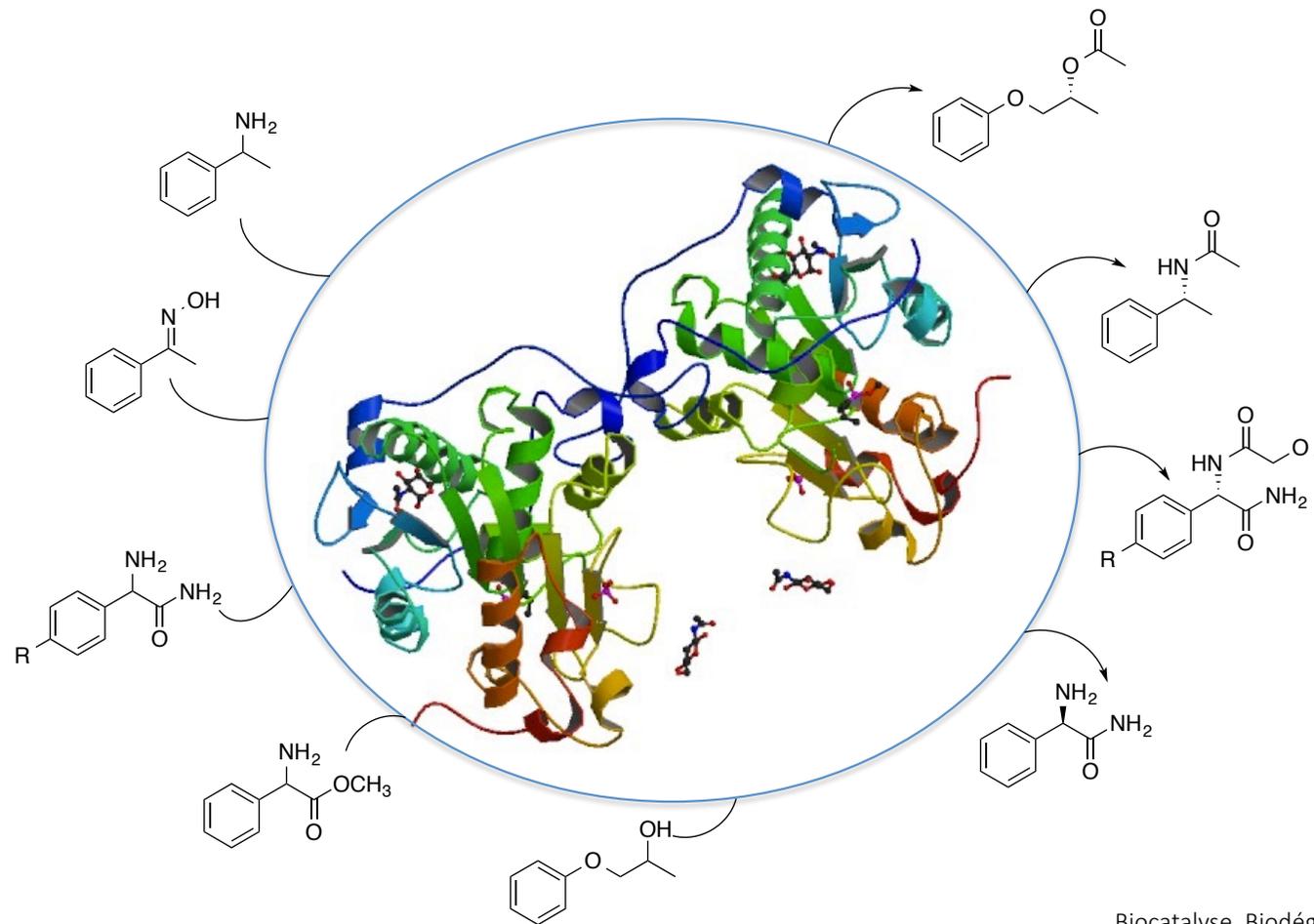


# BIOCATALYSE EN SYNTHÈSE



Lipase B de *Candida antarctica*  
Source : <http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=3ICW>

Anne Zaparucha  
Biocatalyse, Biodégradation & Métabolisme Synthétique  
UMR Génomique Métabolique  
Genoscope, IBFJ CEA, Evry  
[anne.zaparucha@genoscope.cns.fr](mailto:anne.zaparucha@genoscope.cns.fr)

## **PLAN**

### **Introduction**

Définitions

### **I Notions de promiscuité**

Promiscuité de substrats

Promiscuité catalytique

Transformations communes en biocatalyse

### **II Activités enzymatiques d'intérêt en synthèse**

Disponibilité

Nouvelles enzymes

Biocatalyse

## Biocatalyse, bioconversion, ingénierie métabolique : définitions

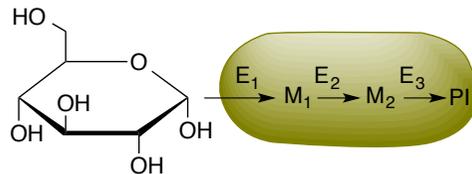
- ✓ Biocatalyse : utilisation d'enzymes en synthèse organique. Utilisation *in vitro*.



- ✓ Bioconversion : transformation de la matière organique résultant de la croissance de micro-organismes et consiste donc en la modification d'une substance organique en une ou plusieurs autres grâce à l'action d'organismes vivants ou d'un système enzymatique. Utilisation *in vivo*.



Ingénierie métabolique : construction de voies métaboliques, nouvelles ou non, pour produire ou transformer des composés organiques d'intérêt. Utilisation *in vivo*.



# NOTIONS DE PROMISCUITÉ

## Enzymes pour la synthèse organique

Une enzyme = un substrat ?

Dans les voies métaboliques  
une enzyme catalyse une réaction sur un substrat

Nomenclature donnée par le numéro EC = Enzyme Commission

EC 1 oxydo-réductases

EC 2 transférases

EC 3 hydrolases

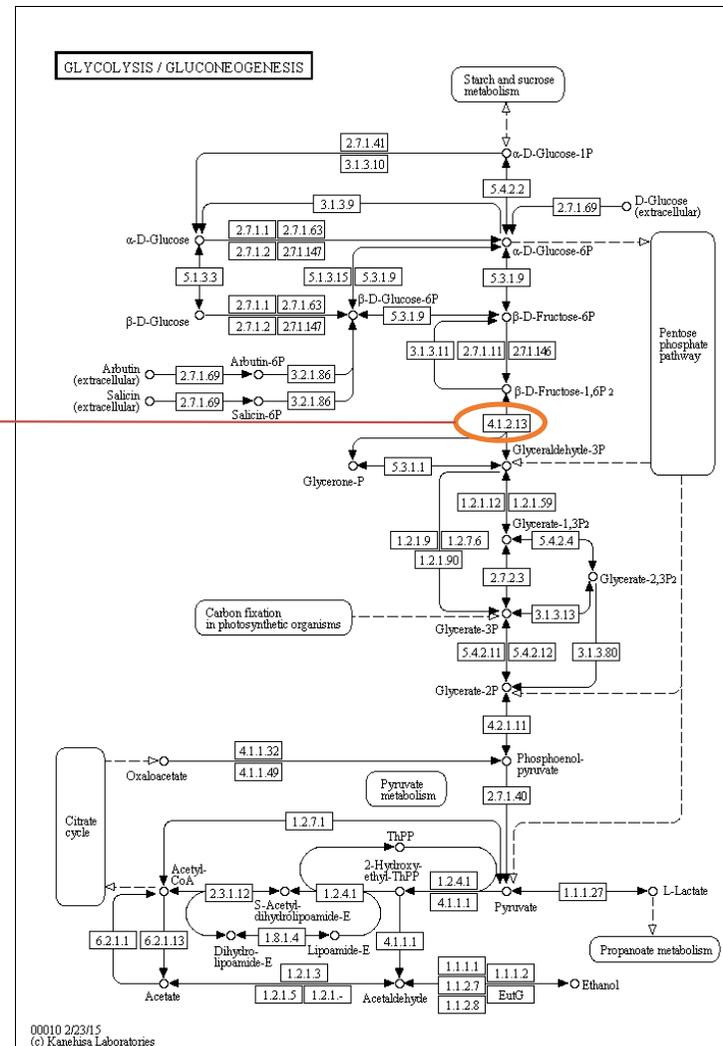
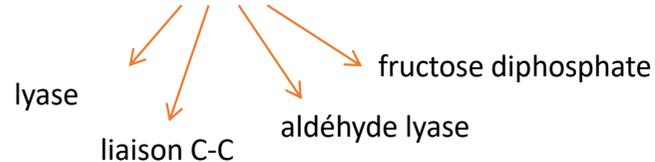
EC 4 lyases

EC 5 isomérases

EC 6 ligases

EC 7 translocases

Ex : fructose diphosphate aldolase EC 4.1.2.13

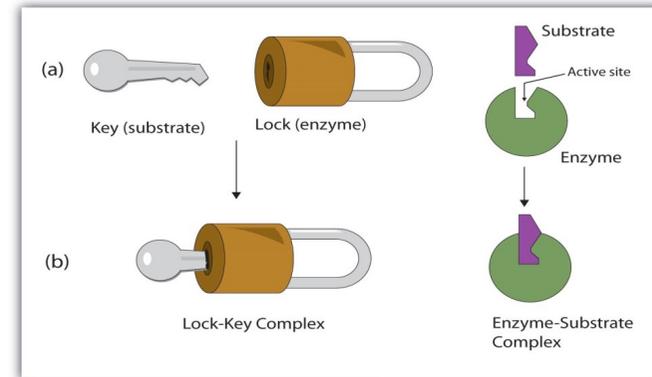


**Une enzyme = un substrat ?**

**Interaction enzyme-substrat**

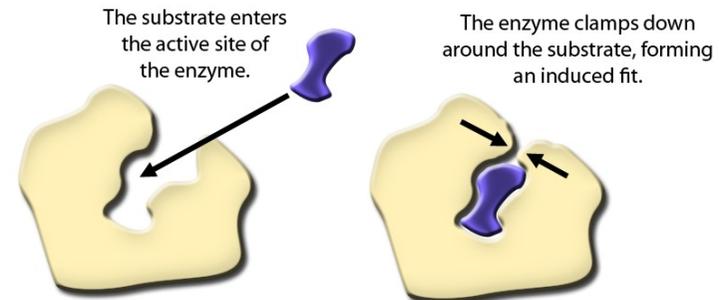
*Le paradigme*

modèle clé-serrure (Fischer 1894) :  
une enzyme = un substrat



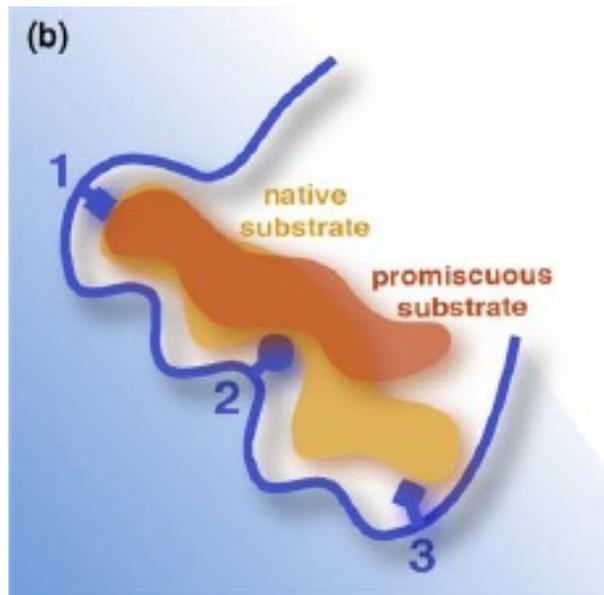
*Ajustement*

modèle de l'ajustement induit (Koshland 1958) :  
le substrat induit un changement conformationnel  
du site actif de l'enzyme



## Promiscuité

- promiscuité de substrats : acceptation de substrat variés, métaboliques ou non.



A. Babbie et al. *Curr.Opin.Chem.Biol.* **2010**, *14*, 200-207

Le site actif est optimisé pour lier le substrat dans une orientation propice aux interactions avec les résidus catalytiques et/ou les cofacteurs (1, 2 et 3).

Dans la plupart des cas, les substrats promiscuitaires ont des similarités structurales avec le substrat natif et développent les mêmes interactions avec les résidus du site actif (1 et 2).

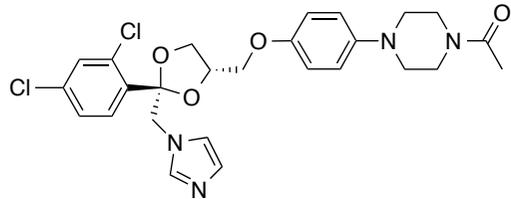
- promiscuité catalytique : capacité pour une enzyme à catalyser plus d'une réaction.

## Promiscuité de substrats

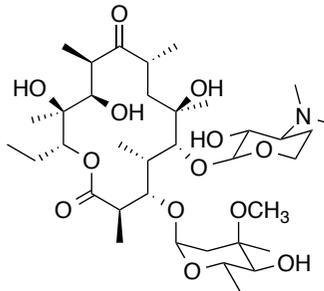
### Exemple des cytochromes P450

- enzymes d'oxydation
- monooxygénases (transfert d'un seul oxygène de l'oxygène moléculaire)
- présentes chez eucaryotes et procaryotes
- rôles catabolique et anabolique
- chez l'homme, oxydation des xénobiotiques.

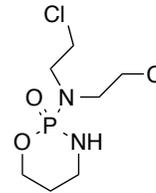
Variété de substrats de CYP3A4, isoforme de CYP humaine ayant une grande promiscuité de substrats, responsable du métabolisme d'environ 50% des médicaments.



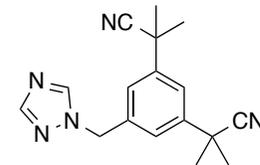
ketoconazole  
antifongique



érythromycine  
antibiotique



cyclophosphamide  
anticancéreux



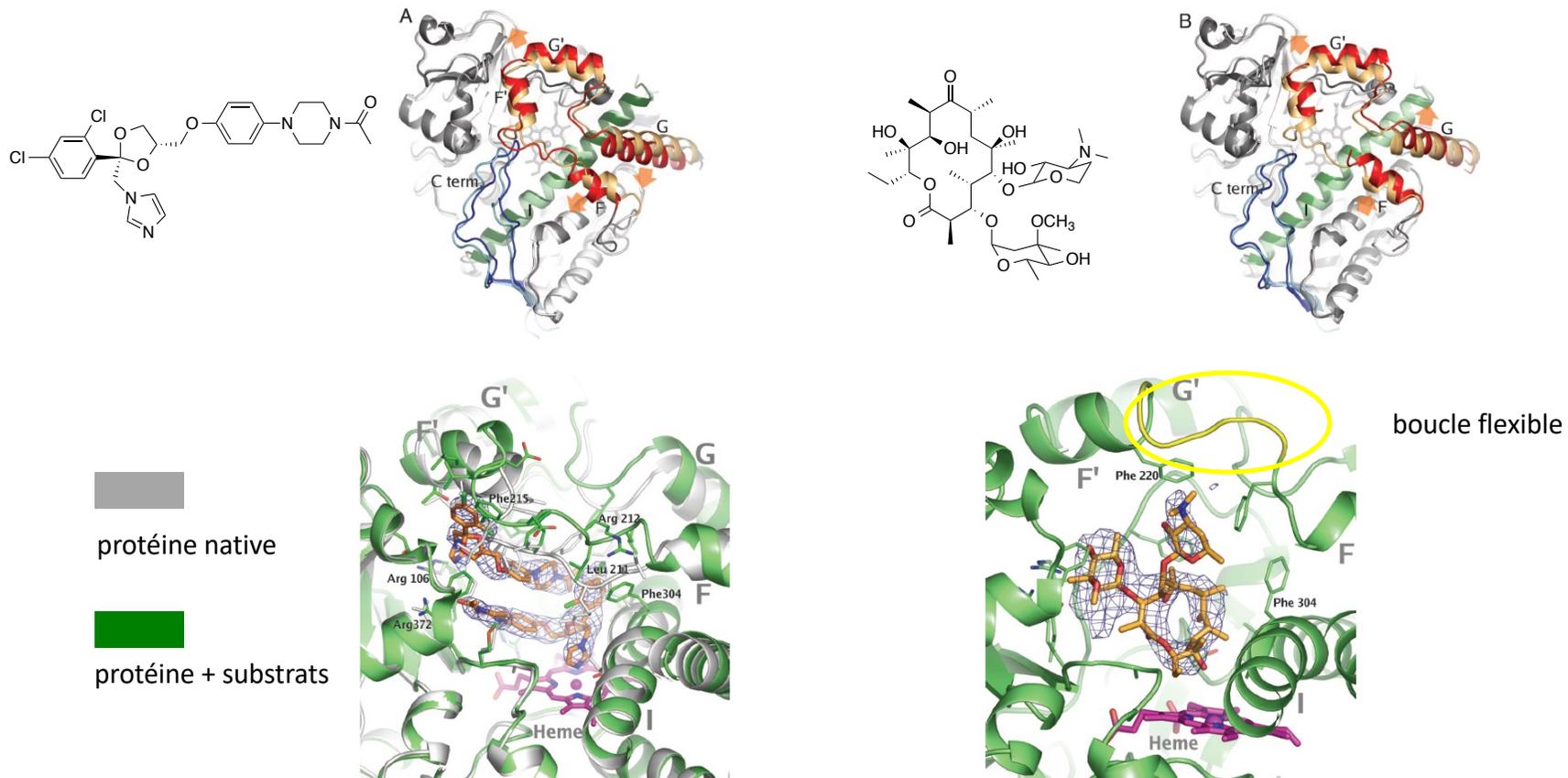
anastrozole  
anticancéreux



promiscuité de substrats dû au rôle biologique : détoxification

## Promiscuité de substrats

Étude de CYP3A4 avec ces substrats par cristallographie RX.

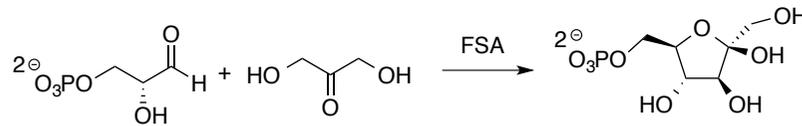


sous l'effet de la liaison avec le substrat, la protéine subit des modifications conformationnelles conduisant à une augmentation du volume du site actif de 80%

## Promiscuité de substrats

Exemple de la fructose-6-phosphate aldolase de *E. coli* K12.

Catalyse la formation de fructose-6-phosphate par réaction d'aldolisation entre le glycéraldéhyde-3-phosphate et la dihydroxyacétone.



LOGIN | Why Login? | Create New Account

Enter a gene, protein, metabolite or pathway... Quick Search Gene Search  
Searching *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 (EcoCyc) [change organism database](#)

Sites ▾ Search ▾ Genome ▾ Metabolism ▾ Analysis ▾ SmartTables ▾ Help ▾

Add to SmartTable

### *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 Reaction: 4.1.2.-

Superclasses: [Reactions Classified By Conversion Type](#) → [Simple Reactions](#) → [Chemical Reactions](#)  
[Reactions Classified By Substrate](#) → [Small-Molecule Reactions](#)

EC Number: 4.1.2.-

Enzymes and Genes:  
[fructose 6-phosphate aldolase 2](#) ⓘ : [fsaB](#)  
[fructose 6-phosphate aldolase 1](#) ⓘ : [fsaA](#)

Show Atom Mapping:  Coloring?  Atom Numbering?

β-D-fructofuranose 6-phosphate ↔ dihydroxyacetone + D-glyceraldehyde 3-phosphate

[hide](#)

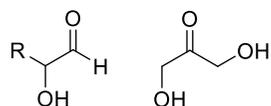
*Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 (EcoCyc)

Reaction:  
4.1.2.-

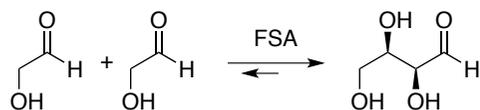
**OPERATIONS**

- Download atom mapping(s) for this reaction
- Comparison Operations**
  - Show this reaction in another database
  - Change organisms/databases for comparison operations
  - Search for this reaction in other databases
  - Species Comparison
  - Show this reaction in MetaCyc

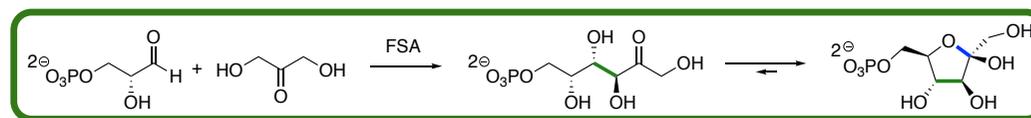
## Autres substrats



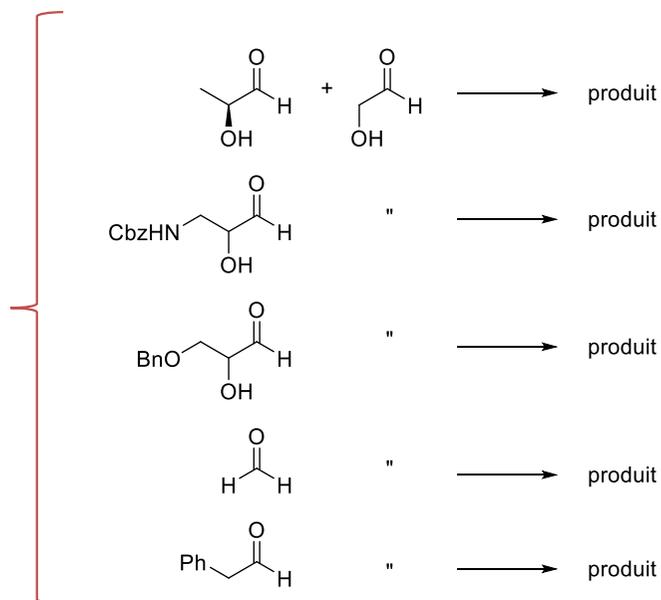
substrats métaboliques



substrats non métaboliques  
naturels ou non naturels



réaction métabolique



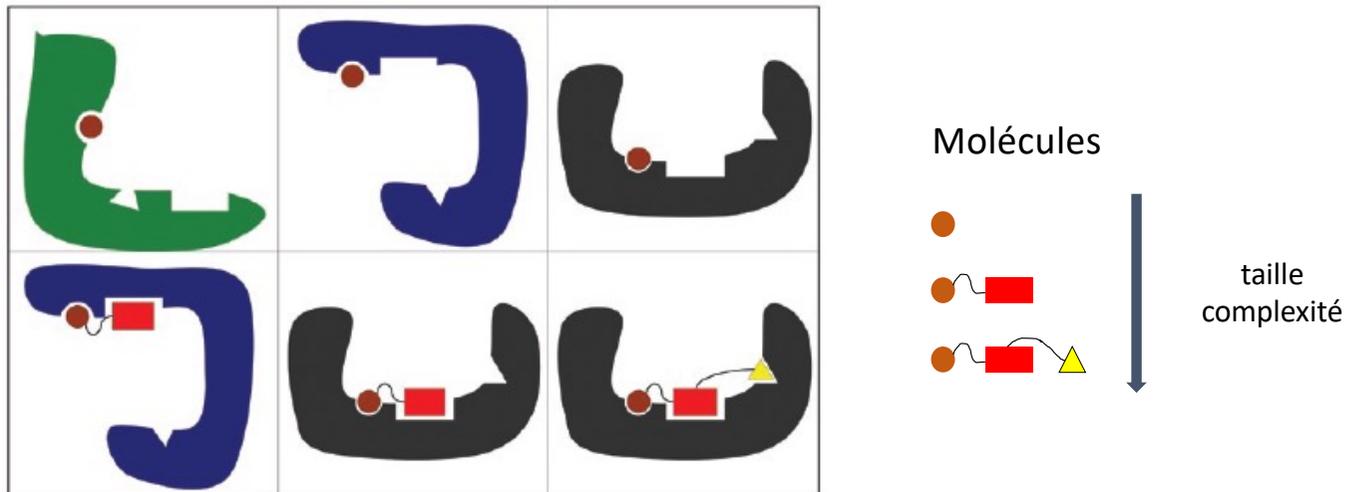
X. Garrabou et al. *Ang.Chem.Int.Ed.* **2009**, *48*, 5521-5525

**La biocatalyse repose sur cette promiscuité.**

Le but est d'identifier des enzymes suffisamment « générales » pour accepter différents substrats, mais assez sélectives pour ne conduire à la formation que d'un seul produit.

## Promiscuité de substrats

Interactions protéine – substrat :



Plus la molécule est de petite taille et simple, plus facilement elle se lie.

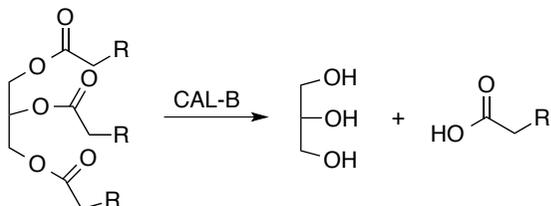
Plus il y a de possibilité de reconnaissance (interactions) d'une molécule, meilleure est la promiscuité, jusqu'au point où il y a une contrainte géométrique dans le site actif.

↑ complexité ↓ promiscuité

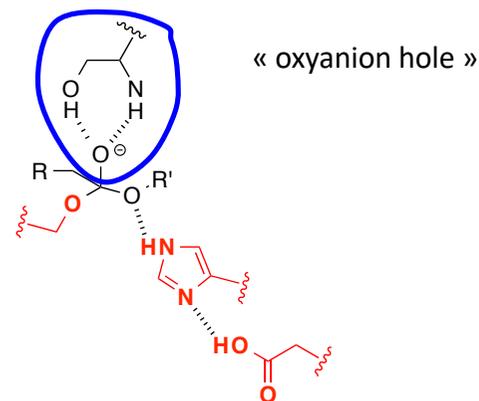
## Promiscuité catalytique

Exemple de la sérine hydrolase de *Candida antarctica*, la lipase CAL-B.

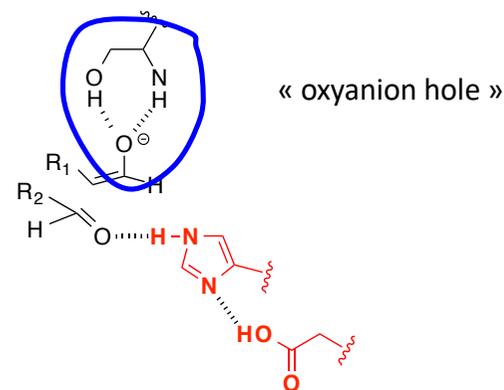
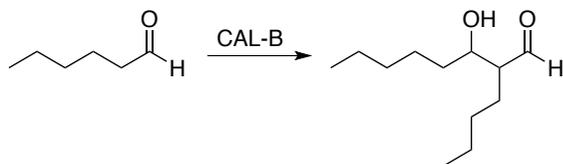
Réaction métabolique : hydrolyse des triglycérides.



triade catalytique 



Réaction promiscuitaire : aldolisation.



Mutagenèse de site : Ser105Ala et Ser105Gly

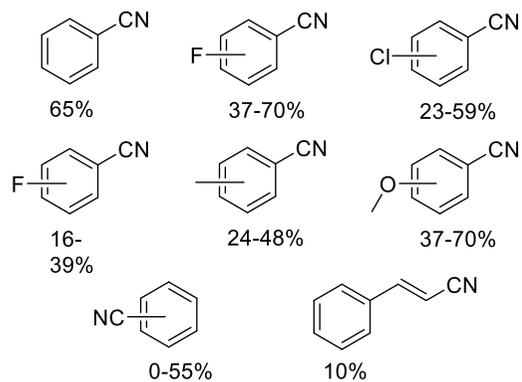
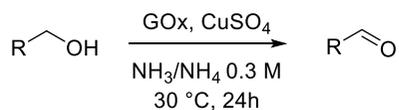
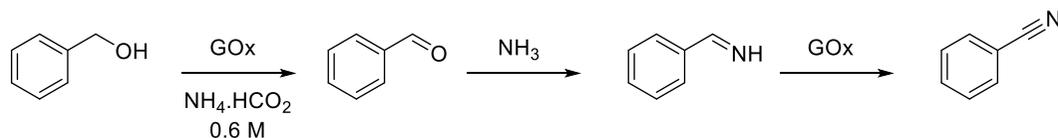
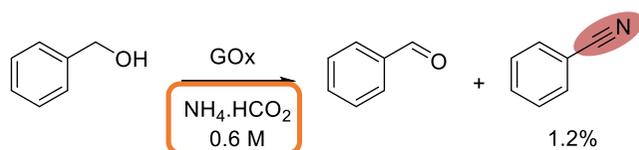
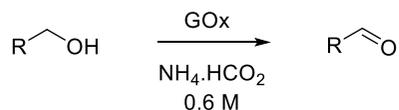
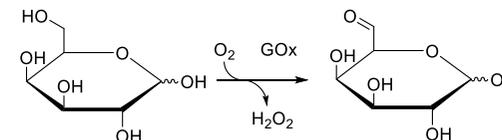
Activité spécifique : 0,0013  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  ;  
0,00325 enzyme sauvage.



« potentiel réactif » d'un site actif

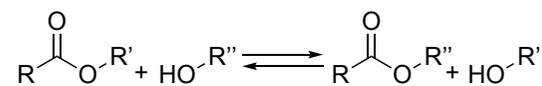
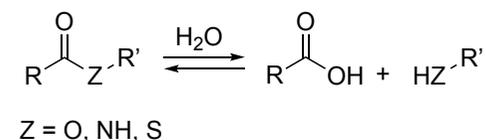
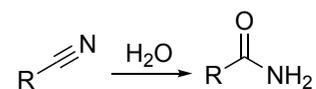
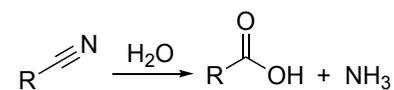
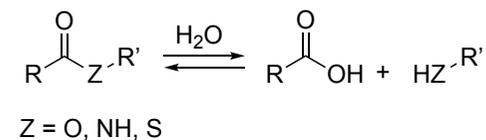
## Promiscuité catalytique ... par un heureux hasard!

Etude de l'oxydation d'alcools par la Galactose Oxidase (GOx) de *Fusarium* sp., enzyme à large spectre de substrats.



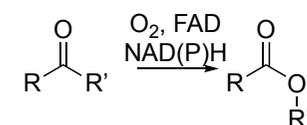
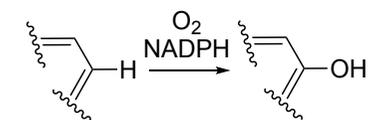
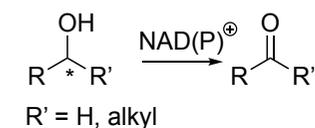
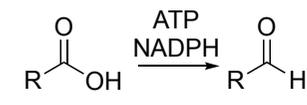
## Transformations communes en biocatalyse

Réaction	Substrat	Produit	Utilisation	Enzymes
Hydrolyse	esters	alcools et acides carboxyliques	synthèse dédoublément	lipase, estérase, protéase
	amides	amines et acides carboxyliques	synthèse dédoublément	lipase, estérase, protéase
	nitriles	acides carboxyliques	synthèse dédoublément	nitrilase
	nitriles	amides	synthèse dédoublément	nitrile hydratase
Estérification	alcools et acides carboxyliques	ester	synthèse dédoublément	lipase, estérase, protéase
Amidation	amines et acides carboxyliques	amides	synthèse dédoublément	lipase, estérase, protéase
Transestérification	alcools et esters	alcools et esters	synthèse dédoublément	lipase, estérase, protéase



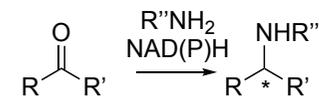
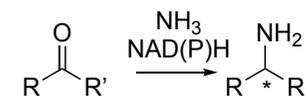
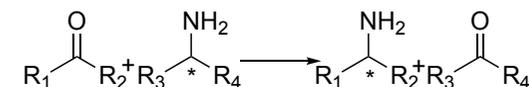
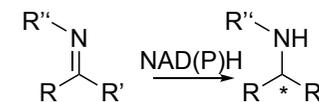
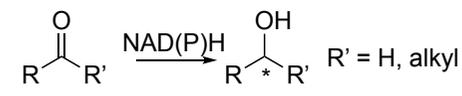
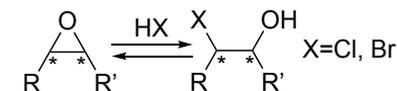
## Transformations communes en biocatalyse

Réaction	Substrat	Produit	Utilisation	Enzymes
Réduction acides	acides carboxyliques	aldéhydes	synthèse	carboxylic acid reductase (CAR)
Oxydation alcools	alcools secondaires	cétones	synthèse	alcool déshydrogénases (ADH), oxydase
	alcools primaires	aldéhydes	synthèse	alcool déshydrogénases (ADH), oxydase
Oxydation amines	amines	aldéhydes, cétones	synthèse	amine oxydases
Hydroxylation	C-H aromatiques	phénols	synthèse	monooxygénases, dioxygénases, peroxydases
Oxydation Bayer Villiger	cétones	esters	synthèse	Bayer Villiger monooxygénases (BVMO)



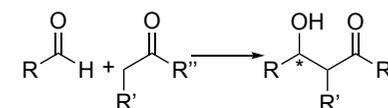
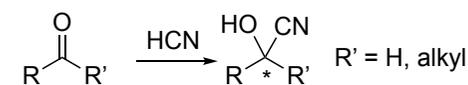
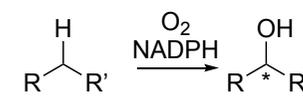
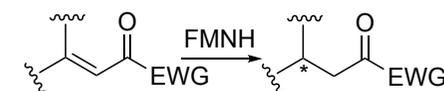
## Transformations stéréosélectives communes en biocatalyse

Réaction	Substrat	Produit	Utilisation	Enzymes
Déhydrohalogénéation	halohydrines	époxydes	synthèse	halohydrine déhalogénases
Réduction carbonyles	aldéhydes cétones	alcools	synthèse	alcool désydrogénase (ADH) cétoréductase (KR)
Réduction imines	imines	amines	synthèse	imine reductase (IRED)
Transamination	aldéhydes cétones	amines	synthèse	transaminases (TA)
Amination réductrice	aldéhydes cétones	amines	synthèse	amine dehydrogénases (AmDH),
Amination réductrice	aldéhydes cétones	amines	synthèse	reductive aminases (RedAm)



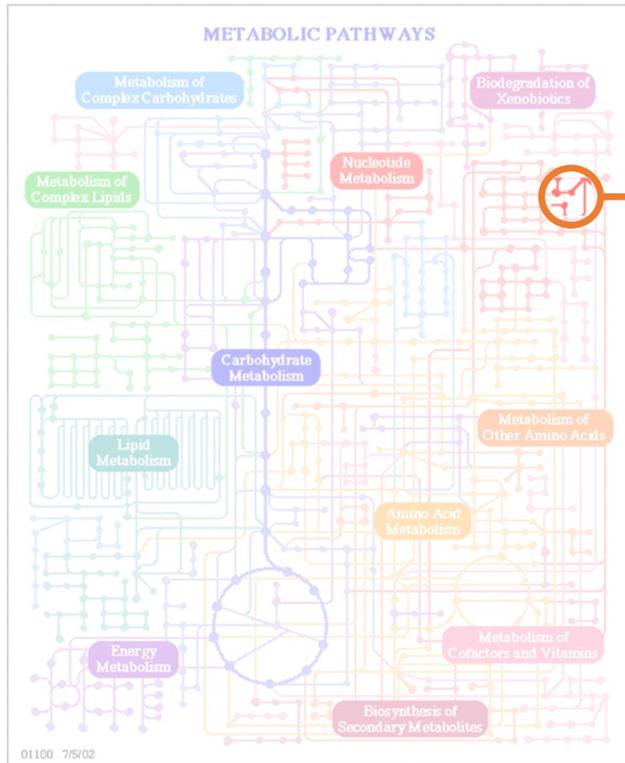
## Transformations stéréosélectives communes en biocatalyse

Réaction	Substrat	Produit	Utilisation	Enzymes
Réduction alcènes activés	aldéhydes, cétones, esters $\alpha,\beta$ -insaturés	aldéhydes, cétones, esters	synthèse	ène-réductases (ENR)
Hydroxylation	C-H saturées	alcools	synthèse	monooxygénases péroxydases
Formation cyanohydrines	aldéhydes cétones	cyanohydrines	synthèse	hydroxynitrile lyases (HNL)
Aldolisation	aldéhydes	aldols	synthèse	aldolases



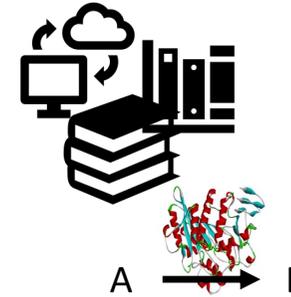
# ACTIVITÉS ENZYMATIQUES D'INTÉRÊT EN SYNTHÈSE

Où et comment disposer des enzymes d'intérêt ?



métabolisme

bases de données, littérature



Sous quelle forme ?



Enzymes isolées



Microorganismes entiers

Où?



Enzymes commerciales :  
Sigma-Aldrich ; Amano ; DSM ; Novozymes ;  
Codexis ; Almac etc ...



Faible variété, surtout enzymes hydrolytiques

# Disponibilités des souches de microorganismes



**INSTITUT PASTEUR**  
CENTRES NATIONAUX DE RÉFÉRENCE    CENTRES COLLABORATEURS DE L'OMS    **BIOBANQUES ET COLLECTIONS**    CIBU    CENTRES COLLABORATEURS DE VOIE

CENTRE DE RESSOURCES BIOLOGIQUES DE L'INSTITUT PASTEUR (CRBIP)    INVESTIGATION CLINIQUE ET ACCÈS AUX RESSOURCES BIOLOGIQUES (ICAREB)     
**COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM)**    COLLECTION DE VIRUS DE L'INSTITUT PASTEUR    COLLECTION DE L'INSTITUT PASTEUR (CIP)

Accueil > Santé publique > Biobanques et collections > Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)

## COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM)

©DrawInScience

**DSMZ** Leibniz Institute  
DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH

DSMZ   Collection   Research   Services   50 Jahre DSMZ

SHOP   CATALOGUE   DEPOSIT   PRESS

Search products & content

## Welcome to the Leibniz Institute DSMZ

German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH

**ATCC** | IN PARTNERSHIP WITH LGC STANDARDS

Login | Create a Profile | Quick Order

Products   Services   Standards   Resources   Support   About

Home > Products > Collections > Microbiology Collections

### QUICK LINKS

- New Features
- How to Order
- Quick Order
- Nagoya Protocol
- Report a Transfer
- Contact Us

## MICROBIOLOGY COLLECTIONS

ATCC has been the premier source for microbial reference strains since 1925, placing the highest standards on producing quality materials you can depend on for reproducible results. Choose from among the world's largest collection of bacteria, viruses, yeast, fungi, protozoa, nucleic acids, and molecular tools.

**Bacteria**  
The ATCC Bacteriology Collection is a

**Resources for Agricultural Research**  
ATCC offers a broad spectrum of fungi, yeasts, plant viruses.

ts-atcc.org

*compagnies à but non commercial*

## Où trouver des enzymes catalysant des réactions d'intérêt en synthèse organique ?



**dans le métabolisme !**

Tous les organismes produisent des enzymes pour catalyser l'ensemble des réactions de leur métabolisme. Il est connu depuis longtemps que des extraits de ressources naturelles peuvent aussi catalyser les réactions *in vitro*.

Par exemple, fabrication de fromages, fermentation alcoolique etc ...

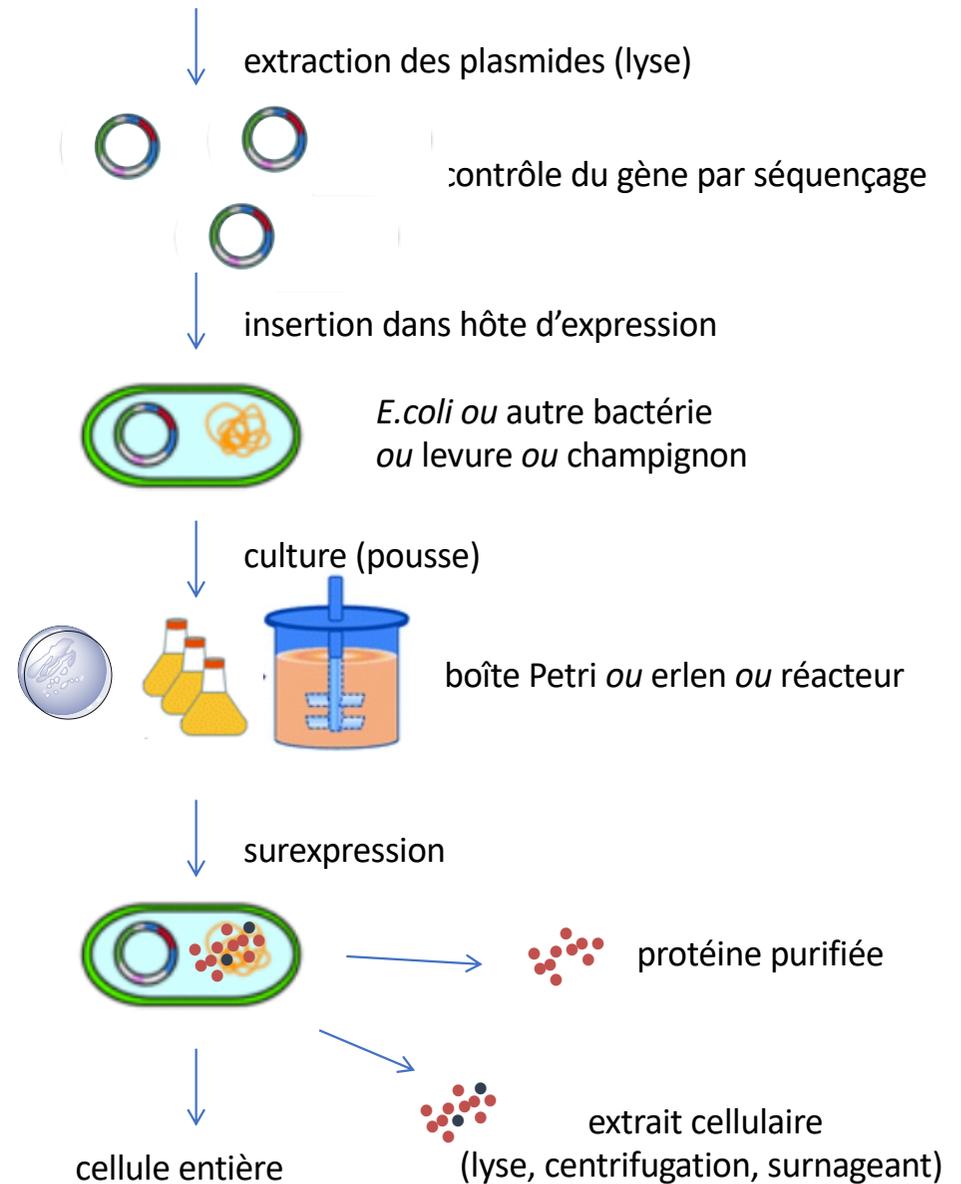
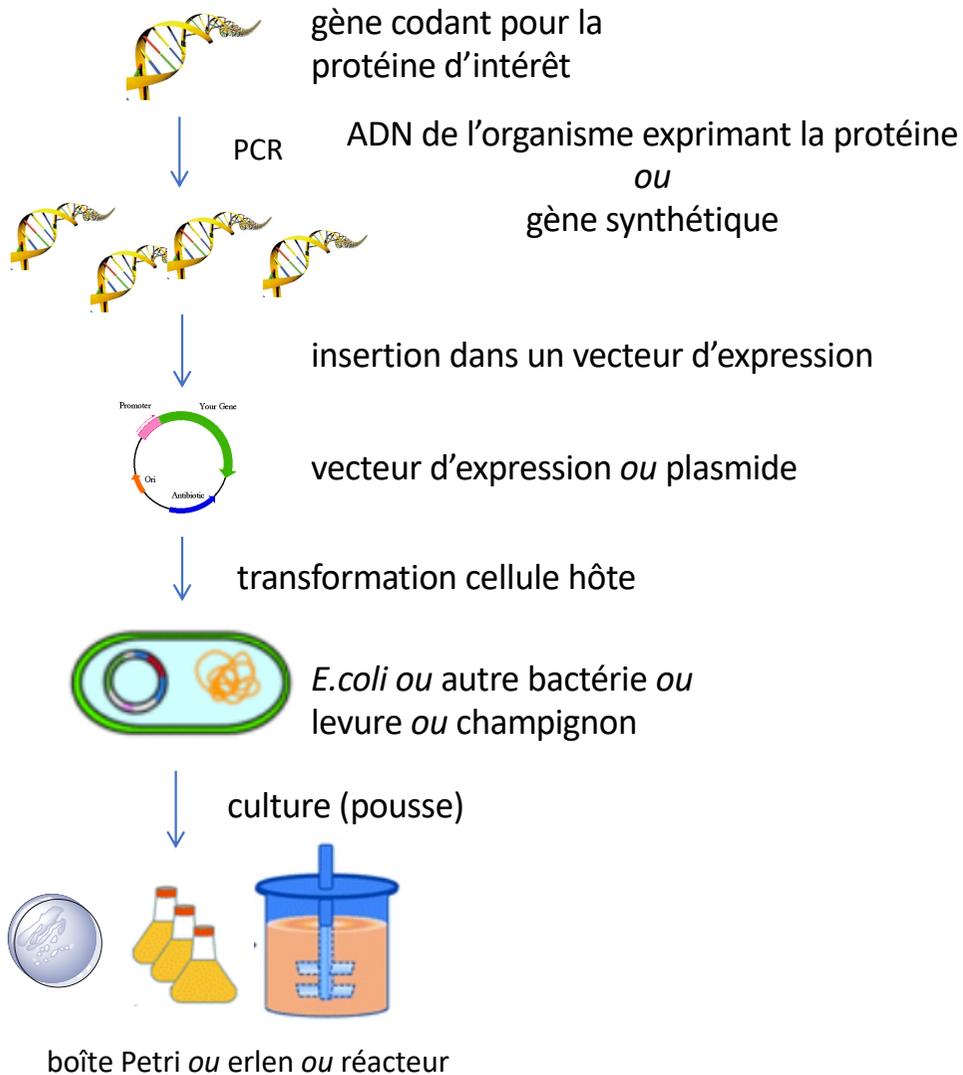
Les industries agro-alimentaires ont logiquement été parmi les premières à avoir utilisé les enzymes *in vitro*.

Jusqu'au 19<sup>ème</sup> siècle, utilisation des enzymes sous forme d'extrait d'organismes entiers, le catalyseur responsable de la transformation chimique est alors inconnu.

Développement de la biocatalyse « moderne » date de la fin du 19<sup>ème</sup> siècle lorsque Buchner a montré qu'un extrait de levure « non vivant » était capable de convertir du sucre en éthanol.

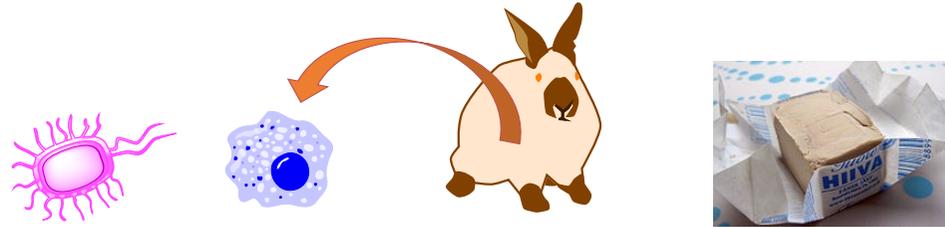
**L'identification et la source de l'enzyme adéquate pour résoudre un problème synthétique particulier sont à la base de chaque projet en biocatalyse.**

• Production d'enzymes recombinantes.



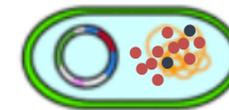
## Formes d'utilisation des enzymes

### Cellules entières.



- à priori le plus simple, microorganismes ou tissus
- facile car tous les co-facteurs sont présents, pas besoin d'en ajouter
- problèmes éventuels : culture ou prélèvement, pas faciles pour le chimiste organicien! ou difficulté de travailler à fortes concentrations (fragilité de la membrane cellulaire)
- **cas particuliers** : nécessité d'une très forte expression d'une activité enzymatique, exemple de *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulanger), très utilisée, ou besoin de système de recyclage de co-facteurs, exemple des CYP450.

### Cellules d'expression (enzymes recombinantes, cellules entières).



- surexpression de l'enzyme d'intérêt
- présence de tous les co-facteurs de la cellule hôte ou possibilité de co-exprimer des enzymes de recyclage si système de l'hôte est insuffisant.

## Enzymes en solution.

- sous forme d'extraits cellulaires
- sous forme purifiée
- très facile à utiliser, même par un chimiste organicien!
- inconvénients : présence d'agents stabilisateurs exemple glycérol, qu'il faudra éliminer pour purifier le produit d'arrivée.



## Enzymes « solides ».

- enzymes lyophilisées, ajoutées sous forme de poudre dans la réaction, très facile d'utilisation.



## Enzymes immobilisées.

- immobilisation sur un support solide par liaison covalente ou non
- très simple d'utilisation et facilite le traitement de la réaction (simple filtration)
- réutilisation sur plusieurs cycles
- souvent meilleure stabilité
- très bien adapté pour les procédés en continu (applications en industrie).



## Enzymes industrielles

Industries les plus « consommatrices » :

- agro-alimentaire
- textile, cuir
- papier.

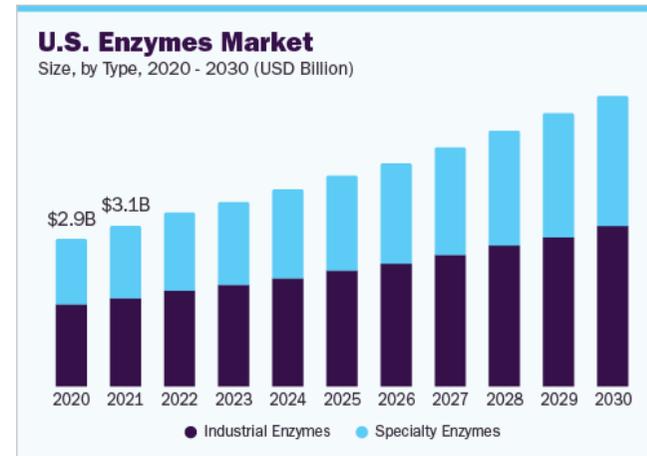


Essentiellement des hydrolases

Biocatalyse ne représente qu'une toute petite part du marché global des enzymes.

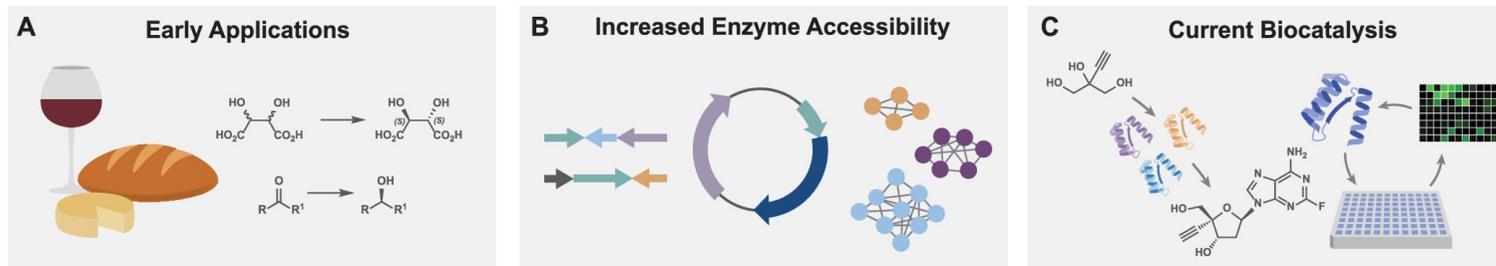
Biocatalyse :

- enzymes commerciales (quand disponibles)
- protéines recombinantes (large accès à la biodiversité).



Produits pharmaceutiques  
Biotechnologie  
Diagnostic  
Biocatalyse

<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>

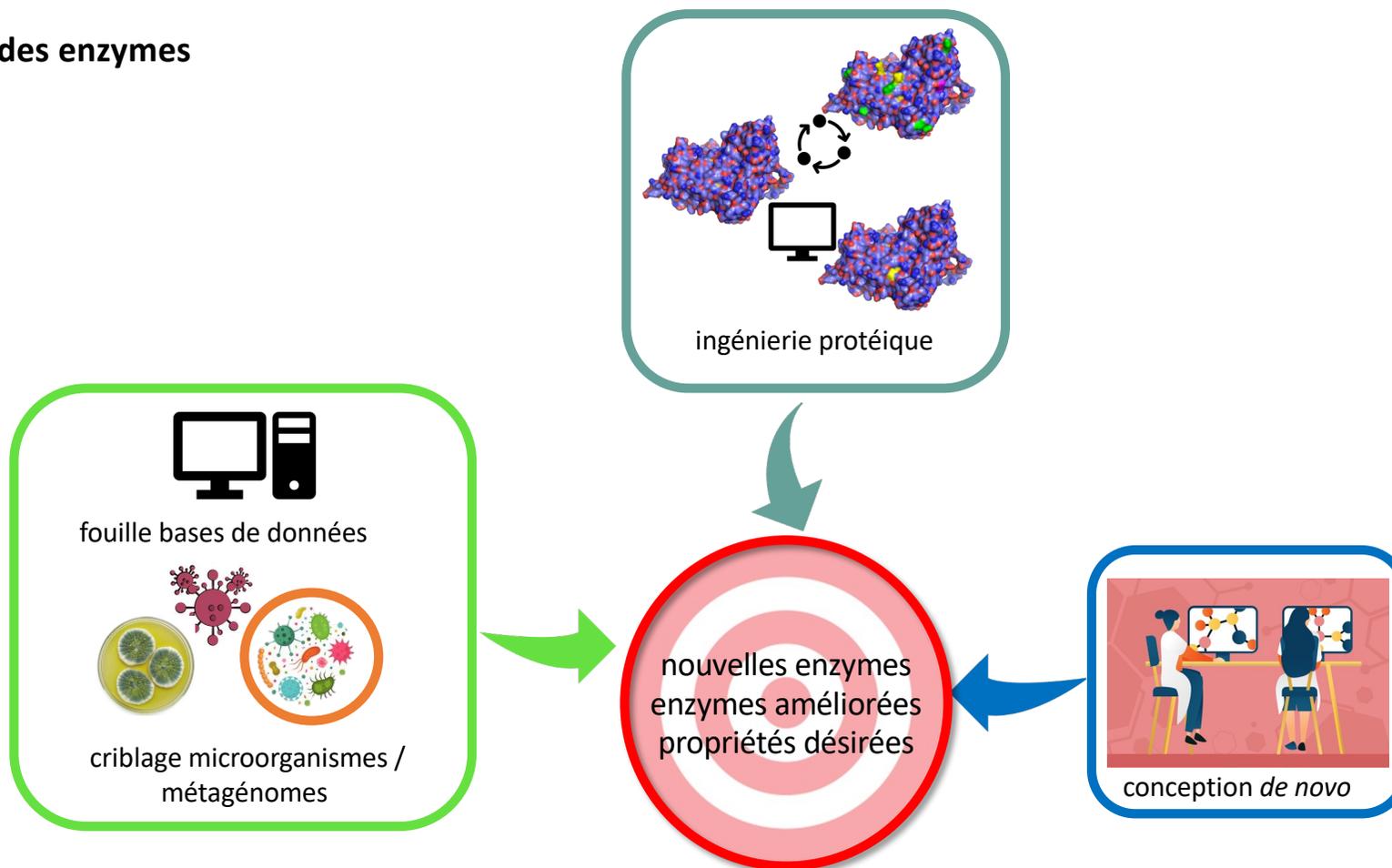


<https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00273>

Accéder à de nouvelles enzymes

Améliorer des enzymes

Concevoir des enzymes



## Accéder à de nouvelles enzymes : criblage biodiversité, recherche *in silico*



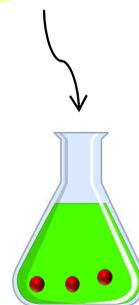
- Approche fonctionnelle

« **Historique** » : criblage systématique pour une activité donnée.

Culture avec substrat source de C / N ou autre.

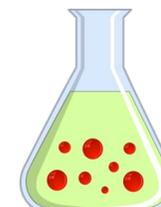


substrat de  
l'activité à tester  
comme source de  
C ou N



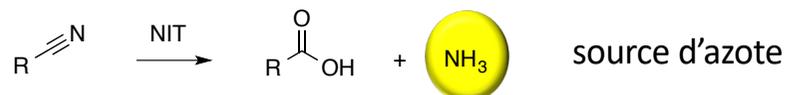
microorganisme  
(bactérie, levure, champignon)

culture



ça pousse =  
le microorganisme possède l'activité  
recherchée!

Exemple : recherche activité nitrilase





- Explorer la biodiversité
- ★ milieux encore non explorés
- ★ milieux riches d'un point de vue «métabolique »
- ★ milieux extrêmes.



intestins des termites



microbiome humain



station d'épuration



milieu marin



pH extrêmes, aridité, basses T, salinité etc...



*Impossibilité d'isoler et de cultiver les microorganismes*



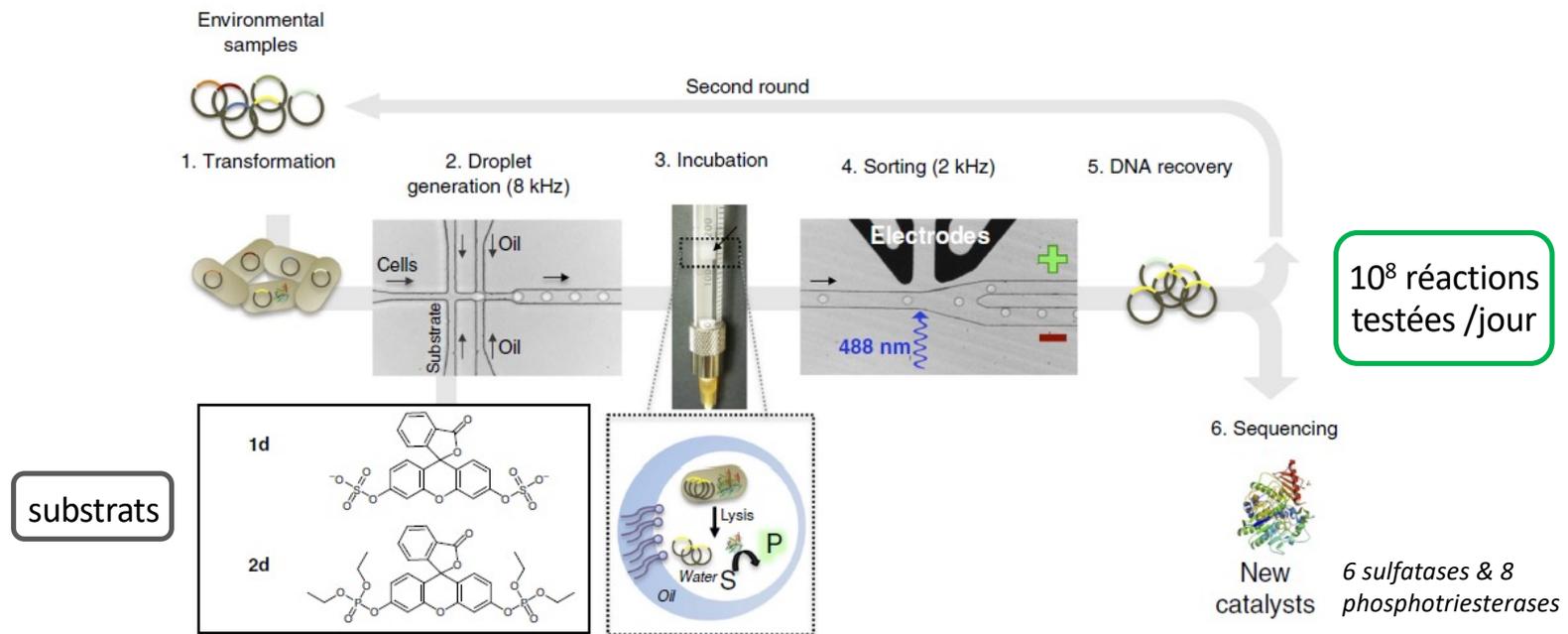
le milieu est récolté « en entier » :  
**métagénomés**, accès à la biodiversité non cultivable



## Métagénomique fonctionnelle

Recherche de nouvelles enzymes hydrolytiques dans eADN (ADN environnemental) de sols et de gusses de vanille.

Technique utilisée : microfluidique de gouttes, gouttes « eau dans huile ».



Avantage : très haut débit  
tests de 1 250 000 variants

Inconvénient : test d'activité, générique / spécifique  
enzymes à large spectre : souvent hydrolases

- Approche *in silico*

Exploration des bases de données bioinformatiques qui recensent les séquences nucléiques (gènes codant pour les enzymes) ou protéiques (enzymes).



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, séquences nucléiques

<http://www.brenda-enzymes.org/>,  
« The comprehensive Enzyme Information System »

<http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>, séquences protéiques,  
information fonctionnelle ; annotation automatique

<http://enzyme.expasy.org/>, séquences protéiques,  
information fonctionnelle : annotation experte (manuelle)

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>,  
structures 3D protéines et acides nucléiques

<https://alphafold.com/> prédiction structure 3D à partir séquence primaire



*Nobel 2024*

David Baker (conception protéines)  
Demis Hassabis & John Jumper (prédiction  
structure protéines, AlphaFold)

Au 22/10/2024 :

248 266 673 protéines « prédites » répertoriées  
572 214 « évaluées » associées à une publication  
226 262 structures expérimentales de protéines ; 1 068 577 modèles de structures

- Approche *in silico* : exploration des génomes

Comparaison de séquences protéiques :



protéine(s) de séquence connue.

BLAST (Basic Local Assignment Search Tool)

MRPLDVTPTISPGAQDLPRTMHFAAEPPLQPLIIDITEEEKLEITYIGKCLKRKYKSYDDPGFISMLHLNAYTLLPERAKVLSNFGTDFSDQQYGAVVLRGLIEIGQDELGPTPRSWQETDHEKIMEYGFISLLHGAVPSKPVEYFAQRKGLMHAIIPDENMSFTQTGSGSRTDLVHTEDAFHLHNAADFLSFLFLRNEERVPTSLYSIRSHGRPDAILQEFKPIYKCPKDANYASEEALGDDIRTSVLYGSRAPMRFDAAEQIYNEDANQDPEALHNLKRFWEEARKLIYNDFVPESGDLIFVNNHLCAHGRNAFLAGFREENGQLVKCERRMLRMMMSKTSLINIREVTHPENPYLIMEEHYGVYSAHLANL



Comparaison entre les séquences protéiques des bases de données



Sélection de séquences +/- identiques  
*par exemple de 30 à 80% d'identité de séquence sur 80% de la longueur*



Gènes à cloner



Production protéines



Tests fonctionnels pour détecter l'activité recherchée



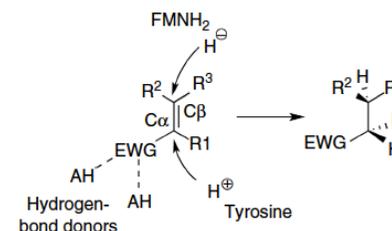




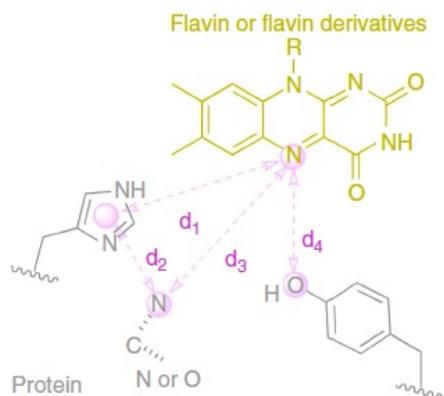
- Approche *in silico* : exploration des génomes
- Identification de catalophore : « constellation de site actif ».

Prédiction d'activités catalytiques basée sur la constellation formée par les groupements fonctionnels des résidus d'un site actif.

Exemple : ene-réductases catalysent la réduction d'une double liaison activée.

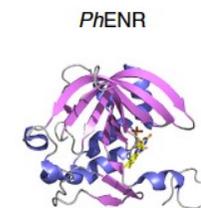
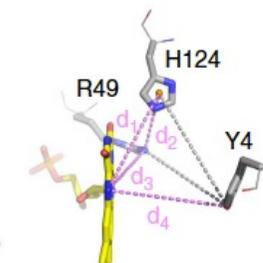
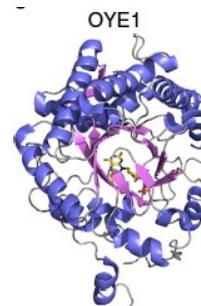
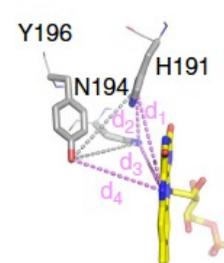


- ★ identification d'un site actif « minimal »



- ★ criblage de la base de données structurales PDB avec ce patron 3D

enzyme de référence

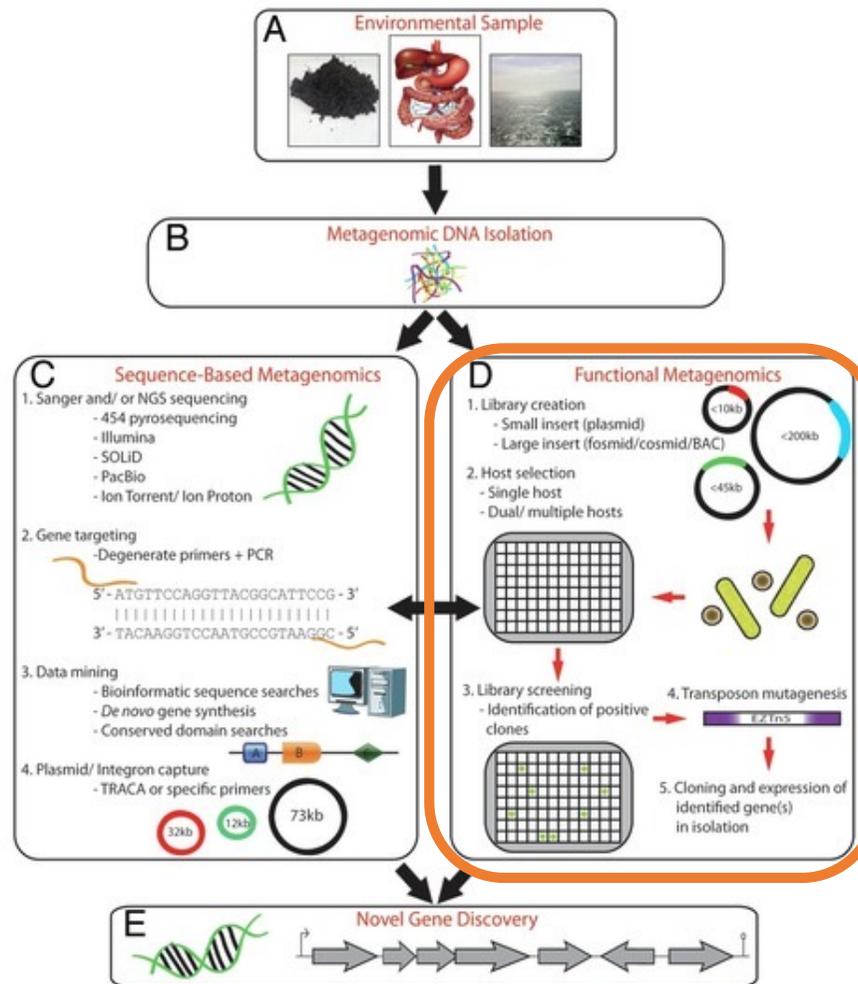


nouvelle enzyme



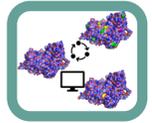
Identification de deux nouvelles enzymes de séquence et structure 3D complètement différentes

- Métagénomique basée sur la séquence : découverte de nouveaux gènes/nouvelles enzymes

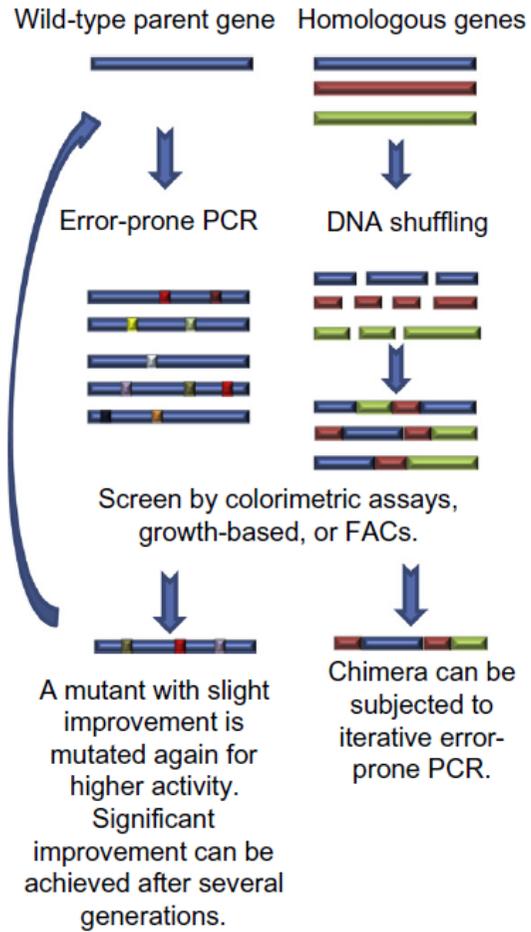


métagénomique  
fonctionnelle

# Améliorer les enzymes existantes

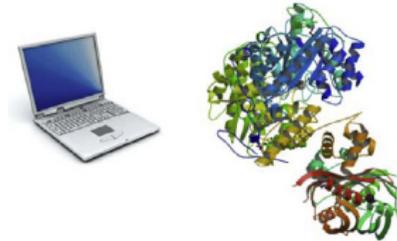


## A. Directed Evolution

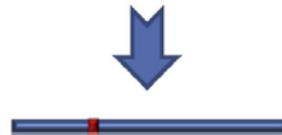


## B. Rational Design

*A priori* structural and mechanistic information of the enzyme is required.



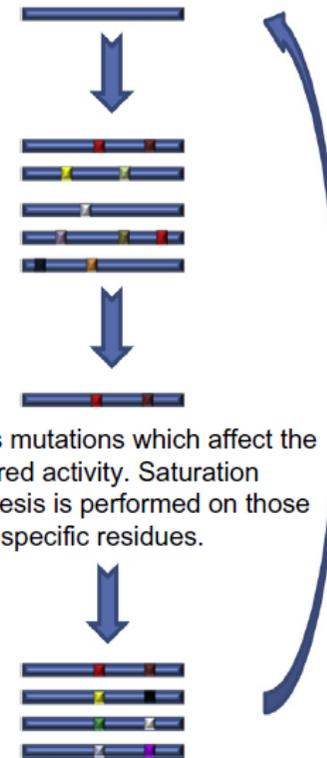
Computer models identify hot spots. Residues can be specifically mutated or subjected to saturation mutagenesis.



This targeted design generally requires less screening efforts.

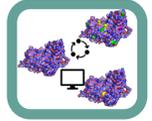
## C. Combined Methods

Strategies to combine the methods vary. One possible combination uses directed evolution to create random diversity.

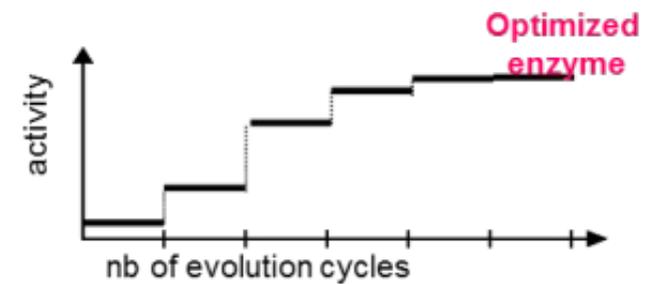
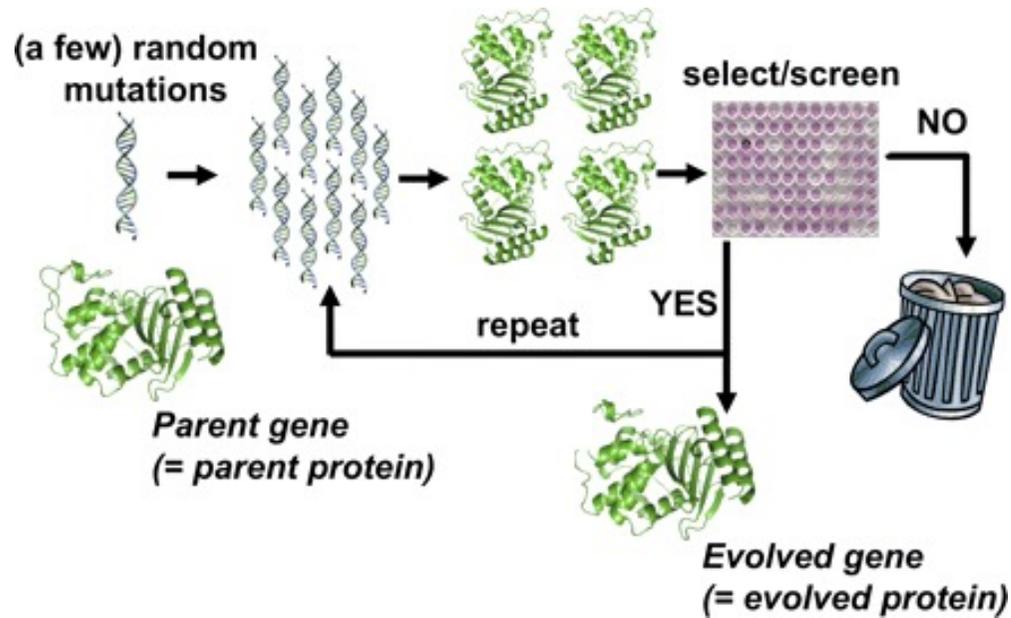


This optimal mutant can be subjected to further error-prone PCR.

- Evolution dirigée.



Processus itératif, jusqu'à obtention d'un « bon » mutant présentant l'amélioration recherchée.



Jesse D. Bloom, and Frances H. Arnold *PNAS* **2009**, *106*, 9995-10000



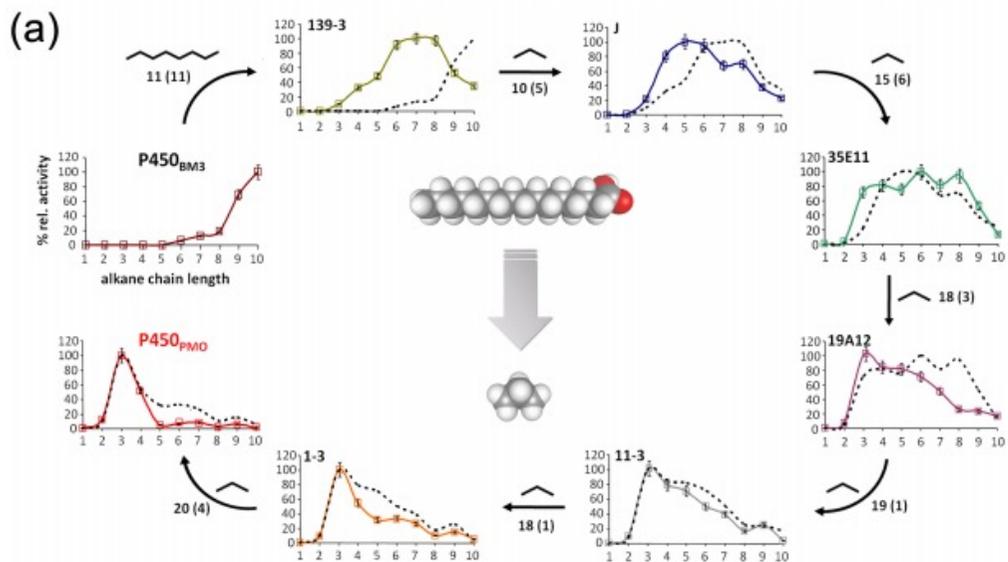
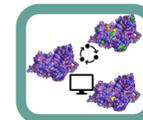
Inconvénients :  
 nombre très important de tests ;  
 processus chronophage ; coûteux.

*Nobel 2018 pour l'évolution dirigée des enzymes*  
 Frances Arnold

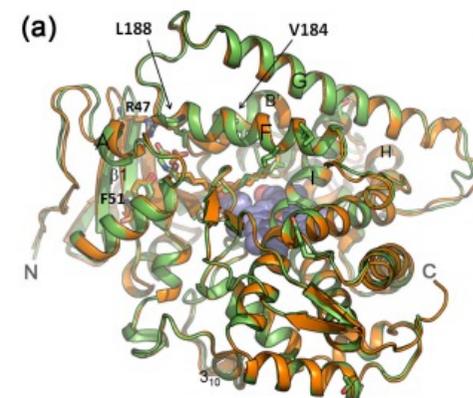
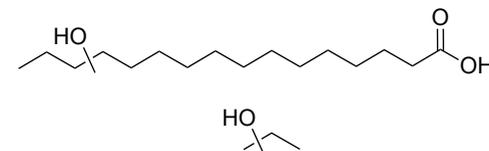


Exemple :

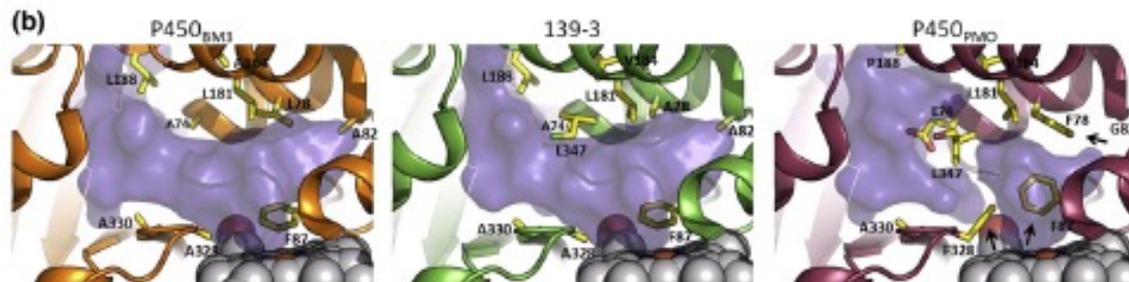
changement de spécificité de substrat, d'un acide gras à longue chaîne (C12-C20) au propane.



Cycles d'évolution approches combinées.

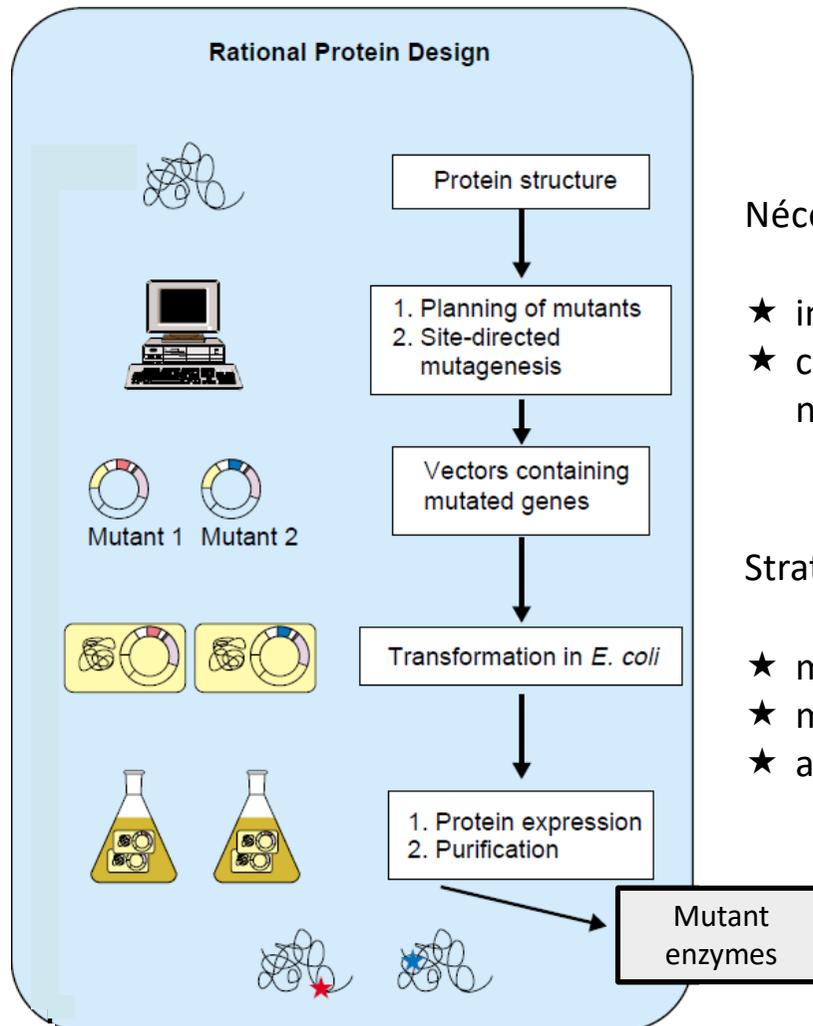
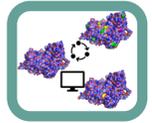


Superposition de la structure du CYP450 BM3 de départ (orange) et de l'intermédiaire 139-3 (vert)



Comparaison des tunnels d'accès

- Conception rationnelle

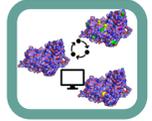


Nécessite :

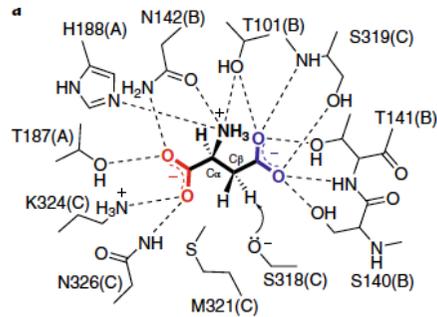
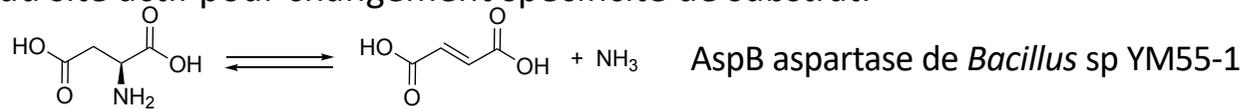
- ★ informations structurales sur l'enzyme
- ★ compréhension du mécanisme réactionnel au niveau moléculaire (modélisation).

Stratégies :

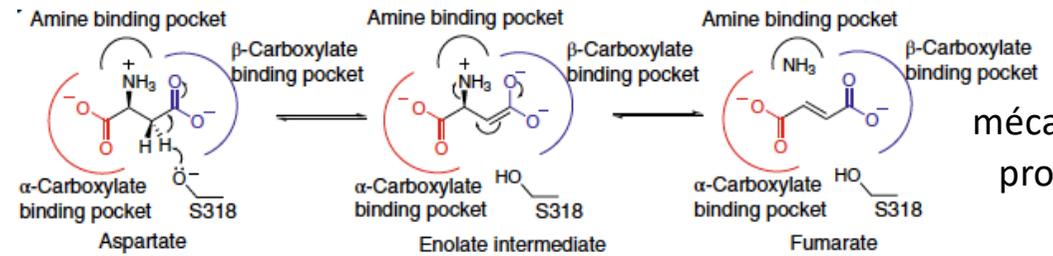
- ★ mutagénèse saturante de site
- ★ mutagénèse dirigée
- ★ assistance par calcul (computational (re) design).



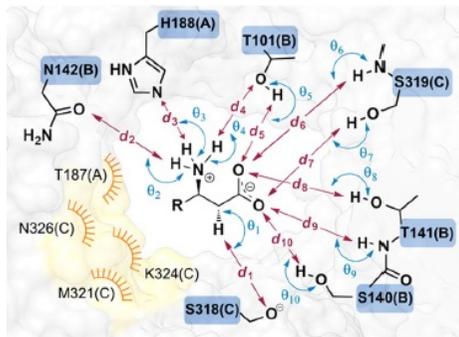
Exemple :  
modification du site actif pour changement spécificité de substrat.



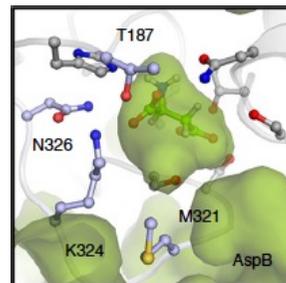
interactions  
enzyme-substrat  
(d'après RX)



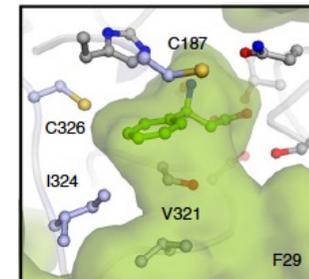
mécanisme  
proposé



contraintes géométriques des  
interactions enzyme-substrat pour  
l'activité catalytique avec des  $\beta$ -  
amino acides

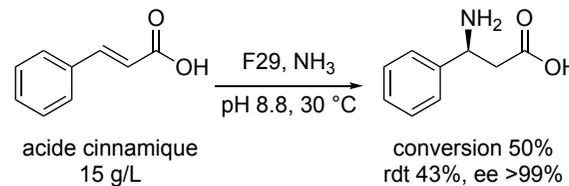


AspB + Asp



modélisation mutant  
F29 +  $\beta$ -Phe  
T187C ; M321V  
K324I ; N326C

computational redesign

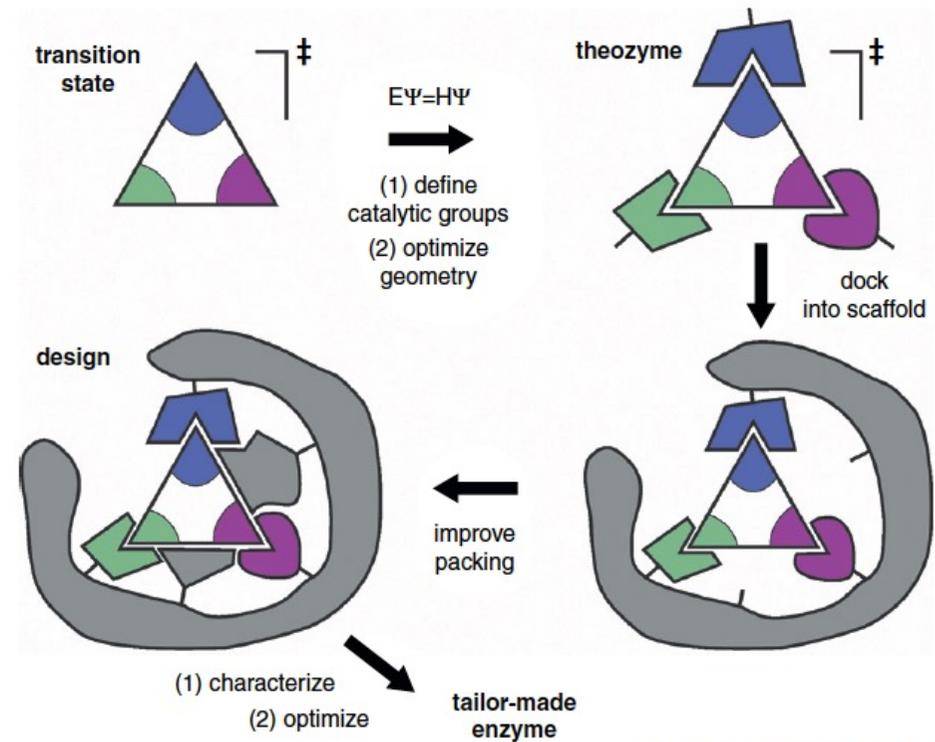


Hydroamination

## Concevoir de nouvelles enzymes



- ★ choisir une réaction et le site actif « idéal » associé à cette transformation
- ★ concevoir *in silico* les sites actifs de l'enzyme présentant toutes les propriétés requises
- ★ trouver une protéine « support » pour insérer le site actif ainsi conçu
- ★ modélisation moléculaire
- ★ tests fonctionnels.





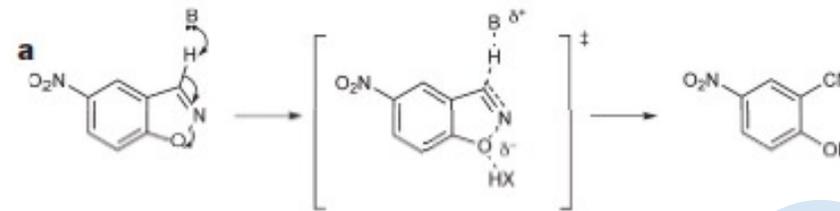
## Conception *in silico*

Élimination de Kemp

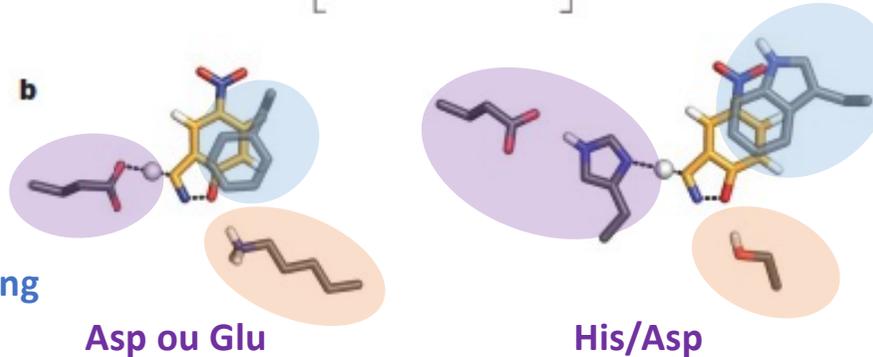


Réaction non naturelle ; réaction modèle pour transfert de proton à partir de C

↳ Déprotonation C par base



↳ Choix de la **base catalytique** :  
carboxylate Asp ou Glu  
diade : His + Asp ou Glu



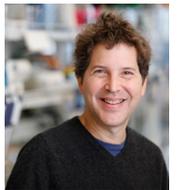
Stabilisation ET résidu  $\pi$ -stacking

Résidu donneur liaison H

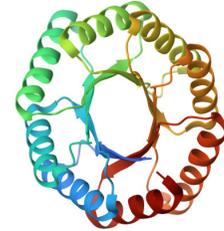
↳ Recherche structure protéique capable de supporter les constructions :  
env 100 000 possibilités

*Nobel 2024 pour design  
computational protéines*

David Baker



## Conception *in silico*

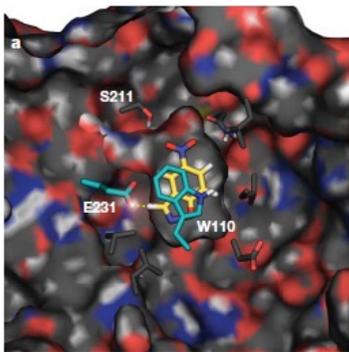


Minimisation : optimisation géométrie ET, redesign résidus autour ET (RosettaMatch)  
NB : majorité de TIM barrel (tonneau alpha/beta), augmentation au cours process

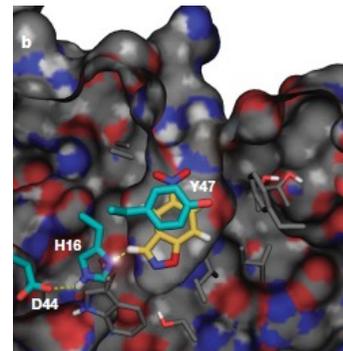
Sélection pour test expérimental de 59 designs dans 17 scaffolds :  
39 Asp ou Glu et 20 diade His/Asp ou Glu

Activité mesurable pour 8 ; NB mutation base catalytique supprime activité

Les deux plus actives : KE59 et KE70



KE59 : 3GP synthase *Sulfolobus solfataricus*, TIM barrel, Glu231 comme base catalytique, Trp110  $\pi$ -stacking, Ser211 liaison H



KE70 : DP ald olase *E coli*, TIM barrel, diade His16 Asp34, Tyr47  $\pi$ -stacking

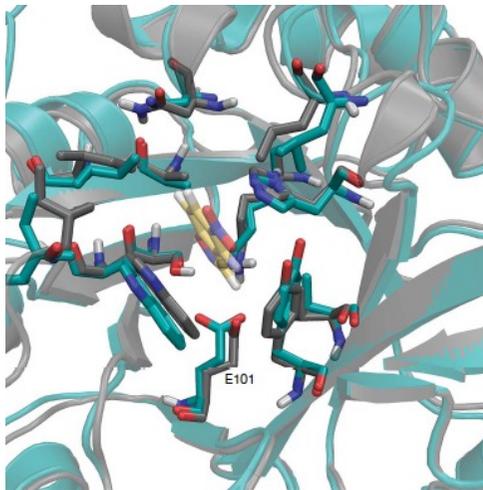
## Conception *in silico*



➤ Evolution dirigée sur un des designs pour lequel structure a été déterminée par RX, KE07

➤ 7 tours de mutations aléatoires / DNA shuffling : augmentation > 200 fois  $k_{\text{cat}}/K_M$

➤ Mutations sur positions adjacentes aux positions clés : « fine tuning » de l'enzyme



Comparaison de la structure cristallisée du design KE07 et du modèle :  
structure en cyan, dans état sans substrat  
modèle en gris avec ET (jaune)



## Conception *in silico*, autre approche

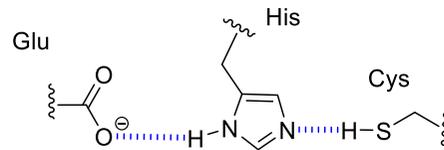
Biocatalyseur entièrement *de novo* :

- structure protéique
- activité catalytique.



- « contrôle » de tous les résidus
- fonction dans conditions différentes.

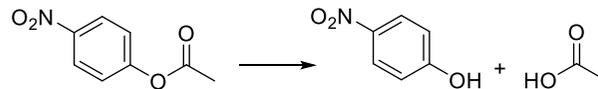
Exemple : réaction d'hydrolyse.



triade catalytique  
Cys-His-Glu.

Stratégie : construction d'une spirale enroulée constituée d'un heptamère de 7 hélices  $\alpha$  en tonneau et « installation » de la triade dans le lumen de l'heptamère par mutations sur positions adéquates.

Test fonctionnel :



Efficacité catalytique ~ hydrolases naturelles



Dépassement du modèle standard de conception d'enzymes axé uniquement sur la chimie des sites actifs.

