ -amino or keto acid. A selective NAD(P)H-dependent dehydrogenase was often used as an auxiliary enzyme that enabled the continuous monitoring of the reaction progress via direct or indirect NAD(P)H titration (Walton and Chica 2013; Yu et al. 2012; Truppo and Turner 2010; Cooper et al. 2002). In assays where NAD(P)H consumption was monitored, some limitations in sensitivity occurred when working with cell lysates. Background noise might result from the presence of endogenous NAD(P)H, other near-UV absorbing compounds, and/or NAD(P)H oxidases. Although

NAD(P)H formation from  $\text{NAD(P)}^+$  is thermodynamically unfavorable, efficient assays based on product oxidation as auxiliary reaction were also reported. Equilibrium shift was commonly achieved by  $\text{NAD(P)}^+$  recycling through the reduction of a tetrazolium dye (Bommer and Ward 2013; Sawai et al. 2007; Rej 1982). Alternatively, D- or L-amino acid oxidases have also been used to selectively measure amino acid products through hydrogen peroxide formation (Barber et al. 2014; Juncosa et al. 2013; Weinhandl et al. 2012; Hopwood et al. 2011; Passera et al. 2011). Following this approach, the addition of a peroxidase is mandatory to catalyze the oxidation of a molecular probe into a colored or fluorescent derivative. The assays reported herein constitute new continuous and colorimetric screening methods to detect the stereoselective conversion of  $\alpha$ -keto acids into  $\alpha$ -amino acids. These assays proved very efficient to measure TA activities in cell-free extracts with high sensitivity and broad dynamic range, as confirmed in several cases by HPLC analysis of product formation.

L- or D-CSA is used as amino donor in the chemically coupled assay. As a close structural analogue of Asp, it has been shown to be a substrate for AspAT as good as Asp (Jenkins and D'Ari 1966). Thus, it can be predicted to be a substrate for several other TA able to use Asp as donor. However, many valuable TA devoid of activity for CSA (or Asp), but that would display significant activity towards the tested keto acid, cannot be identified using the chemically coupled assay. This issue was addressed by developing an alternative assay in which Glu is used as primary amino donor. Indeed, Glu is a preferred substrate for most known  $\alpha$ -TA. Therefore, the enzymatically coupled assay can be used for a broad variety of TA accepting Glu as donor and any keto acid as acceptor, provided that the auxiliary enzyme (AspAT)

**Table 2** Screening results ( $\mu_c$ ,  $\sigma_c$ , HT, and activities of best hits in nmol SO<sub>2</sub> produced/min/well)

Primary donor substrate		L-CSA	L-CSA	L-CSA	D-CSA	D-CSA	D-CSA	L-Glu	L-Glu
Secondary donor substrate		-	-	-	-	-	-	L-CSA	L-CSA
Acceptor substrate		-	KG	OPBA	-	KG	OPBA	-	OPBA
<b>Control mean</b>	$\mu_c$	0.010	2.122	0.010	0.012	0.022	0.006	0.012	0.104
<b>Control standard deviation</b>	$\sigma_c$	0.004	1.570	0.004	0.004	0.008	0.002	0.005	0.008
<b>Hit threshold</b>	HT	-	6.838	0.022	-	0.046	0.013	-	0.182
<b>Total hit number</b>			19	17		12	5		41
Entry	Gene name	Class Annotation (Enzyme name <sup>b</sup> )							
1	B5Y814	I						0.03	1.16
2	G0VQA2	I / II						0.02	4.34
3	D0MDH0	I / II	0.01	16					
4	F6DMA0	I / II	0.00	16					
5	R4KP82	I (AspAT)	0.01	16					
6	Q5N1R5	I (AspAT)	0.01	16					
7	Q3SIK6	I (AspAT)	0.01	16					
8	E1QL79	I / II	0.01	16					
9	Q5L8P6	I (AspAT)	0.01	16					
10	C6Y061	I / II	0.02	16					
11	G8R8R4	I / II	0.01	16					
12	A5FJ40	I	0.00	16	0.07				
13	G2PL57	I (AspAT)	0.01	16	0.13				
14	C1CW38	I (AspAT)	0.02	16					
15	Q9RRM7	II (HisPAT)						0.01	1.45
16	C1CZ11	II (HisPAT)	0.00		0.11			0.01	1.31
17	Q1J263	II (HisPAT)	0.01		0.13			0.02	1.57
18	E1VWL8	II (PheAT)	0.01		0.06			0.02	5.28
19	Q65LW6	IV (D-AlaAT)	0.04			0.16	1.91		
20	E6LHY8	IV (D-aa-AT)	0.05			0.38	5.65	9.82	
21	P54694	IV (D-AlaAT)	0.05			0.58	2.80	2.66	
22	A4IKV7	IV (D-AlaAT)	0.21			0.76	3.68		
23	Q8CUM4	IV (D-AlaAT)	0.03			0.27	1.73		
24	I0JK30	IV (D-aa-AT)	0.01			0.02		0.31	
25	C3BK25	IV (D-AlaAT)	0.01			0.01		0.05	
26	Q815D1	IV (D-AlaAT)	0.03			0.03	1.48		
27	O07597	IV (D-AlaAT)	0.08			0.50	3.68		
28	F8F1M1	IV (D-AlaAT)	0.06			0.05	2.25		
29	Q9K939	IV (D-AlaAT)	0.02			0.04	1.28	0.38	
30	D5DJG2	IV (D-AlaAT)	0.06			0.07	3.29		
31	C4LDS0	IV (BCAT)						0.02	1.64
32	B2JDD1	IV (BCAT)						0.02	1.14
33	Q3SH06	IV (BCAT)						0.02	1.40
34	R4KKG0	V (Ser-glyox-TA)	0.02		0.08				
35	Q5N2G0	V	0.02	16	0.84			0.02	1.10
36	A1HUC4	V (Ser-glyox-TA)	0.01	16	0.15				
37	Q72ES5	V	0.01	16	0.08				
38	E1QEV7	V	0.01	16	0.09				

For each combination of substrates a color gradient from light to dark blue underline the relative activity of the 10 best hits

*AspAT* aspartate aminotransferase, *HisPAT* histidinol-phosphate aminotransferase, *PheAT* phenylalanine aminotransferase, *D-AlaAT* D-alanine aminotransferase, *D-aaAT* D-amino acid aminotransferase, *BCAT* branched chain aminotransferase, *PserAT* phosphoserine aminotransferase, *Ser-glyox-TA* serine-glyoxylate transaminase

shows negligible activity towards the tested acceptor substrate. However, this latter issue cannot be considered as a severe limitation regarding the high substrate specificity of AspAT towards acidic keto and amino acids (Asp, Glu, and analogues). Moreover, the use of L- or D-Glu as primary amino donor allows the detection of enzymes belonging to the L- or D-TA family.

According to the results compiled in Table 2, several groups of hits are clearly observed, thus revealing a correlation between substrate specificity and sequence homology. However, these newly identified TA are highly diverse in terms of protein sequence (see Tables S4 and S5 in the supplementary material). Among the 19 hits detected with L-CSA and KG, 12 highly active enzymes were found annotated in class I/II, six of which as putative AspAT. Very interestingly, other hits were annotated in class V in which no such activity was described so far. Due to the high HT value calculated for L-CSA-KG couple under our standard assay conditions, it was not possible to determine relative activities for 16L-CSA-KG-TA which showed saturating activities ( $>16$  mU/well). Indeed, the cell lysate volume introduced in each assay (2  $\mu$ L in a total volume of 200  $\mu$ L) was tuned to detect moderate activities which are generally expected for non-natural substrates. Thus, when using L-CSA and OPBA as substrates, 17 hits were obtained with quantifiable activities from 0.02 to 0.84 mU/well. OPBA was chosen as precursor of HPhe which is an important non-canonical amino acid, notably found in antihypertensive agents (Wyvratt 1988; Hayashi et al. 1989). Among the best 10 hits shown in Table 2, six belong to the previously described group of TAs that accept KG, including the best hit (0.84 mU/well, entry 35) annotated in class V. Three hits were identified as a different group annotated as HisPAT in class II, albeit with lower activities (0.06–0.13 mU/well, entries 16–18). When D-CSA was used as amino donor, 12 hits were detected with KG (0.36–5.65 mU/well), whereas five enzymes showed significant activities with OPBA as acceptor (0.05–9.82 mU/well, see entries 20, 21, 24, 25, and 29). All the best hits detected with D-CSA were shown to belong to a single group composed of enzyme of class IV annotated as D-Ala-TA or D-amino acid-TA. Interestingly, among 17 well-expressed enzymes bearing these annotations in our collection, 14 were found as hits with D-CSA. This result indicates that this substrate might be commonly accepted by enzymes of the D-TA family. Another noticeable feature of this enzyme group was the high  $A_0$  measured for the control without acceptor substrate. Indeed rates of  $SO_2$  formation were found non-negligible in several cases (0.04–0.76 mU/well, see entries 20–25 and 27–30). It thus appeared that enzymes that belong to the D-TA group are able to catalyze the consistent production of  $SO_2$  from D-CSA in the absence of acceptor while this reaction proceeded with lower rates from L-CSA (0.02–0.21 mU/well, see entries 20–25 and 27–30). The complementary in situ NMR experiments carried out with the best hit in the D-TA series (E6LHY8, entry 20) confirmed the desulfination reaction

of CSA which produces Ala along with  $SO_2$  as evidenced with our chemically coupled assay. Further studies are required to explore more deeply this novel enantioselective desulfination activity. Finally, the use of the enzymatically coupled assay with L-Glu as primary amino donor enabled the detection of 41 enzymes converting OPBA into HPhe and which can be divided into four groups represented by the 10 best hits shown in Table 2. Two of them were annotated in class I/II (entries 1–2), four in class II as HisPAT or PheAT (entries 15–18), three in class IV as BCAT (entries 31–33), and finally one in class V (entry 35) which was already described above as the best hit found in the chemically coupled assay with L-CSA and OPBA. An activity of 5.28 mU/well was measured for the best hit in our conditions (entry 18). However, as mentioned above, a 20-fold excess of auxiliary enzyme proved necessary to reach a non-limiting rate for this reaction step. Considering that a standard amount of 20 mU/well of AspAT was used in the enzymatically coupled assay, all values above 1 mU/well are therefore underestimated (see Fig. 5). Finally, out of a total of 49 hits found with OPBA in the chemically coupled assay (17 hits) and enzymatically coupled assays (41 hits), nine enzymes only were detected in both assays. This comparison clearly demonstrates the complementarity of these two assays. Moreover, the use of the enzymatically coupled assay significantly increases the probability of hit detection for a given acceptor.

In conclusion, we have developed new high throughput colorimetric assays for the screening of TA collections. These assays were shown to display high sensitivity and broad dynamic range for the measurement of TA activities towards an unlimited range of  $\alpha$ -keto acids as acceptor and CSA or Glu as donor. TA stereoselectivity could be assessed through the choice of donor from L- or D-series. The combination of both chemically and enzymatically coupled assays thus offers a very efficient way to identify valuable enzymes for the stereoselective synthesis of a large variety of rare or unnatural amino acids. Moreover, the transamination reaction in both assays is that of interest in biocatalysis, i.e., the enantioselective formation of amino acid from a prochiral ketone, thus giving a reliable prediction of the TA applicability in biocatalytic processes.

**Acknowledgments** The authors thank the French National Center for Scientific Research (CNRS) for the financial support. They are grateful to Prof. Kagamiyama's group (Osaka Medical College, Japan) for providing them with the AspAT and BCAT overexpressing *E. coli* strains. They also thank Ms Magalie Abrantes and Ms Martine Sancelme for the enzyme production.

**Associated content** Supporting information. Calibration curves for sulfite ions, L-CSA, AspAT and BCAT, Hanes-woolf plots for steady state kinetic studies of AspAT and BCAT using various assays, HPhe formation plots, CSA desulfination: NMR spectra and plots. TA library data: reference set, primers used for cloning, enzyme homologies.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no competing interests.

**Human and animal rights and informed consent** This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

## References

- Aslanidis C, de Jong PJ (1990) Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res* 18:6069–6074
- Assaf Z, Larsen AP, Venskutonytė R, Han L, Abrahamson B, Nielsen B, Gajhede M, Kastrup JS, Jensen AA, Pickering DS, Frydenvang K, Gefflaut T, Bunch L (2013) Chemoenzymatic synthesis of new 2,4-syn-functionalized (S)-glutamate analogues and structure–activity relationship studies at ionotropic glutamate receptors and excitatory amino acid transporters. *J Med Chem* 56:1614–1628
- Barber JEB, Damry AM, Calderini GF, Walton CJW, Chica RA (2014) Continuous colorimetric screening assay for detection of d-amino acid aminotransferase mutants displaying altered substrate specificity. *Anal Biochem* 463:23–30
- Bommer M, Ward JM (2013) A 1-step microplate method for assessing the substrate range of l- $\alpha$ -amino acid aminotransferase. *Enzyme Microb Technol* 52:218–225
- Cooper AJL, Conway M, Hutson SM (2002) A continuous 96-well plate spectrophotometric assay for branched-chain amino acid aminotransferases. *Anal Biochem* 308:100–105
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70–77
- Emilliozzi R, Pichat L (1959) Méthode simple de préparation d'acide L (+) amino-2 sulfino-3 propionique (acide cystéine sulfonique). *Bull Société Chim Fr* 1887–1888
- Fadnavis NW, Seo S-H, Seo J-H, Kim B-G (2006) Asymmetric synthesis of nonproteinogenic amino acids with l-amino acid transaminase: synthesis of (2S)-2-amino-4-oxo-4-phenylbutyric and (3E,2S)-2-amino-4-phenylbutenoic acids. *Tetrahedron Asymmetry* 17:2199–2202
- Gefflaut T, Assaf Z, Sancelme M (2012) Preparation of glutamate analogues by enzymatic transamination. In: Pollegioni L, Servi S (eds) *Unnatural Amino Acids*. Humana press-springer, New-York, pp 55–72
- Green AP, Turner NJ, O'Reilly E (2014) Chiral amine synthesis using  $\omega$ -transaminases: an amine donor that displaces equilibria and enables high-throughput screening. *Angew Chem Int Ed* 53:10714–10717
- Hayashi K, Nunami K, Kato J, Yoneda N, Kubo M, Ochiai T, Ishida R (1989) Studies on angiotensin converting enzyme inhibitors. 4. Synthesis and angiotensin converting enzyme inhibitory activities of 3-acyl-1-alkyl-2-oxoimidazolidine-4-carboxylic acid derivatives. *J Med Chem* 32:289–297
- Höhne M, Schätzle S, Jochens H, Robins K, Bornscheuer UT (2010) Rational assignment of key motifs for function guides in silico enzyme identification. *Nat Chem Biol* 6:807–813
- Hopwood J, Truppo MD, Turner NJ, Lloyd RC (2011) A fast and sensitive assay for measuring the activity and enantioselectivity of transaminases. *Chem Commun* 47:773–775
- Humphrey RE, Ward MH, Hinze W (1970) Spectrophotometric determination of sulfite with 4,4'-dithio-dipyridine and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Chem* 42:698–702
- Hwang B-Y, Cho B-K, Yun H, Koteshwar K, Kim B-G (2005) Revisit of aminotransferase in the genomic era and its application to biocatalysis. *J Mol Catal B Enzym* 37:47–55
- Inoue K, Kuramitsu S, Aki K, Watanabe Y, Takagi T, Nishigai M, Ikai A, Kagamiyama H (1988) Branched-chain amino acid aminotransferase of *Escherichia coli*: overproduction and properties. *J Biochem (Tokyo)* 104:777–784
- Jenkins WT, D'Ari L (1966) Preparation of the phosphopyridoxamine form of the glutamic-aspartic transaminase. *Biochem Biophys Res Commun* 22:376–382
- Juncosa JI, Lee H, Silverman RB (2013) Two continuous coupled assays for ornithine- $\delta$ -aminotransferase. *Anal Biochem* 440:145–149
- Kagamiyama H, Hayashi H (2000) Branched-chain amino-acid aminotransferase of *Escherichia coli*. In: RA Harris, and JR Sokatch (Ed) *Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego, pp 103–113
- Kamitori S, Hirotsu K, Higuchi T, Kondo K, Inoue K, Kuramitsu S, Kagamiyama H, Higuchi Y, Yasuoka N, Kusunoki M, Matsuura Y (1987) Overproduction and preliminary X-ray characterization of aspartate aminotransferase from *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)* 101:813–816
- Kim J, Kyung D, Yun H, Cho B-K, Seo J-H, Cha M, Kim B-G (2007) Cloning and characterization of a novel  $\beta$ -transaminase from *Mesorhizobium sp.* strain LUK: a new biocatalyst for the synthesis of enantiomerically pure  $\beta$ -amino acids. *Appl Environ Microbiol* 73:1772–1782
- Koszelewski D, Tauber K, Faber K, Kroutil W (2010)  $\omega$ -Transaminases for the synthesis of non-racemic  $\alpha$ -chiral primary amines. *Trends Biotechnol* 28:324–332
- Kreimeyer A, Perret A, Lechaplais C, Vallet D, Medigue C, Salanoubat M, Weissenbach J (2006) Identification of the last unknown genes in the fermentation pathway of lysine. *J Biol Chem* 282:7191–7197
- Li T, Kootstra AB, Fotheringham IG (2002) Nonproteinogenic  $\alpha$ -amino acid preparation using equilibrium shifted transamination. *Org Process Res Dev* 6:533–538
- Lo H-H, Hsu S-K, Lin W-D, Chan N-L, Hsu W-H (2005) Asymmetrical synthesis of l-homophenylalanine using engineered *Escherichia coli* aspartate aminotransferase. *Biotechnol Prog* 21:411–415
- Matcham G, Bhatia M, Lang W, Lewis C, Nelson R, Wang A, Wu W (1999) Enzyme and reaction engineering in biocatalysis: synthesis of (S)-methoxyisopropylamine ((S)-1-methoxypropan-2-amine). *Chim Int J Chem* 53:584–589
- Maupin P (1992) One-step test for aspartate aminotransferase. WO9213966 (A1). [http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=WO&NR=9213966A1&KC=A1&FT=D&ND=3&date=19920820&DB=EPODOC&locale=en\\_EP](http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=WO&NR=9213966A1&KC=A1&FT=D&ND=3&date=19920820&DB=EPODOC&locale=en_EP)
- Mehta PK, Hale TI, Christen P (1993) Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur J Biochem* 214:549–561
- Odstrchel G, Leung G (1994) Aminotransferase assay. WO9423062 (A1). [http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=WO&NR=9423062A1&KC=A1&FT=D&ND=3&date=19941013&DB=EPODOC&locale=en\\_EP](http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=WO&NR=9423062A1&KC=A1&FT=D&ND=3&date=19941013&DB=EPODOC&locale=en_EP)
- Park E-S, Dong J-Y, Shin J-S (2013)  $\omega$ -Transaminase-catalyzed asymmetric synthesis of unnatural amino acids using isopropylamine as an amino donor. *Org Biomol Chem* 11:6929–6933
- Passera E, Campanini B, Rossi F, Casazza V, Rizzi M, Pellicciari R, Mozzarelli A (2011) Human kynurenine aminotransferase II—reactivity with substrates and inhibitors. *FEBS J* 278:1882–1900
- Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund K, Ceric G, Clements J, Heger A, Holm L, Sonnhammer ELL, Eddy SR, Bateman A, Finn RD (2012) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 40:D290–D301
- Rej R (1982) A convenient continuous-rate spectrophotometric method for determination of amino acid substrate specificity of

- aminotransferases: application to isoenzymes of aspartate aminotransferase. *Anal Biochem* 119:205–210
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 132:365–386
- Savile CKJ, Mundorff JM, Moore EC, Tam JC, SarenaJarvis WR, Colbeck JC, Krebber AF, Brands FJ, JosDevine PN, Huisman GW, Hughes GJ (2010) Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. *Science* 329:305–309
- Sawai T, Koma D, Hara R, Kino K, Harayama S (2007) A high-throughput and generic assay method for the determination of substrate specificities of thermophilic  $\alpha$ -aminotransferases. *J Microbiol Methods* 71:32–38
- Simon RC, Grischek B, Zepeck F, Steinreiber A, Belaj F, Kroutil W (2012) Regio- and stereoselective monoamination of diketones without protecting groups. *Angew Chem Int Ed* 51:6713–6716
- Taylor PP, Pantaleone DP, Senkpeil RF, Fotheringham IG (1998) Novel biosynthetic approaches to the production of unnatural amino acids using transaminases. *Trends Biotechnol* 16:412–418
- Truppo MD, Turner NJ (2010) Micro-scale process development of transaminase catalysed reactions. *Org Biomol Chem* 8:1280–1283
- Vergne-Vaxelaire C, Bordier F, Fossey A, Besnard-Gonnet M, Debard A, Mariage A, Pellouin V, Perret A, Petit J-L, Stam M, Salanoubat M, Weissenbach J, De Berardinis V, Zaparucha A (2013) Nitrilase activity screening on structurally diverse substrates: providing biocatalytic tools for organic synthesis. *Adv Synth Catal* 355:1763–1779
- Walton CJW, Chica RA (2013) A high-throughput assay for screening L- or D-amino acid specific aminotransferase mutant libraries. *Anal Biochem* 441:190–198
- Weinhandl K, Winkler M, Glieder A, Camattari A (2012) A novel multi-enzymatic high throughput assay for transaminase activity. *Tetrahedron* 68:7586–7590
- Wyvratt MJ (1988) Evolution of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Clin Physiol Biochem* 6:217–229
- Yu X, Bresser J, Schall I, Djurdjevic I, Buckel W, Wang X, Engel PC (2012) Development of a satisfactory and general continuous assay for aminotransferases by coupling with (R)-2-hydroxyglutarate dehydrogenase. *Anal Biochem* 431:127–131



**Résumé :** Ce travail de thèse pluridisciplinaire a eu pour objectif la découverte de nouveaux outils biocatalytiques pour la synthèse d'amines chirales, par criblage de banques d'enzymes issues de la biodiversité. Il a impliqué un ensemble de tâches diverses.

Trois collections de transaminases, comptant un total d'environ 800 enzymes, ont été construites dans le cadre d'une collaboration étroite avec le Génoscope d'Evry. Nous avons mis au point différents tests d'activité originaux, qui ont permis un criblage haut-débit de ces banques de transaminases et la détection, très sensible, de nouveaux catalyseurs pour une grande variété de réactions de transamination. Un traitement statistique rigoureux des données a permis de révéler un ensemble de hits, au sein duquel 24 TA ont été sélectionnées pour des études plus approfondies. Après avoir confirmé les résultats du criblage, nous avons exploré plus en détail le spectre de substrats de ces enzymes et les propriétés spécifiques de certaines d'entre elles. Nous avons enfin démontré l'intérêt de ces nouveaux biocatalyseurs à travers des premières applications. Certaines TA ont ainsi pu être engagées dans une cascade enzymatique ou mises en œuvre dans un procédé innovant pour la synthèse des deux énantiomères de l'homophénylalanine.

En plus d'offrir de nombreuses perspectives d'applications, ce travail de thèse représente une contribution notable à l'avancée des connaissances fondamentales sur les réactions de transamination enzymatique.

**Abstract:** This multidisciplinary project was devoted to the discovery of new biocatalysts for the synthesis of chiral amines, through the screening of libraries of enzymes selected from the biodiversity. It involved the achievement of various tasks.

The design and construction of three collections of transaminases, with a total of around 800 enzymes, was carried out within a strong collaboration with the Genoscope institute of Evry. We have developed novel efficient enzymatic assays allowing the high-throughput screening of the transaminase libraries and the detection, with high sensitivity, of new biocatalysts for a variety of transamination reactions. A rigorous statistical data analysis allowed highlighting a large set of hits, in which 24 transaminases were selected for further studies. After confirming the screening results, we have explored the substrate spectrum of the selected enzymes and studied the specific properties of some of them. Finally, we have demonstrated the usefulness of the new identified biocatalysts through their implementation for several applications. Some enzymes were used in an enzymatic cascade, whereas others allowed the synthesis of L- or D-homophénylalanine through an efficient innovative process.

In addition to the multiple perspectives of application, this PhD work constitutes a valuable contribution to the fundamental knowledge about enzymatic transaminations.