



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE (UL)

École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA)

École Doctorale Ressources, Procédés, Produits et Environnement (RP2E)

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP)

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 15 décembre 2017

Par

Léna Dettori

En vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention Génie des Procédés et des Produits

Sujet

**APPROCHE MULTI-ECHELLE POUR L'ÉTUDE DE LA REACTION DE N-ACYLATION
ENZYMATIQUE D'ACIDES AMINÉS**

Membres du jury

Rapporteurs	Mme Isabelle André	Directrice de recherche, LISBP-INSA, Toulouse
	Mme Catherine Sarazin	Professeur, Université de Picardie, GEC, Amiens
Examineurs	Mr Éric Dubreucq	Professeur, SupAgro, Montpellier
	Mr Jérôme Guilbot	Responsable innovation & développement, SEPPIC, Castre
	Mme Catherine Humeau	Professeur, UL, LRGP, Nancy
	Mr Stéphane Delaunay	Professeur, UL, LRGP, Nancy
Directrice	Mme Isabelle Chevalot	Professeur, UL, LRGP, Nancy
Co-directeur	Mr Yann Guiavarc'h	Maitre de conférences, UL, LRGP, Nancy

À mon père.

Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été menés au sein de l'équipe BioProMo du laboratoire des réactions et génies des procédés (LRGP). Je souhaite donc remercier M. Laurent Falk directeur du LRGP de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je remercie les membres du jury Isabelle André et Catherine Sarazin d'avoir accepté de juger et d'évaluer ce travail en tant que rapportrices ainsi qu'Eric Dubreucq et Jérôme Guilbot pour avoir accepté d'examiner ces travaux.

Je souhaite également remercier toutes les personnes ayant contribué au bon déroulement de ces trois années de thèse. Tout d'abord des remerciements particuliers à Isabelle Chevalot, (directrice de thèse), Yann Guiavarc'h, (co-directeur) ainsi qu'à Stéphane Delaunay et Catherine Humeau, merci infiniment à vous quatre pour votre présence, vos conseils et votre gentillesse. Merci à Xavier pour ton soutien bien au-delà du travail.

Merci aux personnes avec qui nous avons collaboré. Je pense notamment à Cédric pour les analyses, Jean-Luc, Francois, Armand et Philippe pour l'immobilisation des enzymes ainsi qu'à Christian pour les calculs d'énergie.

Je n'aurai pu mener à bien ces travaux sans la présence et le soutien moral de mes collègues et amis du laboratoire. Je suis très heureuse de vous avoir rencontré. Tout d'abord les anciens : Karim, Céline.M, Alice, Pierrick pour votre accueil et soutient lors de ce début de thèse.

Merci à mes deux amies Céline.L et Mengyao pour les soirées wii dance et autres fondues chinoises qui ont servi de défouloir dans les moments critiques, vous avez été d'un grand soutien et je vous souhaite bon courage à toutes les deux.

Merci à Eric, Fabrice, Manu et Arnaud pour tous les bons moments passés ensemble.

Merci à Amani pour ta gentillesse et ton soutien dans les moments de démotivation, tu es un ange, Manelle, j'ai passé de super moments avec toi, comme lors de notre petit voyage à Evian-les-Bains, Caroline pour ta gentillesse, ta douceur et les bouteilles de vin, Chafik pour ton soutien, Felipe pour les câlins et les cosquillas, Julien à quand la prochaine soirée cocktails ?, j'espère que nous garderons contact.

Un immense merci à Aline, sans toi, ton rire, tes blagues, ta bonne humeur et tes conseils, ça n'aurait pas été pareil.

Je vais finir par remercier tous mes proches, ma mère, mon frère et mes amis sans qui tout n'aurait que peu de sens et évidemment Olivier pour m'avoir épaulé, consolé et encouragé toutes ces années.

Sommaire

Introduction générale.....	1
Chapitre1 : Étude bibliographique	5
1. Acylation d'acide aminés et peptides.....	5
1.1. Avantages.....	6
1.1.1. Propriété de surface.....	6
1.1.2. Biodisponibilité.....	7
1.1.3. Modulation des activités biologiques.....	8
1.2. Inconvénients	9
1.3. Stratégie de synthèse des acides aminés et de peptides acylés	10
1.3.1. Synthèse chimique.....	10
1.3.2. Synthèse enzymatique.....	11
1.3.3. Synthèse chimio-enzymatique.....	12
2. Étude multi-échelle du procédé d'acylation enzymatique	13
2.1. Échelle réactionnelle	14
2.1.1. Enzymes catalysant la réaction d'acylation en milieu non-aqueux.....	14
2.1.2. Paramètres influençant les réactions en milieu non-aqueux	15
2.1.2.1. La nature du milieu.....	15
2.1.2.2. Influence de la teneur en eau.....	21
2.1.2.3. Influence de l'état d'ionisation.....	23
2.1.2.4. Impact de la température	24
2.1.2.5. Influence des substrats.....	25
2.1.3. Enzymes catalysant la réaction d'acylation en milieu aqueux.....	28
2.1.3.1. Mécanisme enzymatique des aminoacylases.....	30
2.1.3.2. La recherche de nouveaux biocatalyseurs : les aminoacylases de <i>Streptomyces mobaraensis</i>	33
2.1.3.3. Paramètres influençant les réactions enzymatiques en milieu aqueux.....	37

2.2.	Échelle moléculaire : les principales approches de modélisation moléculaire	40
2.2.1.	Structure de CALB.....	40
2.2.2.	La mécanique moléculaire	42
2.2.3.	Docking moléculaire	44
2.2.4.	Dynamique moléculaire	47
2.2.5.	Mécanique quantique	49
2.2.6.	Méthodes hybrides : mécanique quantique/mécanique moléculaire (QM/MM) :	54
2.3.	Échelle du procédé	56
2.3.1.	Immobilisation d'enzymes	56
2.3.1.1.	Les différentes techniques et matériaux utilisés pour l'immobilisation d'enzymes.....	58
2.3.1.2.	Paramètres influençant l'immobilisation enzymatique	69
2.3.2.	Influence du type de réacteur	71
2.3.2.1.	Influence du mode de chauffage : les réacteurs micro-ondes.....	71
2.3.2.2.	Influence de l'hydrodynamique.....	75
Chapitre 2 : Matériels et méthodes.....		77
1.	Étude théorique : modélisation moléculaire.....	77
1.1.	Outils informatiques.....	77
1.2.	Simulations de docking flexible.....	77
1.2.1.	Construction des structures	77
1.2.1.1.	Structure des ligands.....	77
1.2.1.2.	Structure de CALB et de l'acyl-CALB	77
1.2.2.	Définition du site actif.....	78
1.2.3.	Simulation de docking.....	79
1.2.3.1.	Algorithme de docking rigide.....	80
1.2.3.2.	Algorithme de docking flexible.....	82
1.2.4.	Analyse des résultats	84

1.2.4.1.	Critères de distance.....	84
1.2.4.2.	Énergie d'interaction électrostatique.....	85
2.	Étude expérimentale.....	86
2.1.	Production des aminoacylases.....	86
2.1.1.	Souches utilisées.....	86
2.1.2.	Obtention du quadruple mutant <i>S. ambofaciens</i> Δ SAM23877_1485::scar..	86
2.1.3.	Milieux de culture et conditions de production de l'extrait protéique.....	89
2.1.4.	Traitement des surnageant de culture.....	90
2.1.4.1.	Lyse des cellules.....	90
2.1.4.2.	Précipitation des protéines.....	90
2.1.4.3.	Dialyse et diafiltration.....	90
2.1.4.4.	Concentration des protéines.....	91
2.2.	Immobilisation des aminoacylases de <i>S. ambofaciens</i>	91
2.2.1.	Synthèse de SBA-15 (Santa Barbara amorphous 15).....	91
2.2.2.	Fonctionnalisation du SBA-15.....	94
2.3.	Mise en œuvre des réactions enzymatiques.....	96
2.3.1.	Types de réacteurs.....	96
2.3.1.1.	Réacteur agité mécaniquement, chauffage conventionnel.....	96
2.3.1.2.	Réacteur agité mécaniquement, chauffage micro-onde.....	97
2.3.1.3.	Réacteur micro-fluidique, chauffage conventionnel.....	97
2.3.2.	Réactifs.....	98
2.3.3.	Hydrolyse enzymatique.....	99
2.3.4.	Synthèse enzymatique.....	99
2.3.4.1.	En milieu aqueux en réacteur agité et micro-fluidique.....	99
2.3.4.2.	En solvant organique en réacteur agité.....	99
2.4.	Méthodes analytiques.....	100
2.4.1.	Réactifs et solvants.....	100

2.4.2.	Chromatographie sur couche mince	101
2.4.3.	Dosage acide aminé.....	101
2.4.4.	Dosage et étude structurale des acide gras et produits acylés	103
2.4.5.	Dosages des protéines	105
2.4.5.1.	Bradford.....	105
2.4.5.2.	BCA.....	105
2.4.6.	Détermination d'activité enzymatique	106
2.4.7.	Détermination d'un facteur d'efficacité relative	106
Chapitre 3 : Étude de l'acylation enzymatique de la lysine à l'échelle moléculaire.....		108
1.	Introduction	108
2.	Choix du protocole de docking	109
3.	Acylation de la lysine catalysée par CALB : Étude expérimentale et théorique de la régiosélectivité	112
3.1.	Abstract	115
3.2.	Introduction	116
3.3.	Materials and methods	117
3.3.1.	Enzymatic reactions	117
3.3.1.1.	Chemicals and enzyme	117
3.3.1.2.	Syntheses	118
3.3.1.3.	Analysis of reaction media	118
3.3.2.	Molecular modeling simulations	119
3.3.2.1.	Computational resources	119
3.3.2.2.	Lysine construction	119
3.3.2.3.	Acyl-enzyme construction.....	119
3.3.2.4.	Flexible Docking protocol.....	120
3.3.2.5.	Analysis of docking results	121
3.4.	Results and discussion.....	123

3.4.1.	Study of lysine binding modes within CALB	123
3.4.1.1.	Flexible Docking results.....	123
3.4.1.2.	Experimental validation.....	126
3.4.2.	Energetical analysis of poses.....	128
3.4.2.1.	C-DOCKER interaction energy.....	128
3.4.2.2.	Electrostatic interaction energy	128
3.4.3.	Molecular rules for selectivity.....	131
3.5.	Conclusion.....	133
3.6.	Contribution de l'article	135
4.	Résultats complémentaires	137
5.	Conclusions du chapitre	145
Chapitre 4 : Étude de l'acylation à l'échelle réactionnelle.....		147
1.	Introduction	147
2.	Recherche de biocatalyseurs originaux pour l'acylation d'acides aminés et de peptides 147	
2.1.	Practical application	150
2.2.	Abstract	150
2.3.	Introduction	150
2.4.	Materials and methods	152
2.4.1.	Bacterial strains and plasmids	152
2.4.2.	DNA manipulation	152
2.4.3.	In-frame deletion of genes encoding acylase in <i>S. ambofaciens</i>	154
2.4.4.	Media and culture conditions for aminoacylase production	154
2.4.5.	Preparation of enzyme solution.....	157
2.4.6.	Enzyme assays.....	157
2.4.7.	Analysis of the reaction media	158
2.5.	Results and discussion.....	159

2.5.1.	Research for an aminoacylase activity in a crude extract of <i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC23877	159
2.5.2.	Partial purification of amino acylases from <i>S. ambofaciens</i> ATCC23877	165
2.5.3.	Analysis of the <i>S. ambofaciens</i> ATCC23877 genes encoding acylase	166
2.5.4.	Partial purification and research for a SAM23877_1485 and SAM23877_1734 specific activity	168
2.6.	Contribution de l'article	172
3.	Résultats complémentaires	174
3.1.	Impact de la longueur de la chaîne du donneur d'acyle sur la régiosélectivité de la réaction d'acylation	174
3.2.	Impact de la nature du biocatalyseur sur les performances de la réaction	177
3.3.	Impact de la longueur de chaîne carbonée du donneur d'acyle sur les performances de la réaction catalysée par CALB	178
3.4.	Impact de la nature du substrat accepteur d'acyle.....	183
4.	Conclusion générale	188
Chapitre 5 : Étude de l'acylation enzymatique à l'échelle du procédé		190
1.	Introduction	190
2.	Immobilisation d'un mélange d'aminocyclases de <i>S. ambofaciens</i> sur un matériau mésoporeux silicaté	190
2.1.	Abstract	193
2.2.	Introduction	193
2.3.	Materials and methods	197
2.3.1.	Aminocyclases of <i>S. ambofaciens</i> production.....	197
2.3.2.	Support preparation	198
2.3.3.	Adsorption of aminocyclases of <i>S. ambofaciens</i>	200
2.3.4.	Characterization of the materials.....	200
2.3.5.	Enzyme activity assays, stability and reusability	201
2.3.6.	Analysis of the reaction media	203

2.4.	Results and discussion.....	204
2.4.1.	Chemisorption of aminoacylases: supports characterization and hydrolysis activity	204
2.4.2.	Physisorption of aminoacylases: supports characterization and hydrolysis activity	210
2.4.3.	Synthesis of lauroyl-lysine	214
2.5.	Conclusion.....	217
2.6.	Acknowledgement.....	217
2.7.	Contribution de cet article	218
3.	Intensification du procédé d'acylation en réacteur micro-onde ou micro-fluidique	219
3.1.	Influence du mode de chauffage : conventionnel & microonde : CALB en solvant organique.....	219
3.2.	Influence du mode de chauffage : aminoacylases en milieu aqueux	223
3.3.	Influence du mode d'agitation.....	225
4.	Conclusion du chapitre.....	228
	Conclusion générale	230
	Références	239
	Annexes.....	256

Liste des figures et tableaux du chapitre 1 : étude bibliographique

Figure 1.1: Structure des tensioactifs : mono- et di-acyl glycerol acides aminés (E : acide glutamique ; R : arginine).....	9
Figure 1.2 : Acylation chimique d'une fonction amine par la réaction de Schotten Baumann	10
Figure 1.3: Représentation spatiale et temporelle des multiples échelles du procédé d'acylation enzymatique	13
Figure 1.4: Schéma de la réaction d'acylation catalysé par une enzyme	14
Figure 1.5: Diagramme de phase du dioxyde de carbone	17
Figure 1.6: Influence de l'activité thermodynamique de l'eau, a_w , (1) sur l'énantiosélectivité de la lipase B de <i>Candida antarctica</i> pour l'acylation du pentan-2-ol (▲) et de l'hexan-3-ol (□) A du butan-2-ol (○) et de l'octan-4-ol (◆) B avec le méthyl propanoate comme donneur d'acyle. (2) sur l'activité acyltransferase L'échelle de droite se réfère à l'octan-4-ol.....	23
Figure 1.7 : Mécanisme catalytique de la pénicilline acylase (Duggleby et al., 1995).....	31
Figure 1.8 : Mécanisme catalytique des metalloprotéases (Hernick and Fierke, 2005).....	32
Figure 1.9 Mécanisme catalytique des hydrolases binucléaires (2Zinc) en utilisant (A) GABC bifonctionnel ou (B) paire de GABC (Hernick and Fierke, 2005).....	32
Figure 1.10 : Structure des substrats de la pénicilline acylase de <i>S. mobaraensis</i> . La flèche indique la liaison amide de chaque substrat (Zhang et al., 2007)	36
Figure 1.11: Diagramme de la structure secondaire de CALB. Les résidus catalytiques sont indiqués en jaune. Les feuilletts β et les helices α sont représentés respectivement par des flèches grises et des cylindres roses (Stauch et al., 2015).....	41
Figure 1.12: Principe de l'optimisation géométrique « statique » : à partir des coordonnées atomiques de la conformation de départ, l'algorithme retrouve des minima locaux les plus proches jusqu'à obtenir la conformation la plus stable possible qui correspond à l'énergie la plus basse.....	44
Figure 1.13: Critères de distance devant être respectés pour qu'une pose soit considérée comme productive, c'est-à-dire conduisant à la formation d'un produit. Cas de CALB.....	46
Figure 1.14: Les résidus Asp145 et Lys290 en conformation ouverte (A) et en conformation fermée (B). Représentation de la surface de CALB en conformation ouverte (C) et conformation fermée (D) (Stauch et al., 2015).	49
Figure 1.15: Mécanisme de proton navette (Syren et al., 2013)	52

Figure 1.16: Mécanisme d'acylation catalysé par la triade catalytique de CALB selon le model bi-bi ping-pong: A) conformation native et approche du substrat donneur d'acyle ; B) premier intermédiaire tétraédrique ; C) relargage de l'alcool et formation de l'acyl-enzyme ; D) approche de l'accepteur d'acyle ; E) formation du second intermédiaire tétraédrique ; F) relargage du produit et retour à la conformation initiale de l'enzyme	53
Figure 1.17: Proposition de mécanisme d'action de CALB pour une réaction de N-acylation (González-Sabín et al., 2006).....	54
Figure 1.18: Illustration de l'approche mixte mécaniquemoléculaire/mécanique quantique (QM/MM) (Groenhof, 2013).....	54
Figure 1.19: Shéma représentatif des principales techniques d'immobilisation d'enzyme	58
Figure 1.20: Activité spécifique de CALB (A) et TLL (B) libres ou encapsulées (Falkeborg et al., 2015).....	62
Figure 1.21: Activité enzymatique de TLL libre et lors de recyclage de TLL encapsulée dans des billes d'alginate simple (TLL-alg) ou fonctionnalisées (TLL-alg-SAC12) (Falkeborg et al., 2015).....	62
Figure 1.22: Échelle de taille des pores.....	64
Figure 1.23: Pourcentage de conversions obtenues pour la réaction d'estérification de l'acide oléique par le butanol. (a) ○ : [C-CR-lipase]@ g Glymo-Si(HIPE) ; et ■ : lipase <i>Candida rugosa</i> libre. b) Pourcentage de conversion obtenu sur plusieurs cycles, ○ : [C-CR-lipase]@ g Glymo-Si(HIPE) et Δ : [C-CR-lipase]@Si(HIPE) (Brun et al., 2010).	67
Figure 1.24: Effet du pH a) et de la température sur l'activité relative de lipases libre (■) ou immobilisé sur Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ (●) ; c) Stabilité thermique des lipases immobilisées à 50 (■) ou 70°C (●) ou libre à 50 (▲) ou 70°C (▼) (Liu et al., 2014).	68
Figure 1.25: Effet de la température de la réaction catalysée par la lipase libre ou immobilisée MWNT-lipase (Ji et al., 2010).	69
Figure 1.26: Comparaison des gradients de températures lors d'un chauffage par micro-ondes et ceux par chauffage avec un bain d'huile : après 1 min d'irradiation par micro-ondes (à gauche) et traitement dans un bain d'huile (à droite) (Kappe, 2004).	72
Figure 1.27: Comparaison des taux de conversion de la réaction de transestérification du 1,2-propanediol avec le carbonate de diméthyle pour la synthèse de carbonate de propylène par la lipase B, en réacteur conventionnel et en réacteur micro-ondes (Yadav et al., 2015).	74
Figure 1.28: Conceptions externes et internes pour les réacteurs Corning, Chart et Nitech (Elgue et al., 2013).....	76

Tableau 1.1: Exemples de peptides et acides aminés bioactifs	5
Tableau 1.2: Constantes de spécificité de l'estérification de différents acides gras à 30°C et 50 C en présence de 0.125 U de CALB (Vaysse et al., 2002)	26
Tableau 1.3: Acylation enzymatique en milieu non-aqueux.....	27
Tableau 1.4: Classification de quelques aminoacylases (LC= longue chaîne)	29
Tableau 1.5 : Classification des métalloprotéases (Rawlings and Barrett, 2013)	33
Tableau 1.6: Caractéristiques des aminoacylases de <i>S. mobaraensis</i>	33
Tableau 1.7 : Rendement de synthèse de L-lysine α -acylée avec différents dérivés d'acide férulique utilisés comme donneurs d'acyle après 48h de réaction (Koreishi et al., 2005a).....	34
Tableau 1.8: Rendement de synthèse de la lysine en N-acyl-lysine catalysé par Sm-eLA (Koreishi et al., 2005b).....	35
Tableau 1.9 : Spécificité de substrat de Sm-AA recombinant (Koreishi et al., 2009b)	37
Tableau 1.10: Activité spécifique d'hydrolyse de Sm-AA pour différents substrats à base de méthionine (Koreishi et al., 2009b).....	37
Tableau 1.11 : Acylation en milieu aqueux.....	39
Tableau 1.12 : Constantes catalytique de N- et O-acylation d'aminoalcools avec l'acide myristique catalysée par CALB (Syren et al., 2013).....	51
Tableau 1.13: Exemples d'immobilisation de lipases avec différentes techniques et supports	57
Tableau 1.14: Activité de lipases (CALB et palatase) multi-CLEA avec et sans BSA (Mahmod et al., 2015).....	63
Tableau 1.15: Avantages et inconvénients des différentes techniques d'immobilisation (Eş et al., 2015).....	64
Tableau 1.16: Recyclage de CALB (Novozym 435) lors de la résolution cinétique de p-chloro-acétate de mandelonitrile (Hanefeld et al., 2009)	65
Tableau 1.17: Paramètres à prendre en compte lors de l'immobilisation d'enzyme (Hanefeld et al., 2009).....	70
Tableau 1.18: Effet des irradiations micro-ondes sur l'activité enzymatique en milieux aqueux (Zhao, 2010).....	75

Liste des figures et tableaux du chapitre 2 : matériels et méthodes

Figure 2.1: Schéma représentant les étapes de la recherche de cavité au sein d'une grille tridimensionnelle avec espacement de 0,5 Å : (A) détermination des espaces occupés par la protéine et des espaces vides, (B) élimination progressive des points jusqu'à atteindre la zone souhaitée (Venkatachalam et al., 2003).	79
Figure 2.2: Organigramme des étapes principales suivies par l'algorithme de docking LigandFit	80
Figure 2.3: Représentation des 4 orientations (a, b et c) selon lesquelles le ligand est placé dans la cavité du récepteur. représentation des 4 positionnements générés pour un ligand donné (a', b' et c') (Venkatachalam et al., 2003)	81
Figure 2.4: Protocole de docking flexible issu de l'étude de Koska (2008). Protocole en trois étapes : génération des conformations des chaînes latérales des résidus flexibles de la protéine ; génération des conformations de ligand et placement des ligands rigides dans chaque cavités ; flexibilité des chaînes latérales affinements en présence du ligand	82
Figure 2.5: Stratégie de parallélisation appliquée lors du protocole Flexible Docking (Koska et al., 2008)	84
Figure 2.6: Critères de distance pour une réaction d'acylation efficace, catalysée par CALB	85
Figure 2.7: a) Synthèse SBA-15, b) Image MET d'une SBA-15	92
Figure 2.8: Isotherme d'adsorption d'une SBA-15 avec en insert la distribution du diamètre moyen des pores ; Surface spécifique = 877 m ² /g ; volume poreux = 1,1 cm ³ /g ; diamètre des pores = 9,8 nm	92
Figure 2.9: Diffractogramme SAXS d'une silice de type SBA-15 ; Distance de Bragg d = 10,9 nm ; paramètre de maille a = 12,6 nm	93
Figure 2.10: Spectre infrarouge d'une SBA-15	93
Figure 2.11: Physisorption d'acylase sur SBA-15	94
Figure 2.12: Fonctionnalisation de SBA-15 par un groupement glutaraldéhyde	94
Figure 2.13: Réacteurs enzymatiques utilisés au cours de ce travail. (A) réacteur Carousel 12 Plus Reaction Station™ (B) réacteur Multiwave 3000 SOLV Anton Paar (C) réacteur Corning®Advanced-Flow™ Reactors LF.	96
Figure 2.14: Schéma du montage utilisé pour réaliser les réactions de synthèse en réacteur micro-fluidique : 1 : bain d'huile chauffé par l'intermédiaire d'un plaque chauffante ; 2 :	

pompes ; 3 : plaques micro-fluidiques ; 4 : bain marie. A : tube à vis agité et thermostaté contenant le milieu réactionnel sans enzyme et B : tube à vis pour les réactions agitées mécaniquement.....	97
Figure 2.15: Schéma de la chaîne HLPC pour le dosage des acides aminés	101
Figure 2.16: Réaction de dérivation des acides aminés par l'OPA	102
Figure 2.17: Schéma des constituants d'un spectromètre de masse et détails sur la chambre de collision (Husson, 2008)	104
Tableau 2.1: Liste des souches, BAC et plasmides utilisées pour l'obtention du mutant Δ SAM23877_1485::scar Δ SAM23877_1734::scar Δ SAM23877_0977::scar Δ SAM23877_6191::scar	87
Tableau 2.2: Liste des amorces utilisées pour l'obtention du mutant Δ SAM23877_1485::scar Δ SAM23877_1734::scar Δ SAM23877_0977::scar Δ SAM23877_6191::scar.	88
Tableau 2.3: Compositions des milieux de cultures utilisés lors de la production du mélange d'aminocyclases par <i>S. ambofaciens</i>	89
Tableau 2.4: Différents produits utilisés pour réaliser les réactions enzymatiques :	98
Tableau 2.5: Différents produits utilisés pour réaliser les réactions enzymatiques :	100
Tableau 2.6: Composition des réactifs de dérivation.....	102
Tableau 2.7: (A) Composition des phases mobiles pour le dosage des acides aminés ; (B) gradients de phases mobiles pour le dosage des acides aminés	103
Tableau 2.8: (A) Composition des phases mobiles pour la séparation et le dosage des substrats et produits d'acylation ; (B) gradients de phases mobiles pour la séparation et le dosage des substrats et produits d'acylation.....	104
Tableau 2.9: Paramètres de l'analyse par spectrométrie de masse	105
Tableau 2.10: Composition des réactifs A et B pour le dosage BCA	106

Liste des figures et tableaux du chapitre 3 : Étude de la N-acylation enzymatique à l'échelle moléculaire

Figure 3.1: Structure de la lysine	109
Figure 3.2: Schéma des résidus catalytiques et du trou oxianionique.....	111
Figure 3.3: Représentation de la chaîne lauroyle reliée à la sérine catalytique et de la région sur laquelle la recherche de cavité est effectuée (sphère rouge). A: vue latérale du site actif avant minimisation (blanc) ; B: vue latérale du site actif après minimisation (vert) ; C: superposition des deux cavités	111
Figure 3.4: View of the CALB active site pocket. Residues of CALB for which side chains were considered as flexible during docking simulations are marked.....	120
Figure 3.5: Theoretical distance criteria (d_1 and d_2) to be met by productive complexes.	122
Figure 3.6: Main conformations of the catalytic cavity observed among the acyl-enzyme complexes issued from docking. A: one example of complex showing a correct conformation of the catalytic machinery. B: one example of complex showing an unfavorable orientation of the His224 lateral chain. Distances theoretically involved in hydrogen atom transfers are indicated (in Å). For more clarity, the lysine is not shown.....	125
Figure 3.7: Distances d_1 and d_2 for each pose issued from docking, depending on lysine orientation. ▲ (-): poses in the orientation ϵ ; ■ (--): poses in the orientation α	126
Figure 3.8: Mass analyses of α -lauroyl-lysine (A) and ϵ -lauroyl-lysine (B) standards ($m/z=329$). MS ² spectrum after fragmentation of the parent ion.	127
Figure 3.9: α -Conformation L37 of the catalytic cavity observed among the acyl-enzyme complexes issued from docking.	130
Figure 3.10: Electrostatic interaction energies between the catalytic residues Ser105 and His224 and lysine in the orientation α (A) or ϵ (B). Poses were grouped according to the proximity of lysine to the catalytic triad. Poses respecting the distance criteria are given on the right.	131
Figure 3.11: Average electrostatic interaction energies within lysine/acyl-CALB complexes. Poses were grouped according to the orientation of lysine (α in blue or ϵ in black), and its proximity to the catalytic triad.	133
Figure 3.12: Valeurs moyennes des RMSD calculées par résidu pour chaque acyl-enzyme étudiés.....	138

Figure 3.13: Valeurs moyennes des RMSD par résidu pour chaque acyl-enzyme étudié en fonction des deux orientations de la lysine dans la cavité. Orientation α (vert) : le groupement α -NH ₂ de la lysine est dirigé vers le fond de la cavité ; orientation ϵ (bleu) : le groupement ϵ de la lysine est dirigé vers le fond de la cavité.....	139
Figure 3.14: Superposition des conformations adoptées par l'His224 au sein des complexes issus des simulations de docking flexible, selon l'orientation α (vert) ou ϵ (bleu) de la lysine.	140
Figure 3.15: Distance N _{lys} -C _{acyl} en fonction de la distance H _{Lys} -N _{His} pour chaque complexes des deux orientations α (■) et ϵ (▲) : A: capryloyl-CALB ; B: lauroyl-CALB ; C: palmitoyl-CALB ; D : oleoyl-CALB	143

Table 3.1: Correlation coefficients between the CDOCKER energy and respect of distance criteria or lysine orientation. MoPro E_{elec} is the sum of electrostatic energies between lysine and the active site residues marked in Fig. 3.4 or between lysine and the residues Ser105 and His224.	128
--	-----

Tableau 3.2: Distances moyennes interatomiques en fonction de la nature de la chaîne acyle et de l'orientation alpha ou epsilon de la lysine. A : distances entre les résidus catalytiques et les résidus du trou oxyanionique ; B : distances entre les résidus catalytiques et la lysine.....	142
---	-----

Liste des figures et tableaux du chapitre 4 : Étude de la N-acylation enzymatique à l'échelle réactionnelle

Figure 4.1: Mass analysis of oleoyl-lysine synthesized using either the crude extract of <i>S. ambofaciens</i> ATCC23877 (B) or CALB (D) and standards (A and C). A and C: MS ² spectra obtained after fragmentation of ion parent (m/z=410) relative to the standards α -oleoyl-lysine and ϵ -oleoyl-lysine, respectively; B and D: MS ² spectra of the products obtained after acylation reaction catalyzed by <i>S. ambofaciens</i> crude extract and CALB, respectively (ion parents m/z= 410).	161
Figure 4.2: Mass analysis of oleoyl-SYK synthesized using the crude extract of <i>S. ambofaciens</i> ATCC23877. A: single ion chromatogram of the acylated product [M+H] ⁺ parent ion (m/z=661); B: MS ² spectrum after fragmentation of the ion parent; C: MS ² spectrum after fragmentation of the standard N- α -oleoyl-SYK.....	163
Figure 4.3: Mass analysis of oleoyl-LQKW synthesized using the crude extract of <i>S. ambofaciens</i> ATCC23877. A: single ion chromatogram [M+H] ⁺ parent ion (m/z=703); B: MS ² spectrum after fragmentation of the ion parent.	164
Figure 4.4: Structures moléculaires des acides gras étudiés	174
Figure 4.5: Spectre MS ² après fragmentation d'acyl-lysine : A: capryloyl-lysine ; B :lauroyl-lysine, synthétisés par (1) CALB ou (2) le mélange d'aminoacylases issues du surnageant de culture de <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877.	175
Figure 4.6: Spectre MS ² après fragmentation d'acyl-lysine : A: palmitoyl-lysine ; B : oleoyl-lysine, produits par (1) CALB ou (2) le mélange d'aminoacylases issues du surnageant de culture de <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877.	176
Figure 4.7: Suivis cinétiques de la consommation de l'acide laurique (0,24 M) lors de la réaction d'acylation de la lysine (0,12 M) catalysée par : A CALB (Novozym435 [®]) ou B le mélange d'aminoacylases issues du surnageant de culture de <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877. Détails des 5 premières heures de réaction en C pour CALB et en D pour les aminoacylases.	178
Figure 4.8: Suivis cinétiques de consommations des acides gras (0,24 M) lors de la réaction d'acylation de la lysine (0,12 M) catalysée par CALB (Novozym 435 [®]).....	179

Figure 4.9: Taux de conversions pour la réaction d'acylation de la lysine (0,12 M) avec l'acide laurique, palmitique et oléique (0,24 M) catalysée par CALB à 48h. (-- = température de travail = 55°C).....	181
Figure 4.10: Taux de conversion pour la réaction d'acylation de la lysine (0,12 M) avec l'acide palmitique (0,24 M) catalysée par CALB à 48h de réaction à 55 et 65°C.....	181
Figure 4.11: Structures moléculaires des accepteurs d'acyles étudiés et leurs logP.....	184
Figure 4.12: Taux de conversion pour la réaction d'acylation de gly-gly, glycine, méthyl-glycine et ter-butyl-glycine (0,12 M) par l'acide laurique (0,24 M), catalysée par CALB (-- = logP du M2B2).....	185
Figure 4.13: Graphique en toile des moyennes des moyennes des énergies d'interactions électrostatiques des résidus de la cavité catalytique pour chaque complexe en fonction de la nature de l'accepteur d'acyle.....	186
Table 4.1: List of strains, plasmids and BACs used in this work.	153
Table 4.2: Oligonucleotide primers used in this work.	156
Table 4.3: Hydrolytic activity towards N- α / ϵ -acetyl-L-lysine in each collected fraction during low-pressure ion exchange liquid chromatography	166
Table 4.4: Hydrolysis of N- α -acetyl-L-lysine or N- ϵ -acetyl-L-lysine in selected fractions resulting from the separation of the proteins of the crude extracts of the <i>S. ambofaciens</i> wild type strain and mutant strain.	169
Tableau 4.5: Vitesses initiales apparentes de disparition (mM.h ⁻¹) des donneurs d'acyles catalysée par CALB (Novozym 435 [®]).....	180
Tableau 4.6: Comparaison des conditions opératoires lors de l'acylation de la lysine entre notre étude et celle de Soo et al. 2004 (PA : acide palmitique ; OA : acide oléique ; LA : acide laurique)	182

Liste des figures et tableaux du chapitre 5 : Étude de la N-acylation enzymatique à l'échelle du procédé

Figure 5.1: SBA-15 glutaraldehyde (red path) and glycidyle (black path) functionalizations followed by aminoacylases chemisorption	198
Figure 5.2: SBA-15 (a, ■), SBA-15-amine ^{50%} (b, ▲), SBA-15-glu ^{50%} (c, ●) and SBA-15-glu ^{50%} -acylase (d, ◆) nitrogen sorption isotherms (A), average pore diameter distribution (B), SAXS patterns (C), FTIR spectra (D), ²⁹ Si CPMAS NMR spectra (E) and ¹³ C CPMAS NMR spectra (F).....	206
Figure 5.3: Hydrolytic enzyme activity assays obtained for chemisorbed supports (A) and with SBA-15-glu ^{10%} -acylase under various pH (B)	210
Figure 5.4: FTIR spectrum of SBA-15-acylase (A) and acylase adsorption isotherm on SBA-15 (B).....	212
Figure 5.5: (A) Hydrolytic activity with physisorbed acylase and free acylases; (B) Relative enzyme activity and relative specific activity of hydrolytic enzyme activity assays after re-use for 3 cycles; (C) Relative enzyme activity for hydrolytic enzyme activity assays: in normal conditions (37 °C, 250 rpm) (grey) or after one night at 55 °C (black) catalyzed by free enzymes or SBA-15-acylase	214
Figure 5.6: Synthetic enzyme activity assay with immobilized enzyme: SBA-15-glu ^{10%} -acylase, SBA-15-glymo ^{10%} -acylase and SBA-15-acylase comparison with free enzyme. (N.D: non detected)	215
Figure 5.7: MS ² spectra of lauroyl-lysine synthesized using	216
Figure 5. 8: Comparaison des facteurs θ de la réaction d'acylation de la lysine avec l'acide laurique catalysé par CALB dans du M ₂ B ₂ à 55°C, en réacteur conventionnel et en réacteur micro-ondes histogramme à motif : conventionnel ; plein : micro-onde.	221
Figure 5. 9: Comparaison des facteurs θ de la réaction d'acylation de la lysine avec l'acide oléique catalysé par CALB dans du M ₂ B ₂ à 55°C, en réacteur conventionnel et en réacteur micro-ondes histogramme à motif : conventionnel ; plein : micro-onde.	221
Figure 5. 10: Comparaison des facteurs θ de la réaction d'acylation de la lysine avec l'acide oléique catalysé par CALB dans du M ₂ B ₂ à 70°C, en réacteur conventionnel et en réacteur micro-ondes histogramme à motif : conventionnel ; plein : micro-onde.	222

Figure 5. 11: Taux de conversion après une 1h de synthèse d' α -lauroyl-lysine catalysée par les aminoacylases de *S. ambofaciens* dans différents milieux réactionnels. Histogramme à motif : conventionnel ; plein : micro-onde..... 224

Figure 5. 12: Concentration en α -oléoyl-lysine (M) produite sur 24h de réaction par les aminoacylases de *S. ambofaciens* à 45°C dans du tampon Tris (50 mM) NaCl (25 mM) à pH 8 dans différentes conditions d'agitation. 226

Table 5. 1: Main characteristics of functionalized silicas with glutaraldehyde or glycidyle. 208

Tableau 5. 2: Rendement de la réaction d'acylation de la lysine et de l'acide oléique catalysées par les aminoacylases de *S. ambofaciens* à 45°C dans du tampon Tris (50 mM) NaCl (25 mM) à pH 8 avec ou sans sonication et à différentes vitesses d'agitation. 225

Tableau 5. 3: Rendement de la réaction d'acylation de la lysine et de l'acide oléique catalysées par les aminoacylases de *S. ambofaciens* à 45°C dans du tampon Tris (50 mM) NaCl (25 mM) à pH 8 en réacteur micro-fluidique à différents débits en comparaison avec les résultats de réaction à 250 rpm..... 227

Abréviations

CALB	Lipase B <i>Candida antarctica</i>
M ₂ B ₂	2-méthyl-2-butanol
CCM	Chromatographie sur couche mince
HPLC	High performance liquid chromatography
MS	Mass spectrometry
MS ²	Fragmentation mass spectrometrie
TEA	Triéthylamine
TFA	Acide trifluoroacétique
PDB	Protein Data Bank
RMSD	Root Mean Square Deviation
SBA-15	Santa Barbara amorphous 15
Lys	Lysine
Gly	Glycine
Ser	Serine
Asp	Aspartate
Gln	Glutamine

Introduction générale

La réaction d'acylation permet l'ajout d'un groupement acyle sur une molécule, ce groupement étant transféré depuis un agent acylant. Les acides aminés acylés ont été largement décrits comme constituant une classe d'agents tensioactifs avec d'excellentes propriétés de surface, des activités biologiques intéressantes, un faible potentiel de toxicité et un faible impact environnemental. Par ailleurs, la réaction d'acylation d'autres molécules telles que les peptides permet d'améliorer leurs potentiels thérapeutiques. En effet, leur polarité peut limiter leur transfert à travers les membranes cellulaires. Leur acylation peut donc faciliter le passage des peptides et acides aminés au travers des membranes biologiques en augmentant leurs propriétés lipophiles. De plus, cela peut également permettre leur protection vis-à-vis d'attaques protéolytiques endogènes et accroître ainsi leur stabilité.

Actuellement réalisée de manière chimique à l'échelle industrielle, l'acylation de ces acides aminés ou peptides montre des limites en ce qui concerne la sélectivité réactionnelle et l'innocuité vis-à-vis de l'environnement mais aussi pour la sécurité sur les sites de production (usage de solvant organique inflammables/toxiques et de dérivés chlorés), ainsi qu'en matière de coût de retraitement des effluents polluants. Une alternative à cette voie chimique est l'utilisation d'enzymes capables de catalyser ces réactions d'acylation. Les enzymes hydrolytiques, et principalement les lipases, sont les plus largement utilisées pour catalyser ces réactions d'acylation. Néanmoins, leur mise en œuvre implique l'utilisation de milieux non aqueux comme milieu réactionnel. Cela limite l'acylation de molécules polaires telles que les acides aminés ou les peptides. Une alternative aux lipases est l'utilisation d'acylases. Ces enzymes sont capables de catalyser l'acylation d'acides aminés ou de peptides avec des acides gras en milieu aqueux. Ces enzymes sont produites par divers micro-organismes, y compris par les bactéries filamenteuses du genre *Streptomyces*. Peu d'études portent sur l'acylation par voie enzymatique d'acides aminés et de peptides et les performances réactionnelles de ces systèmes demeurent parfois limitées. Il est donc intéressant, afin d'optimiser le procédé d'acylation, de réaliser des études permettant une meilleure compréhension des facteurs influençant la réaction.

L'objectif des travaux menés ici a été de réaliser une étude globale des voies possibles d'amélioration de la réaction d'acylation par voie enzymatique à différentes échelles : moléculaire, réactionnelle et procédé.

Dans cette étude, trois échelles sont considérées, chacune constituant un chapitre de thèse. Dans chaque partie les travaux réalisés ont tenté de répondre à des questions scientifiques. La démarche globale est représentée sur le schéma 1.

L'étude à l'échelle moléculaire, est focalisée sur l'amélioration de la compréhension des mécanismes réactionnels ainsi sur la sélectivité d'une enzyme de structure connue telle que la lipase B de *Candida antarctica* (CALB). À cette échelle les questions scientifiques sont :

→ **Est-il possible de prédire la faisabilité et la régiosélectivité d'une réaction et, si oui, quelle est la méthode la plus appropriée ?**

→ **Quelles sont les règles qui régissent cette régiosélectivité ?**

Ces questions sont cruciales puisque la prédiction de la régiosélectivité de la réaction peut permettre d'intensifier la mise en œuvre d'une réaction d'acylation régiospécifique et donc la génération d'un produit d'acylation unique ou extrêmement majoritaire à partir d'un substrat receveur d'acyle, possédant plusieurs sites d'acylation potentiels. L'usage d'outils de modélisation moléculaire permet le développement d'une méthode de prédiction de la faisabilité, de détermination des causes de la sélectivité d'une réaction et donc de permettre l'intensification d'une réaction d'acylation enzymatique sélective donnée et souhaitée. La modélisation moléculaire constitue donc un outil précieux permettant, *in-silico* et pour un catalyseur enzymatique dont la structure est connue, de limiter les coûts (financiers, temps, énergie) inhérents à l'identification des substrats réactionnels les plus adaptés.

Dans l'étude à l'échelle réactionnelle, l'intensification de la réaction d'acylation enzymatique passe par une détermination expérimentale des potentialités des biocatalyseurs étudiés. Cela implique la mise en œuvre et l'étude de réactions de synthèse de différents substrats acylés, ainsi que des sélectivités réactionnelles associées. Les questions scientifiques de ce chapitre sont :

→ **Quel est l'impact d'un changement de biocatalyseur, de substrats, sur la sélectivité et les performances réactionnelles ?**

À cette échelle ont été considérés différents couples enzyme-milieu réactionnel afin de comparer leurs performances et d'observer leurs sélectivités. Dans cette partie des réactions d'acylation de la lysine par différents donneurs d'acyles ont été catalysées soit par CALB

commerciale immobilisée (Novozym 435[®]) en solvant organique, soit par un mélange d'aminocyclases de *Streptomyces ambofaciens*, découvertes et produites dans le laboratoire et réalisant la réaction d'acylation en milieu aqueux. L'impact de la longueur de la chaîne carbonée du donneur de groupement acyle sur la sélectivité ainsi que sur les performances réactionnelles de Novozym 435[®] a été étudiée. Par ailleurs, pour un biocatalyseur donné, l'impact de la taille et de la solubilité de plusieurs accepteurs d'acyles sur les performances d'acylation a été étudié expérimentalement et par modélisation afin de rechercher des explications aux observations effectuées.

L'étude à l'échelle du procédé, implique l'usage de biocatalyseurs immobilisés (catalyse hétérogène) ou libres (catalyse homogène). L'usage de la catalyse hétérogène permet la stabilisation et la récupération aisée du biocatalyseur tout en se prêtant bien à l'usage de procédés catalytiques continus, en général préférés à l'échelle industrielle. À ce niveau, le choix du réacteur et son usage doit être adapté au type de catalyse (homogène ou hétérogène) ainsi qu'à la nature du milieu réactionnel constitué des substrats et produits plus ou moins concentrés et du solvant réactionnel (anhydre ou non) dont le choix est dicté par l'enzyme utilisée. Les questions scientifiques de ce chapitre sont :

- **Quel est l'impact de l'immobilisation sur les aminocyclases de *S. ambofaciens* ?**
- **Quel est l'impact du mode de chauffage et d'agitation sur les performances réactionnelles ?**

À cette échelle, l'immobilisation des aminocyclases de *S. ambofaciens* sur des matériaux mésoporeux silicatés a été étudiée. Puis, l'impact du mode de chauffage a été étudié par comparaison entre le chauffage conventionnel et le chauffage par micro-onde en catalyse hétérogène avec Novozym435[®] en solvant organique et en catalyse homogène avec les aminocyclases de *S. ambofaciens* en milieux aqueux. Pour finir, l'impact de l'agitation sur la réaction d'acylation de la lysine et l'acide oléique catalysée par les aminocyclases de *S. ambofaciens* en milieu aqueux a été étudié par comparaison des résultats obtenus par agitation mécanique (barreau aimanté) et en réacteur micro-structuré.

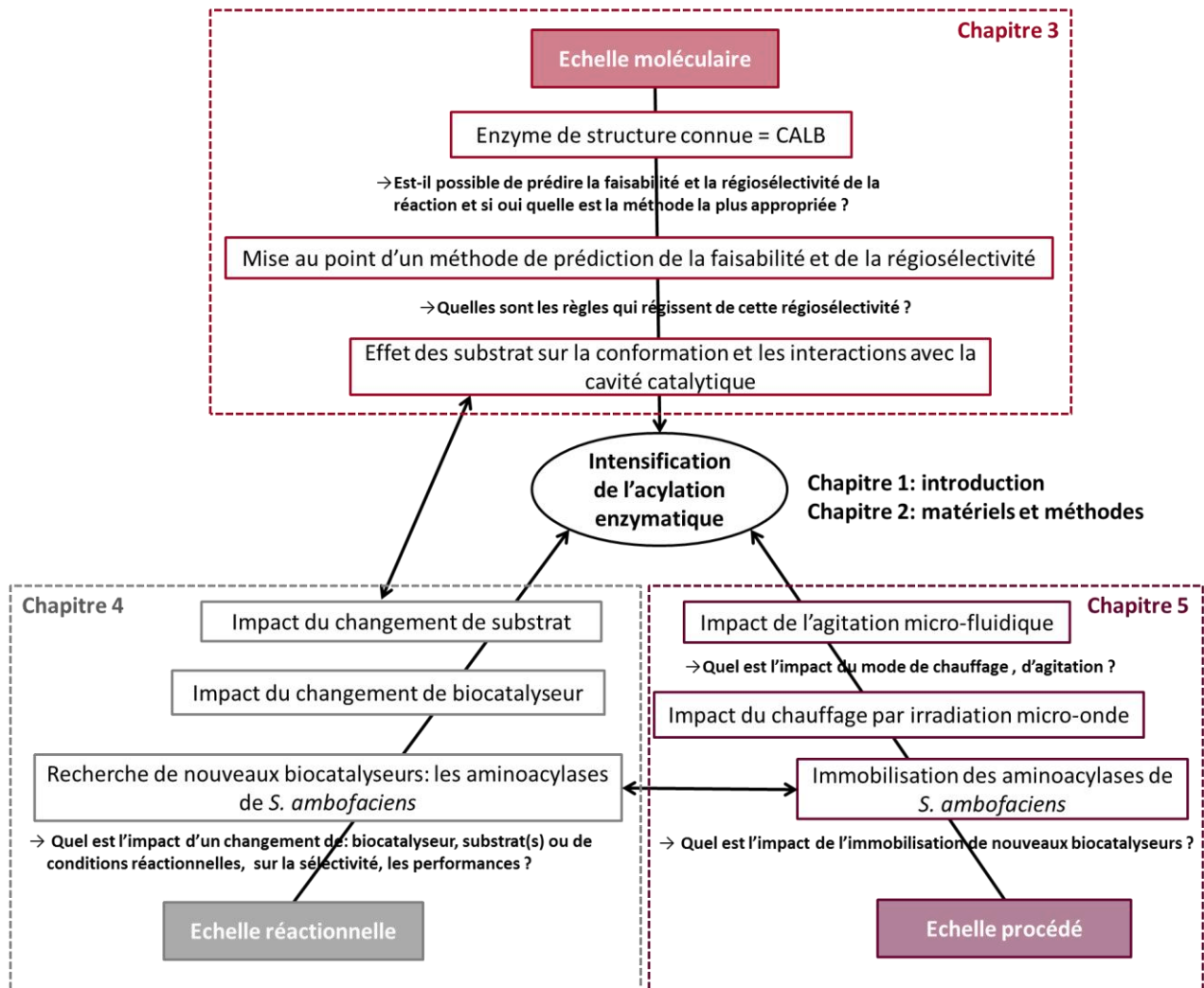


Schéma 1 : Démarche globale de la thèse

Chapitre 1 : Étude bibliographique

1. Acylation d'acides aminés et peptides

La réaction d'acylation permet l'ajout d'un groupement acyle sur une molécule, ce groupement étant transféré depuis un agent acylant. Cette réaction d'acylation permet ainsi l'obtention de dérivés d'acides aminés et de peptides à propriétés bioactives et/ou technofonctionnelles (Bordes and Holmberg, 2015; Craik et al., 2013). Les peptides présentent de nombreuses activités biologiques : antioxydantes, opioïdes, anti-hypertensives, anticancéreuse... (Tableau 1.1).

Tableau 1.1: Exemples de peptides et acides aminés bioactifs

Acide aminé/peptide	Séquence	Activités biologiques / propriétés techno fonctionnelles	Références
β -CN f(84–86) β -Lg f(58–61)e	VPP LQKW	Anti-hypertensif	(Hernández-Ledesma et al., 2011)
BHH-P1 BHH-P2 BHH-P3	WEGPK GPP GVPLT	Anti-oxydant	(Chi et al., 2015)
Carnosine HTP-1	β -AH GTEDEDK	Neuroprotecteur	(Pangestuti et al., 2013; Shen et al., 2007; Verheyen et al., 2013)
Labyrinthopeptin A1, Theopapuamide B-D, Celebeside A-C	Polypeptides depsipeptides	Antiviral	(Férrir et al., 2013; Ngo et al., 2012; Plaza et al., 2009)
Bactridines, Defensin- NV	polypeptides	Antimicrobien	(Díaz et al., 2009; Findlay et al., 2012; Li et al., 2012; Pinazo et al., 2016; Ye et al., 2010)
DAMGO, Biphalin	YAGFG, (YAGF) ₂	Opioïde	(Lindqvist et al., 2015)
CB1a, Epinecidin-1	polypeptides	Anti-cancer	(Harris et al., 2013; Lin et al., 2009; Wu et al., 2009)
Perfactant AM1	Ac-MKQLADS LHQLARQ VSRLEHA- CONH ₂	tensioactif	(Dexter and Middelberg, 2008; Infante et al., 2004; Malcolm et al., 2007)
<i>N</i> ^α -acyl arginine methyl ester			

Ces activités biologiques rendent ces molécules très intéressantes dans les domaines thérapeutiques, cosmétiques et nutraceutiques. Cependant, leur polarité peut limiter leur transfert passif à travers les membranes cellulaires, telles que celles de l'épithélium intestinal, diminuant ainsi leur biodisponibilité dans le cas d'une ingestion orale. La biodisponibilité concerne alors la fraction d'une quantité de molécules ingérées atteignant effectivement la circulation sanguine et donc susceptible d'agir via leur fixation sur des récepteurs appropriés. L'acylation des molécules en question, acides aminés ou peptides, peut donc permettre, en générant un édifice plus apolaire, d'améliorer leur biodisponibilité et donc leur capacité à être active.

De plus, leur acylation peut également permettre leur protection vis-à-vis d'attaques protéolytiques endogènes et accroître ainsi leur stabilité (Nestor et al, 2009). Par ailleurs, l'ajout d'un acide gras apolaire sur un acide aminé ou un peptide polaire permet l'obtention d'une molécule amphiphile présentant des propriétés de tension de surface intéressantes. Les acides aminés acylés pourront ainsi être utilisés comme agents tensio-actifs qui sont des acteurs et vecteurs irremplaçables en cosmétique, en raison de leurs excellentes propriétés de surface, de leurs activités biologiques intéressantes et de leur faible potentiel de toxicité.

1.1. Avantages

1.1.1. Propriété de surface

Les molécules tensioactives sont largement utilisées pour leur potentiel dans les applications pharmaceutiques, cosmétiques, ménagères et alimentaires (Bellahouel et al., 2001). Actuellement, les impacts sur l'environnement, la biodégradabilité et la biocompatibilité sont devenus des paramètres d'importance équivalente aux propriétés de surface de ces molécules (Morán et al., 2004). La recherche de nouvelles bio-molécules tensioactives constitue donc un défi d'une grande importance.

Les peptides et les acides aminés sont, pour la plupart, des molécules de nature hydrophile. Lorsque l'acylation d'acide aminé ou de peptide est réalisée avec des composés à longue chaîne apolaire, les produits obtenus possèdent alors une activité de surface élevée. Ces molécules sont appelées tensioactifs (Gautam and Tyagi, 2006; Infante et al., 2004). De nombreuses études ont indiqué que l'utilisation d'acides aminés et d'hydrolysats de protéines issus de l'industrie, comme matières premières pour synthétiser des tensioactifs, pouvait

permettre de générer des tensioactifs globalement plus efficaces et moins coûteux (Foley et al., 2012; Pinazo et al., 2016). De plus, la grande variété d'acides aminés et d'acides gras permet la création d'une grande diversité de bio-tensioactifs aux propriétés variables (Chandra and Tyagi, 2013). L'usage direct de lipopeptides bactériens ou de peptides amphiphiles en tant que tensioactifs peut également s'avérer intéressant. Si les lipopeptides sont des molécules dont la production est difficile à réaliser et coûteuse, en revanche, les peptides amphiphiles tels que la surfactine sont eux largement produits et utilisés. Leurs propriétés de surfaces très intéressantes sont utilisées pour des applications de nettoyage et de récupération d'huile (Dexter and Middelberg, 2008).

Des travaux ont permis de définir des propriétés interfaciales, telles que la concentration micellaire critique et la température de Krafft (température minimum critique de formation de micelle) de molécules tensioactives. Ces travaux ont montré qu'avec de nouveaux tensioactifs constitués d'acides aminés (sérine, tyrosine et hydroxyproline) et d'acides gras de longueurs de chaîne variables (12-18), saturés et insaturés, la concentration micellaire critique était faible et que cette dernière augmentait avec la présence d'insaturation(s) sur la chaîne carbonée, alors que la température de Krafft, elle, diminuait avec la présence et l'augmentation d'insaturations (Brito et al., 2011).

1.1.2. Biodisponibilité

L'amélioration de la biodisponibilité de peptides et protéines bioactifs utilisés comme médicaments est un challenge extrêmement important. En effet, l'administration de ces médicaments se fait dans 60 % des cas par voie orale et les peptides généralement polaires possèdent des difficultés pour passer au travers de la barrière épithélio-intestinale ce qui conduit à une biodisponibilité de l'ordre de 1-2 % seulement (DeVane, 2009; Hamman et al., 2005). Les molécules bioactives administrées par voie orale peuvent également être la cible de protéases présentes dans le système digestif. L'acylation constitue une des solutions à ce problème. Il a par exemple été démontré *in vitro* que la longueur de la chaîne carbonée de l'agent acylant joue un rôle dans la protection contre les protéases (Asada et al., 1994).

En 2013, 40 peptides/protéines se trouvaient sur le marché pharmaceutique, environ 270 étaient en phase clinique et 400 en phase préclinique (Renkuntla et al., 2013; Vlieghe et al., 2010). Pour améliorer le transfert de ces molécules au travers des barrières de l'organisme,

différentes techniques ont été envisagées telles que l'encapsulation, l'utilisation d'agents chélatants, de sels biliaires, d'acyl-carnitine ou encore différentes modifications chimiques (Renukuntla et al., 2013). Les modifications chimiques peuvent consister en une modification d'acides aminés, PEGylation ou encore acylation. Par exemple l'acylation de la tétragastrine a montré une amélioration de sa biodisponibilité représentée par une augmentation de la sécrétion d'acide gastrique. L'acylation de l'insuline sur la lysine²⁹ de la chaîne B a permis une amélioration de sa biodisponibilité. En effet, cette modification chimique a amélioré la solubilité de l'insuline ainsi que la liaison avec l'albumine, ce qui prolonge l'action hypoglycémiant en augmentant le temps de circulation dans le sang (Frokjaer and Otzen, 2005; Kurtzhals et al., 1995).

La difficulté des peptides à passer la barrière hémato-encéphalique a été également très étudiée (Egleton and Davis, 1997; Witt et al., 2001). Le cerveau est une cible importante pour des peptides neuropharmaceutiques. L'amélioration de la biodisponibilité de ces molécules est donc indispensable. La somatostatine fait partie de cette catégorie de peptides et est utilisée pour le traitement contre le cancer, l'acromégalie (production excessive d'hormone de croissance) ou encore en tant qu'opioïde.

1.1.3. Modulation des activités biologiques

La modification structurale des acides aminés et des peptides lors de l'acylation peut provoquer des modifications de l'activité biologique de ces molécules. Une étude réalisée sur des tensioactifs obtenus par synthèse chimique de type N- ϵ -acyl-lysine et N- α -acyl-acide aminé méthyl ester a comparé leurs activités biologiques ainsi que leurs biodégradabilités et la formation de micelle. Les résultats ont indiqué que la présence d'une charge cationique affecte l'activité antimicrobienne et hémolytique (Pérez et al., 2009). L'étude de la relation structure-fonction de plusieurs tensioactifs constitués d'arginine a permis de montrer que la présence de deux charges augmente l'activité antimicrobienne, la présence d'ester augmente la biodégradabilité et enfin il a été démontré que l'hydrophobicité était un paramètre influant négativement la toxicité et la biodégradabilité des tensioactifs (Morán et al., 2001). Une étude comparative de la cytotoxicité de mono- et di-acyl glycerol, acide glutamique ou mono-acyl glycérol, arginine a montré que les tensioactifs di-acylés vont généralement conférer une cytotoxicité moindre mais une phototoxicité plus importante (Figure 1.1) (Vinardell et al., 2008).

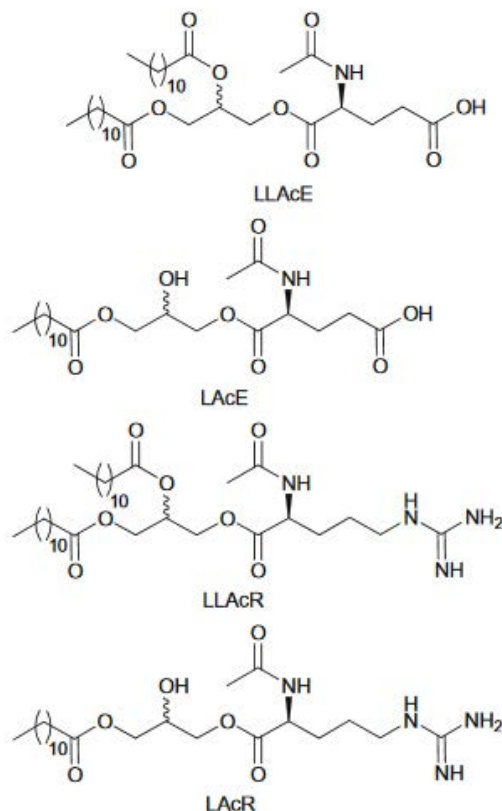


Figure 1.1: Structure des tensioactifs : mono- et di-acyl glycerol acides aminés (E : acide glutamique ; R : arginine)

1.2. Inconvénients

L'acylation de peptides et d'acides aminés peut également avoir une influence négative sur la bio-activité des molécules. En effet, les modifications structurales, la longueur de la chaîne carbonée du donneur d'acyle ou encore la régio-sélectivité de la réaction sont différents facteurs pouvant inhiber ou diminuer l'activité des biomolécules acylées.

Par exemple, l'acylation du peptide α -conotoxine-MIII sur la chaîne latérale empêche la formation d'une structure hélicoïdale, ce qui engendre la perte de l'activité neuro-protectrice de ce peptide (Blanchfield et al., 2003). La position de l'acide gras est d'une grande importance comme l'a démontré l'équipe de Koda au cours de l'étude de l'acylation de l'endomorphine-1-LAA_n (n : étant le nombre de carbone de la chaîne grasse). Lors de cette étude, il a été observé une baisse de l'activité opioïde liée à la baisse de l'affinité de la molécule pour son récepteur. L'acylation ayant lieu sur l'extrémité C-terminale de l'endomorphine-1-L-AA_n responsable de la reconnaissance de cette molécule par le récepteur (Koda et al., 2008). De la même manière, une étude portant sur l'acylation de molécules

antiépileptiques a montré l'impact de la longueur de la chaîne carbonée et donc de la polarité sur l'activité anti-convulsion. Il a été observé une diminution de l'activité corrélée à une augmentation de la longueur de la chaîne carbonée. La diminution de l'activité étant engendrée par une diminution de l'affinité avec le récepteur (Zhang et al., 2009).

La connaissance des molécules bioactives ainsi que leur mode de fonctionnement est donc très importante dans la perspective de réaliser l'acylation de ces molécules et de permettre le maintien de leurs activités.

1.3. Stratégie de synthèse des acides aminés et de peptides acylés

1.3.1. Synthèse chimique

La réaction d'acylation par voie chimique dite de Schotten Baumann (Figure 1.2), est classiquement utilisée à échelle industrielle pour produire des dérivés d'acides aminés ou de peptides. Il s'agit d'une méthode de synthèse d'amide (ou d'ester) à partir d'un chlorure d'acyle et d'une amine (ou d'un alcool), en phase principalement aqueuse. Dans un premier temps, le groupe de chlorure d'acyle réagit avec une amine (ou ester) et libère un proton. Dans un second temps, une base capte le proton qui pourrait diminuer le rendement de la réaction. Il en résulte la formation de sel de chlore et d'eau.

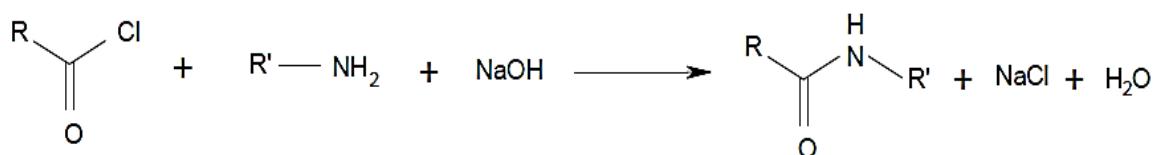


Figure 1.2 : Acylation chimique d'une fonction amine par la réaction de Schotten Baumann

Cette réaction chimique a un rendement très élevé ($\geq 90\%$), mais les conditions réactionnelles, telles qu'un pH très alcalin et la production de sels, peuvent engendrer des problèmes en ce qui concerne l'acylation des molécules coûteuses et fragiles telles que les peptides. Cette synthèse se caractérise par une absence de sélectivité qui oblige à mettre en place des processus de protection et de dé-protection des fonctions (Di Gioia et al., 2014) et se traduit par des coûts de production accrus. L'utilisation de la réaction de Schotten-Baumann a d'autres inconvénients comme l'utilisation de chlorures d'acyle, dont la synthèse peut être

coûteuse et peu éco-compatible, l'utilisation de co-solvants organiques toxiques (DMF, DMSO, toluène, acétone...) et la génération de larges volumes d'effluents aqueux, riches en sels et solvants organiques mais contenant aussi des chlorures d'acyle n'ayant pas réagi et des acides gras issus de la réaction d'hydrolyse. Le traitement de ces effluents, surtout lorsqu'une précipitation acide par ajout d'acide fort (HCl) suivie d'un rinçage abondant est utilisée pour formuler les molécules acylées sous forme de poudre, s'avère très coûteux. Ces caractéristiques peu compatibles avec une synthèse respectueuse de l'environnement et impliquant des risques sur le site de production amènent aujourd'hui les industriels à s'intéresser à des méthodes de synthèses moins polluantes aussi bien dans une logique de « mieux produire » que dans une logique de réponse aux pressions sociétales et législatives. Devant l'intérêt de l'acylation des biomolécules telles que les acides aminés et certains peptides, des alternatives sont à mettre en place. La voie enzymatique alternative est apparue comme étant une méthode d'acylation attractive.

1.3.2. Synthèse enzymatique

Le développement de bioprocédés pour la production d'acides aminés / peptides acylés est jusqu'à présent peu décrit dans la littérature. De tels procédés seraient pourtant fort utiles pour la synthèse d'acides aminés/peptides acylés montrant des propriétés techno-fonctionnelles ou des bioactivités intéressantes *in-vivo*. L'un des intérêts majeurs de la voie enzymatique est de proposer une stratégie novatrice en une étape dans des conditions expérimentales douces et en évitant les étapes de protection régio-sélective des fonctions qu'on ne souhaite pas acyler (Schmid et al., 2001). Pour ces raisons, plusieurs études ont rapporté l'utilisation d'enzymes pour la synthèse de dérivés acylés de diverses biomolécules comme les aminoalcools, les acides aminés, les peptides ou encore les polyphénols (M Ardhaoui et al., 2004; Furutani et al., 1996; Gremos et al., 2011; Husson et al., 2009, 2010; Kim et al., 2003). Les études concernant la synthèse enzymatique de peptides/acides aminés acylés se concentrent généralement sur des paramètres susceptibles de contrôler l'efficacité et la régio/chimio-sélectivité de la réaction. Par exemple, le biocatalyseur doit être sélectionné en fonction de ces caractéristiques : type d'enzyme, activité et spécificité de substrat (Ferrari et al., 2014; Husson et al., 2011). La structure et l'état d'ionisation des substrats peuvent également influencer considérablement la réactivité des fonctions nucléophiles au cours de la N ou O-acylation enzymatique (Husson et al., 2008; Maugard et al., 1997, 1998). De même, le milieu

réactionnel a également une influence importante sur le procédé (Wescott and Klibanov, 1994).

1.3.3. Synthèse chimio-enzymatique

La voie enzymatique peut être couplée à la voie chimique pour favoriser une réaction de condensation entre les substrats et l'agent acylant. Dans certains cas, la synthèse enzymatique a plutôt servi de technique pour générer la protection de groupements (Goujard et al., 2004; Kadereit and Waldmann, 2000). D'autres approches concernant l'acylation enzymatique d'acides aminés possédant des chaînes latérales non chargées ont été décrites dans la littérature. Par exemple, la O-acylation de la sérine et de la thréonine catalysée par une lipase dans des solvants organiques tels que l'acétone, l'acétonitrile, le 2-méthyl-2-butanol ou le 2-méthyl-2-propanol conduit à de très faibles rendements. La faible réactivité de leurs groupements hydroxyles respectifs est probablement liée à leur faible solubilité dans les solvants organiques. Pour pallier cette difficulté, la fixation covalente par voie chimique d'un groupe amide sur leur groupement carboxylique a été effectuée avant leur modification par réaction enzymatique. Ainsi, la solubilité de ces acides aminés modifiés a notablement augmenté, conduisant à une synthèse enzymatique plus efficace du O-lauroyl-sérinamide et du O-lauroyl-thréoninamide dans un solvant organique (Zhang et al., 2005). Une étude a également démontré la faisabilité de la O-acylation de la sérine catalysée par une lipase dans un solvant organique en utilisant le substrat pré-modifié : α -Cbz-L-sérine (Valivety et al., 1997). Le problème de solubilité dans un solvant organique a été également souligné pour l'acylation de dipeptides. Par exemple, une étude a démontré la possibilité de N-acyler la lysine présente dans un dipeptide polaire (L-Phe- α -L-Lys et L-Ala- α -L-Lys) à l'aide de lipase de *Pseudomonas cepacia* et *Aspergillus niger* dans l'acétonitrile après greffage chimique préalable d'un groupement ter-butyl sur la fonction carboxylique terminale (Gardossi et al., 1991). La difficulté majeure rencontrée dans la N-acylation des peptides et acides aminés réside dans le fait que ces molécules sont polaires ($\log P \ll 0$) et peu compatibles avec les solvants apolaires et anhydres permettant de solubiliser les donneurs d'acyles eux-mêmes apolaires ($\log P \gg 0$) que sont les acides gras ou les esters.

2. Étude multi-échelle du procédé d'acylation enzymatique

La Figure 1.3 représente les différentes échelles sur lesquelles il est possible d'intervenir afin d'étudier une réaction enzymatique :

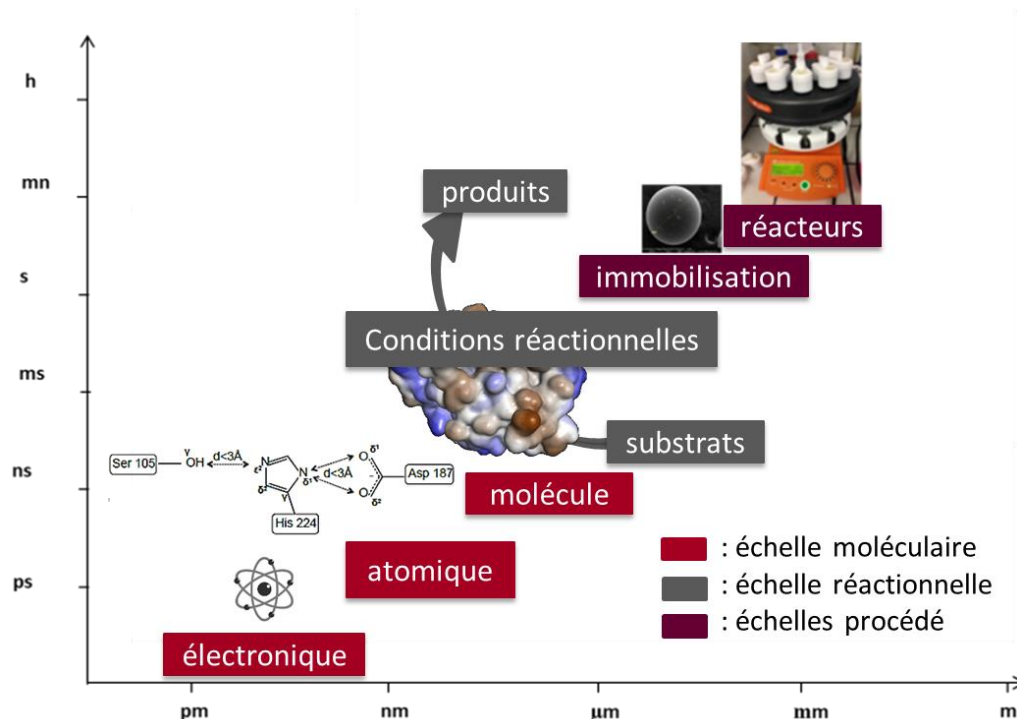


Figure 1.3: Représentation spatiale et temporelle des multiples échelles du procédé d'acylation enzymatique

Trois échelles sont considérées :

- l'échelle moléculaire permet d'améliorer la compréhension des mécanismes réactionnels ainsi que la sélectivité d'enzyme de structure connue.
- l'échelle réactionnelle, envisage différents substrats et couples enzyme-milieu choisis, afin de comparer leurs performances et sélectivités.
- l'échelle du procédé, différents modes de chauffage et d'agitation sont envisagés ainsi que l'immobilisation d'enzyme permettant d'envisager des procédés continus ainsi que la stabilisation et la récupération du biocatalyseur.

Dans la suite de ce chapitre l'échelle réactionnelle est abordée avant l'échelle moléculaire afin d'évoquer directement les enzymes d'intérêt.

2.1. Échelle réactionnelle

La réaction d'acylation permet l'ajout d'un groupement acyle sur une molécule, ce groupement étant transféré depuis un agent acylant (Figure 1.4).

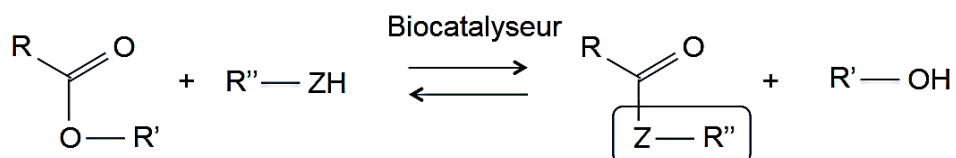


Figure 1.4: Schéma de la réaction d'acylation catalysé par une enzyme

2.1.1. Enzymes catalysant la réaction d'acylation en milieu non-aqueux

Les enzymes hydrolytiques sont classiquement utilisées pour catalyser ces réactions. En particulier, les lipases qui sont des hydrolases triacylglycérol (EC 3.1.1.3), capables de catalyser les réactions d'acylation en milieu non aqueux. Les lipases sont déjà utilisées dans les industries : alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques et hygiéniques (Nestl et al., 2011). En effet, ces enzymes possèdent une spécificité de substrat large et ne nécessitent pas la présence de coenzyme. L'une des lipases les plus utilisées dans le domaine industriel est la lipase B de *Candida antarctica* (CALB) qui est utilisée pour la synthèse de composés multifonctionnels dans les solvants organiques tels que des dérivés de vitamines, de sucres, d'acides aminés ou de phénols (Ganske and Bornscheuer, 2005; Klibanov, 2001; Wescott and Klibanov, 1994; Zaks and Klibanov, 1985).

Les lipases sont utilisées dans des milieux réactionnels dits « non conventionnels » car non-aqueux ou avec très peu d'eau sous forme libre. Ces milieux ou solvants réactionnels sans ou avec très peu d'eau libre peuvent-être, comme cela sera vu plus loin, des solvants organiques, des liquides ioniques, des solvants eutectiques profonds ou encore des fluides supercritiques tels que le CO₂ supercritique. Un solvant adéquat doit permettre de maintenir l'activité de l'enzyme ainsi que la solubilisation correcte de l'accepteur et du donneur d'acyle. Les solvants organiques permettent une bonne solubilité de substrats non polaires (Doukyu and Ogino, 2010; Hudson et al., 2005; Ogino and Ishikawa, 2001) mais la solubilisation des substrats polaires tels que les acides aminés et les peptides y est difficile. Le même problème

existe avec le CO₂ supercritique, où les acides aminés et peptides sont très peu solubles. L'utilisation de solvants de type ioniques ou eutectiques profonds est à ce jour considérée comme un moyen potentiel de solubiliser correctement substrat polaires et apolaires en vue d'une acylation lipasique (Lozano, 2010).

2.1.2. Paramètres influençant les réactions en milieu non-aqueux

2.1.2.1. La nature du milieu

2.1.2.1.1. Solvants organiques

Les milieux organiques constituent un environnement favorable pour les réactions enzymatiques et particulièrement pour l'acylation par les lipases, puisque le milieu doit posséder une très faible activité de l'eau afin d'éviter la réaction réverse d'hydrolyse. L'utilisation de ces milieux organiques permet également l'augmentation de la solubilité des substrats apolaires. En effet, la solubilisation des substrats au moins partielle est une condition importante pour réaliser une réaction enzymatique. Pour l'acylation de substrats polaires tels que les acides aminés et peptides, les solvants organiques polaires sont les plus adaptés car ceux-ci permettent une bonne solvatation (Chebil et al., 2007). Les réactions enzymatiques en solvants organiques présentent de nombreux autres avantages tels que l'augmentation de la thermo-stabilité de l'enzyme (Zaks and Klivanov, 1984), la modification de la spécificité pour les substrats (Carrea et al., 1995), la récupération facile du produit par évaporation du solvant. Cependant, le plus grand intérêt reste leur aptitude à catalyser des réactions cinétiquement et thermodynamiquement non favorables en milieux aqueux. Les réactions en solvants organiques ont été très étudiées entre 1989 (Klivanov, 1989) et la première décennie des années 2000. Mais en raison de leur caractère peu écologique, elles sont actuellement partiellement déconsidérées et des milieux alternatifs ont été suggérés.

2.1.2.1.2. Liquides ioniques

Les liquides ioniques sont des sels organiques constitués d'un anion organique ou inorganique et d'un cation organique. Ce type de milieu a la capacité, à température ambiante, de se comporter comme un solvant et leurs propriétés intrinsèques peuvent être modulées en fonction du choix de la nature chimique de l'anion et du cation. Actuellement, un grand

nombre de liquides ioniques a été décrit dans la littérature. Ils permettent d'augmenter considérablement l'activité et la stabilité enzymatique en comparaison avec les milieux réactionnels classiques et leur utilisation peut être une solution au problème de solubilité des composés polaires (Gordon, 2001; Jain et al., 2005; Kaar et al., 2003; L. J. Lozano et al., 2011; Sheldon et al., 2002; van Rantwijk et al., 2003). En effet, en jouant sur la composition des liquides ioniques, ceux-ci posséderont un caractère plutôt hydrophobe ou hydrophile. Des travaux ont montré que, contrairement à l'utilisation de solvants organiques, les liquides ioniques ayant un caractère hydrophile permettent le maintien de l'activité de synthèse de CALB (Zhang et al., 2005). De plus, ce milieu réactionnel permet une amélioration de l'énantio-sélectivité et de la régio-sélectivité des biocatalyseurs. Ce phénomène serait dû à la capacité des liquides ioniques à maintenir la structure tridimensionnelle optimale de l'enzyme (Kim et al., 2003; Li et al., 2008; Yasmin et al., 2007).

Husson *et al.*, (2009) ont mené une étude sur la chimio-sélectivité et l'efficacité de l'acylation du dipeptide Lys-Ser catalysée par une lipase. Ils ont pu démontrer que l'utilisation du liquide ionique $[BMIM]^+ [PF6]^-$ permet d'améliorer significativement la solubilité du dipeptide Lys-Ser, HCl, et le taux de conversion du substrat aminé (Husson et al., 2009).

Au sein des liquides ioniques, les interactions mises en jeu peuvent affecter le micro-environnement de l'enzyme. Bien qu'il existe une large gamme de liquides ioniques facilement disponibles actuellement, les données sur les propriétés de solvation des liquides ioniques sont assez limitées et totalement insuffisantes pour permettre une prévision fiable du meilleur choix de l'association anion - cation pour la réaction. Cependant, les liquides ioniques ont un grand potentiel pour les biotransformations de substrats fortement polaires. Les liquides ioniques, même très polaires, n'inactivent pas les enzymes contrairement aux solvants organiques de polarité similaire, et ceux-ci peuvent être utilisés sous basse pression pour éliminer les produits volatiles tels que l'eau car leur tension de vapeur est très faible et bien inférieure à celle de l'eau (Irimescu et al., 2004).

Néanmoins, en raison de leur coût, l'utilisation de liquides ioniques dans l'industrie ne pourrait être envisagée que pour la synthèse de molécules à très haute valeur ajoutée, sauf s'ils peuvent être complètement recyclés (Villeneuve, 2007). Par ailleurs certaines interrogations demeurent sur l'impact carbone de leur fabrication et sur leur toxicité (Docherty and Kulpa, Jr., 2005).

2.1.2.1.3. Milieux fondus (ou milieux sans solvants)

L'utilisation de milieux fondus consiste à réaliser les réactions enzymatiques dans des systèmes sans solvant. Dans le cas de la réaction d'acylation, l'agent acylant va à la fois servir de substrat et de solvant réactionnel ce qui permettra d'orienter la réaction vers la synthèse de molécules acylées tout en respectant les exigences environnementales actuelles. En 2008, une étude a obtenu un rendement de conversion de 43% pour la réaction d'acylation du dipeptide Ser-Lys en milieu fondu avec l'acide oléique catalysée par CALB (Husson et al., 2009). Une autre équipe a travaillé sur la production de dérivé acylé d'alkanolamine de structure proche de celle des céramides à intérêt cosmétologique et alimentaire, à partir d'acides gras libres. Dans cette étude, l'intérêt de l'utilisation d'un milieu sans solvant a été démontré par l'obtention de produit de qualité industrielle que ce soit pour l'aspect physique ou la composition chimique de grande pureté. De plus, dans ces conditions de réaction, l'enzyme est à la fois très active et montre une bonne stabilité (Tufvesson et al., 2007).

2.1.2.1.4. CO₂ supercritique

L'usage du CO₂ supercritique en tant que solvant non-conventionnel pour la catalyse enzymatique émerge de plus en plus depuis une dizaine d'années. Peu cher, non-inflammable, non toxique, recyclable, avec une supercriticité atteinte à 31.1°C et 73.8 bars (7,4 MPa) seulement (conditions compatibles avec la catalyse biologique), le CO₂ présente donc de nombreux avantages par rapport aux solvants organiques. Au-delà de son point critique, le CO₂ est dit supercritique (Figure 1.5).

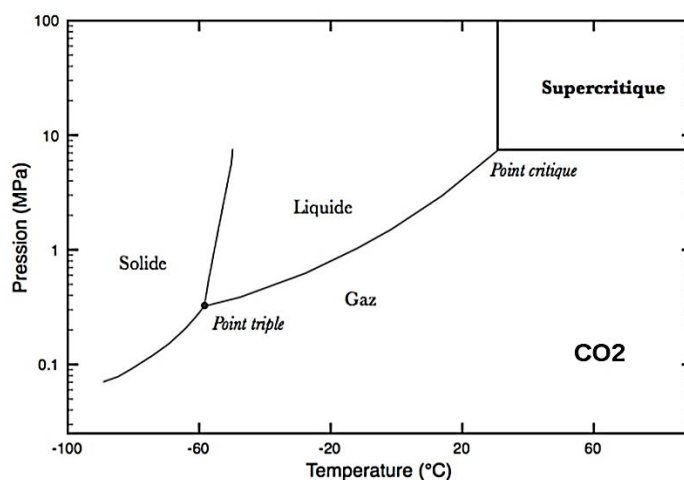


Figure 1.5: Diagramme de phase du dioxyde de carbone

Il ne s'agit pas d'un état physique même si on parle d'état supercritique mais plutôt d'un CO₂ ayant une densité pouvant être aussi élevée que celle d'un liquide (celle de l'eau par exemple égale à 1 mais aussi au-delà de 1) mais avec une viscosité et une diffusivité aussi faibles que celles d'un gaz. En jouant sur le couple pression-température, les propriétés du CO₂ supercritique peuvent être facilement ajustées et son aptitude à solubiliser des substrats et des produits réactionnels plutôt apolaires et de faible poids moléculaire peut-être grandement modifiée selon que l'on utilise un CO₂ supercritique plus ou moins dense et plus ou moins chaud. Une haute densité du CO₂, en général associée à un bon pouvoir solvant, n'est d'ailleurs pas le seul facteur à considérer en catalyse enzymatique (comme en extraction de biomolécules d'ailleurs). En effet, lorsqu'un CO₂ supercritique est chauffé à pression constante, sa densité diminue et donc, a priori, son pouvoir solvant également (et ce d'autant plus vite que la pression est basse). Mais, si les solutés sont assez volatiles, leur pression de vapeur dans le CO₂ va augmenter et faciliter leur solubilisation, compensant ainsi la moindre densité et donc le moindre potentiel de solubilisation du CO₂. C'est l'effet net de ces deux évolutions opposées, baisse de densité du CO₂ et hausse de pression de vapeur des solutés, qui va faire qu'une évolution du couple pression-température va favoriser ou non la solubilisation des substrats et produits de la réaction enzymatique et donc, a priori, la catalyse enzymatique (Celia et al., 2005; Yasmin et al., 2006)

L'activité et la stabilité de l'enzyme, sont également très sensibles à la pression et à la température du CO₂. La très grande diffusivité du CO₂ favorise le transfert des substrats réactionnels vers le site actif de l'enzyme et permet souvent d'obtenir des vitesses de catalyse supérieures à celles observées en solvants organiques. Ce milieu a, par exemple, été utilisé pour catalyser la réaction de O-acylation du 3-benzyloxypropane-1,2-diol avec de l'acétate de vinyle en tant que donneur d'acyle, par une lipase issue du pancréas de porc (Kmecz et al., 2006). La lipase B de *C. antarctica* (CALB), sous forme immobilisée par adsorption sur des billes macroporeuses de résine acrylique dont le nom commercial est Novozym 435[®], est la plus utilisée pour réaliser des réactions de synthèse en CO₂ supercritique. Cette enzyme a ainsi été utilisée pour la synthèse par transestérification de geranyl butyrate à partir de géraniol et de methylbutyrate (Varma *et al.*, 2010), pour la synthèse par estérification de citronellol laurate à partir β -citronellol et d'acide laurique (Habulin et al., 2007) ou encore pour la synthèse par transestérification d'esters méthyliques d'acides gras (biodiesel) à partir de triglycérides et de méthanol (Lozano et al., 2011).

L'utilisation de CO₂ supercritique pour la biocatalyse apparaît donc comme une technique innovante et avantageuse pour exécuter de nombreuses réactions ; cependant beaucoup reste à faire pour assurer simultanément la stabilité et l'activité catalytique de l'enzyme utilisée. Le CO₂, est par ailleurs, un mauvais solvant pour les acides aminés et peptides. Enfin, en présence d'eau, il peut former des liaisons carbamate avec les fonctions amine des acides aminés/peptides pouvant potentiellement rendre ces fonctions amine non disponibles pour la N-acylation. Il s'agira donc de tenter de lever ces verrous afin de pouvoir envisager une véritable intensification de procédé de N-acylation des AA ou peptides sous CO₂ supercritique.

2.1.2.1.5. Milieux biphasiques

Les milieux biphasiques sont la combinaison de 2 milieux non-miscibles afin de pouvoir cumuler les avantages de chacun. De plus, ce type de milieu peut être intéressant dans le cas de l'activation interfaciale existant chez certaines lipases. L'utilisation de ces milieux hétérogènes va permettre également de pallier les problèmes, coûteux et difficiles à mettre en œuvre, de séparation des substrats, produits, et biocatalyseurs, qui sont rencontrés lors de biocatalyse en milieux homogènes. Différentes combinaisons peuvent être utilisées : les systèmes biphasiques aqueux et non aqueux.

Les systèmes biphasiques aqueux sont généralement constitués d'une phase majoritaire aqueuse et d'une deuxième phase composée du donneur d'acyle. Plusieurs études ont permis de démontrer l'efficacité de ce genre de système. Par exemple, l'équipe de Vaysse a étudié l'utilisation de milieux aqueux biphasiques sans solvant organique ($a_w > 0,9$) pour catalyser des réaction d'estérification par différentes lipases (Vaysse et al., 2002). Dans cette étude, une émulsion est réalisée par sonication et stabilisée par ajout de polyvinylalcool. D'autres systèmes biphasiques sont constitués d'un solvant organique et d'une phase aqueuse afin de permettre de solubiliser des substrats de polarités différentes (Gerard, 2016; Ilmi et al., 2016; Kraai et al., 2008). La biocatalyse en milieux multiphasiques non-aqueux et sans solvant organique a été réalisée pour la première fois en 2002 par l'équipe de Lozano avec un milieu constitué de liquide ionique et de CO₂ supercritique permettant ainsi de développer des procédés chimiques entièrement verts dans des environnements non aqueux (Habulin et al., 2007; Lozano et al., 2002). L'intérêt de l'usage d'un milieu biphasique CO₂/ liquide ionique réside également, dans le fait que le CO₂ n'entraîne pas les liquides ioniques ce qui leur

permet d'enrober l'enzyme et de la rendre plus stable pendant que le CO₂ véhicule les substrats.

Dans cette mise en œuvre de milieux biphasiques, il est également important d'avoir une bonne compréhension du comportement de chacune des phases pour déterminer les conditions de température et de pression idéales pour obtenir une viscosité faible du liquide ionique ainsi qu'un bon transfert de masse (Lozano, 2010).

2.1.2.1.6. Solvants eutectiques

Les solvants eutectiques ou mélanges eutectiques profonds font partie des nouveaux solvants qui sont apparus ces dernières années avec l'émergence de la «chimie verte». Ces solvants consistent à mélanger au moins deux constituants qui peuvent s'associer par des interactions non covalentes pour former un mélange. Ces constituants sont des sels organiques (ammonium ou phosphonium) associés à des sels de métaux ou des donneurs de liaisons hydrogènes (Abbott et al., 2004). Le mélange est issu de l'association des différents constituants par des liaisons intermoléculaires non-covalentes qui sont le plus souvent des liaisons hydrogènes. La création de ce réseau va avoir pour effet de diminuer le point de fusion du mélange par rapport à ses constituants pris séparément. Contrairement aux liquides ioniques, cette préparation est facilement réalisable, peu nocive, possède une stabilité thermique et une biodégradabilité importante (Durand et al., 2015). Ces solvants possèdent également une teneur en eau très faible ce qui est un atout lorsque l'on veut réaliser des synthèses catalysées par des lipases.

Actuellement, il n'existe que peu d'études de biocatalyse dans les solvants eutectiques. En 2008 ont été réalisés pour la première fois des essais de transesterification par des lipases (Gorke et al., 2010). Les résultats obtenus avec CALB ont montré une activité plus élevée qu'avec des liquides ioniques et équivalente à celle obtenue en solvant organique. L'amélioration des performances de CALB dans les solvants eutectiques a également été observée dans le cas de méthanolyse d'huile de soja dans un mélange de chlorure de cholinium et de glycérol (Zhao et al., 2013). De plus, la même équipe a observé un impact du ratio molaire sur les performances de la réaction et la sélectivité. En effet, une diminution de la teneur en glycérol augmente l'activité thermodynamique des espèces anioniques et engendre donc une plus forte dénaturation des enzymes. D'autres travaux ont étudié l'impact

de paramètres tels que l'activité de l'eau et le pH sur des réactions catalysées par des lipases en solvants eutectiques. Les résultats obtenus ont permis de démontrer l'importance de l'hydratation des solvants eutectiques. En effet, l'augmentation de la quantité d'eau dans les solvants eutectiques engendre une augmentation de l'activité spécifique de CALB, des taux de conversion ainsi qu'une diminution de leur viscosité ce qui améliore le transfert de masse (Durand, 2013). L'ajout d'eau n'a pas provoqué de modification du pH puisque celui-ci dépend essentiellement de la nature du donneur de liaison hydrogène.

2.1.2.2. Influence de la teneur en eau

Un des principaux facteurs qui doit être maîtrisé est la teneur en eau dans le système de réaction. En effet, il existe une relation directe entre l'activité d'une lipase et la teneur en eau dans le milieu réactionnel. Afin de favoriser l'activité de synthèse plutôt que l'hydrolyse, de nombreuses études ont démontré l'importance de maintenir une activité de l'eau (a_w) inférieure à 0,1 (Humeau et al., 1998a, 1998b; Wehtje et al., 1997). Mais, pour maintenir une activité de synthèse optimale de la lipase dans un solvant organique, une teneur en eau minimale est tout de même requise. Cette condition préalable est due à l'effet de l'eau sur la polarité du site actif, sur la flexibilité de l'enzyme et sur l'équilibre thermodynamique de la réaction (Furutani et al., 1996; Klibanov, 2001). De plus, même après séchage, des molécules d'eau restent liées à l'enzyme, contribuant à garder sa structure active et à accroître son activité (Zaks and Klibanov, 1988).

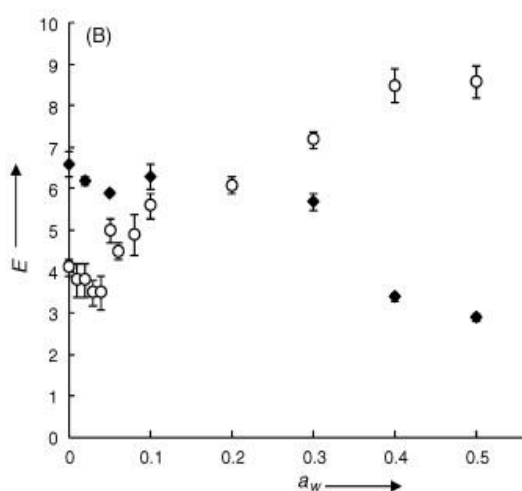
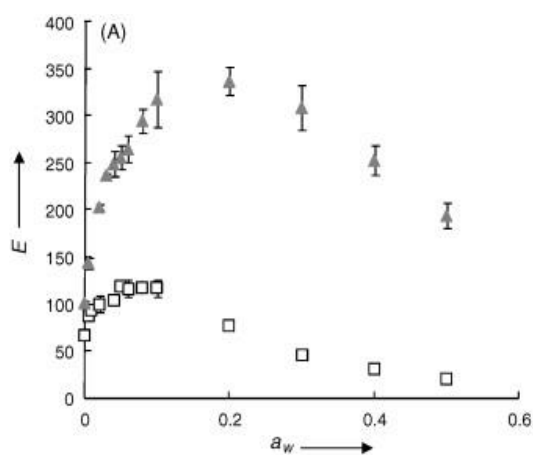
Parallèlement, une teneur en eau trop importante dans le milieu réactionnel peut empêcher la diffusion des substrats hydrophobes vers l'enzyme et augmente considérablement l'activité hydrolytique enzymatique résiduelle (Valivety et al., 1993). Afin de réduire l'impact de l'eau au cours de la réaction plusieurs techniques sont envisageables telles que l'ajout de tamis moléculaire ou la diminution de la pression pour respectivement piéger ou évaporer les molécules d'eau résiduelles (Chamouleau et al., 2001; Husson et al., 2009; Valivety et al., 1992). L'usage de tamis moléculaire perd cependant son efficacité une fois que ce dernier devient trop chargé voire saturé en eau. Des cycles de régénération ou de remplacement de ce tamis sont donc à envisager ce qui n'est pas très compatible avec un objectif de procédé performant et continu. L'usage d'un vide pour éliminer l'eau peut être très intéressant, comme l'a montré Tufveson en milieu fondu (Tufvesson et al., 2007).

Les travaux de Léonard-Nevers et al. ont porté sur l'effet de l' a_w sur l'activité et l'énantiosélectivité de CALB (Léonard-Nevers et al., 2009). Ils ont évalué l'influence de la teneur en eau ($0 < a_w < 0,5$) sur des réactions d'acylation d'alcools secondaires avec comme donneur d'acyle du propanoate de méthyle dans un réacteur lit fixe séché avec de l'azote avant de faire passer le solvant, et avec injection en continu des substrats. Les résultats obtenus ont montré un effet de l' a_w important sur l'activité et l'énantiosélectivité de CALB. La Figure 1.6.1 représente le ratio énantiomérique en fonction de l'activité de l'eau avec différents alcools comme accepteur d'acyle. Ces résultats montrent une augmentation de l'énantiosélectivité lorsque l' a_w est très faible pour le pentan-2-ol et l'hexan-2-ol. Lorsque l'activité de l'eau augmente au-delà d'un certain seuil, l'énantiosélectivité diminue excepté pour le butan-2-ol.

Dans cette étude, il a été montré que la diminution de l'énantiosélectivité était due à une augmentation défavorable du terme entropique et donc à une différence d'énergie libre d'activation. L'observation d'une augmentation puis d'une diminution de l'énantiosélectivité pour le pentan-2-ol et l'hexan-3-ol serait induite par le passage par un seuil d' a_w permettant le recouvrement complet des groupements polaires du biocatalyseur immobilisé.

Sur la Figure 1.6.2 sont représentés les rendements des réactions d'acylation en fonction de la teneur en eau. Pour le pentan-2-ol et l'hexan-3-ol, on observe une augmentation de l'activité lorsque la teneur en eau est comprise entre 0 et 0,02 puis une diminution de celle-ci. Ces résultats représentent bien l'action de l'eau comme un nucléophile compétitif voire un inhibiteur compétitif d'alcools au-delà d'un certain seuil. Ce phénomène a été confirmé par une étude de modélisation moléculaire (Léonard et al., 2007).

(1)



(2)

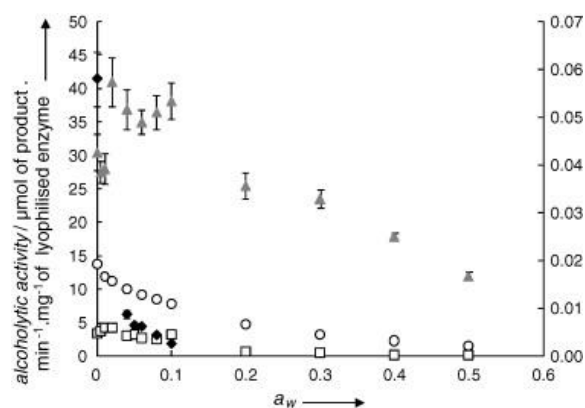


Figure 1.6: Influence de l'activité thermodynamique de l'eau, a_w , (1) sur l'énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* pour l'acylation du pentan-2-ol (▲) et de l'hexan-3-ol (□) A du butan-2-ol (○) et de l'octan-4-ol (◆) B avec le méthyl propanoate comme donneur d'acyle. (2) sur l'activité acyltransferase L l'échelle de droite se réfère à l'octan-4-ol.

2.1.2.3. Influence de l'état d'ionisation

Au cours de l'acylation enzymatique d'acides aminés ou de peptides, un complexe ionique peut être établi entre le substrat aminé et les acides gras libres. En effet, si le groupement amine de l'accepteur d'acyle est protoné il va pouvoir interagir avec la fonction carboxylate des acides gras par des interactions électrostatiques. Cet état d'ionisation a été démontré lors de réactions d'acylation dans l'hexane de la N-méthyl-glucamine, avec différents acides gras, catalysées par la lipase de *Rhizomucor miehei*. Il a également été observé que plus le ratio accepteur/donneur d'acyle est faible, plus la population de molécules aminées est impliquée dans la paire d'ions (Maugard et al., 1997, 1998). Dans ce cas, la formation de ce complexe ionique, détectée par spectroscopie infrarouge, peut induire une meilleure solubilisation des

substrats polaires dans un solvant organique anhydre, conduisant à une meilleure disponibilité du substrat. Dans une autre étude, la formation d'un complexe semblable n'a eu aucun effet sur la solubilité du substrat (6-amino-1-hexanol) dans le solvant 2-méthyl-2-butanol (Husson et al., 2008). Parfois, la formation d'un complexe ionique conduit à un complexe insoluble limitant considérablement la disponibilité des substrats de l'enzyme (Fernández-Pérez and Otero, 2003, 2001)

. L'état de protonation des substrats aminés peut affecter la réactivité du groupement amine et donc la chimio-sélectivité de l'acylation. Cela a été démontré dans une étude concernant l'acylation de Lys-Ser, HCl catalysée par CALB en présence d'acide oléique dans du 2-méthyl-2-butanol. Pour pallier cette contrainte, les auteurs ont ajouté un grand excès de triéthylamine (base organique tertiaire) dans le milieu réactionnel permettant ainsi une augmentation du rendement pouvant atteindre $36 \pm 5 \%$ (Husson et al., 2009).

En solvant organique, (2-méthyl-butanol ou hexane) l'utilisation d'une base amine tertiaire, la diisopropylethanolamine permet de libérer la vanillylamine de son sel d'hydrochloride afin de synthétiser de la vanillyloleamide en présence d'acide oléique catalysé par CALB (Reyes-Duarte et al., 2002). Les complexes ioniques peuvent également se former en milieux non-conventionnels tels que les systèmes sans solvant et les liquides ioniques (Irimescu et al., 2004; Tufvesson et al., 2007).

2.1.2.4. Impact de la température

La température est un paramètre important pour les réactions enzymatiques. En effet, chaque enzyme possède un intervalle de température avec un optimum pour son activité catalytique. Les enzymes possèdent toutes une résistance plus ou moins grande aux températures extrêmes. A température trop élevée, des phénomènes de dénaturation de l'enzyme peuvent être observés, accompagnés par une perte d'activité de l'enzyme. Ces dénaturations sont en général endothermiques (consommation d'énergie pour vaincre certaines liaisons hydrogène permettant de stabiliser la structure 3D de l'enzyme) et l'enthalpie massique de dénaturation ainsi que la température de dénaturation (melting point temperature, T_m) peuvent-être étudiés précisément par calorimétrie différentielle. Il faut noter que les dénaturations sont plus ou moins réversibles ce qui signifie que, à la faveur d'un refroidissement, les protéines peuvent subir un refolding plus ou moins partiel et montrer un potentiel catalytique résiduel lui-même

plus ou moins important. La bonne stabilité thermique de CALB a déjà été démontrée dans de nombreuses études et des activités à des températures supérieures à 100°C, voire 150°C en liquide ionique et CO₂ supercritique ont été observées (Lozano et al., 2003; Turner and Vulfson, 2000). Un lien a été mis en évidence entre l'inactivation thermique et la teneur en eau. En effet, en milieu non-aqueux, la quantité d'eau résiduelle dans la cavité catalytique de l'enzyme va varier avec la température (Kiran et al., 2001). L'effet de la température peut également favoriser la solubilisation des substrats.

2.1.2.5. Influence des substrats

La nature des substrats peut avoir une influence importante sur les réactions. Dans le cas de l'acylation, le co-produit va différer en fonction du donneur d'acyle. En effet si le donneur d'acyle est un acide gras, le co-produit sera une molécule d'eau alors que dans le cas de l'utilisation d'ester, une molécule d'alcool sera formée. La différence de co-produit va avoir un impact sur le rendement de la réaction car l'apparition de molécules d'eau va engendrer l'apparition d'hydrolyse contrairement à la présence d'alcool (Villeneuve, 2007). Plusieurs facteurs peuvent agir sur les propriétés thermodynamiques du substrat. La longueur de chaîne du substrat est l'un de ces facteurs. En effet, en fonction du nombre de carbone composant leur chaîne, les acides gras saturés vont avoir des températures de fusion pouvant aller de -37 à +70°C (dans la plage C8-C18). De plus, les insaturations vont également avoir un impact sur les propriétés des acides gras.

L'équipe de Vaysse a étudié l'impact de la longueur de la chaîne de différents acides gras sur des réactions de synthèse avec sept lipases différentes à 30°C et 50°C (Vaysse et al., 2002). Les réactions ont été réalisées avec un mélange d'acide gras dans du méthanol. Les résultats obtenus ont montré des profils de spécificité de longueur de chaîne différents en fonction de l'enzyme ainsi que des préférences dépendant de la température de réaction. Il a été observé que l'estérification des acides gras à chaînes courtes (C8-C10) est plus lente que dans le cas des chaînes longues (C12-C18). Pour la plupart des lipases, l'estérification de l'acide caprylique est presque nulle, probablement en raison d'un phénomène de solvation plus important pour les chaînes courtes ce qui déplacerait sélectivement l'équilibre de la réaction vers leur l'hydrolyse. Cette étude a également montré l'impact d'une meilleure solubilité des acides gras à longue chaîne (plus de 14 carbones), quand la température dépasse leur point de fusion (Tableau 1.2).

Les résultats sont représentés sous la forme d'une constante de spécificité ($1/\alpha$) définie selon l'équation suivante :

$$\frac{1}{\alpha} = \frac{\log([x]_t/[x]_0)}{\log([reference]_t/[reference]_0)}$$

avec $[x]_0$ et $[x]_t$ la concentration molaire d'un substrat en fonction de la référence qui est le meilleur résultat obtenu avec le même substrat initiale et à un temps t

Ces auteurs expliquent également l'effet de la température par une rigidité trop importante des acides gras de C14 à C18 à des températures inférieures à leur point de fusion même si la présence des chaînes courtes permet une co-solubilisation.

Tableau 1.2: Constantes de spécificité de l'estérification de différents acides gras à 30°C et 50 C en présence de 0.125 U de CALB (Vaysse et al., 2002)

	C8	C10	C12	C14	C16	C18
30°C	0,00	0,06	1,00	0,68	0,31	0,23
50°C	0,00	0,18	0,95	1,00	0,95	0,88

D'autres études font part de l'effet de la longueur de chaîne carbonée du donneur d'acyle lors de réactions d'acylation de flavonoïde catalysées par CALB. Les résultats de ces études indiquent que les meilleurs rendements sont obtenus avec les chaînes courtes et qu'au-delà de 12 carbones aucun effet n'est observé (Melika Ardhaoui et al., 2004; Katsoura et al., 2006; Salem et al., 2010). Dans le Tableau 1.3 sont indiqués quelques exemples de réactions d'acylation réalisées sur des acides aminés et des peptides en milieu non aqueux.

Tableau 1.3: Acylation enzymatique en milieu non-aqueux

Acylation enzymatique en milieu non-conventionnel						
Avec pré-modification structurale			Sans pré-modification structurale			
Acide amines/peptides	Agent acylant	Milieu réactionnel	Enzyme	Sélectivité	Référence	
B-Ala-His	Acide oléique	2-méthyl-2-butanol	CALB immobilisée	O-acylation	(Husson et al., 2011)	
		2-méthyl-2-butanol				
		[BMIM] ⁺ [PF6] ⁻				
Ser-Leu	Acide oléique	Système sans solvant	CALB immobilisée	N-ε-acylation	(Husson et al., 2009)	
		2-méthyl-2-butanol				
L-lysine	Acide palmitique ou oléique	Hexane	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	N-ε-acylation	(Soo et al., 2004)	
		Système sans solvant	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	N-ε-acylation	(Montet et al., 1990)	
L-lysine	Acide oléique	ester, hexane	CALB immobilisée	O-acylation	(Zhang et al., 2005)	
		2-méthyl-2-propanol				
Serinamide, threoninamide	Acide laurique	2-méthyl-2-butanol	CALB immobilisée	O-acylation	(Izumi et al., 1997)	
β-Alanine ethylester	methyl laurate	Dioxane	CALB immobilisée	N-α-acylation	(Izumi et al., 1997)	
α-carbobenzoyloxy-serine	myristic acid ou myristic methyl ester	Système sans solvant	CALB immobilisée	O-acylation	(Valivety et al., 1997)	
		ter-amyl alcool				
L-Phe-L-Ser-NH-O-N-anh	ester trifluoroethyl acetate	acetonitrile	lipases de <i>Pseudomonas cepacia</i> and <i>Aspergillus niger</i>	O-acylation	(Gardossi et al., 1991)	
L-Ala-α-L-Lys-O-t-Bu						
L-Phe-α-L-Lys-O-t-Bu						

2.1.3. Enzymes catalysant la réaction d'acylation en milieu aqueux

Il existe des enzymes capables de catalyser l'acylation en milieu aqueux. Les milieux aqueux utilisés pour les réactions d'acylation enzymatique sont souvent des solutions tamponnées qui vont permettre de maintenir le pH tout au long de la réaction. Différentes classes d'enzymes ont la capacité de catalyser une réaction d'acylation en milieu aqueux telles que les aminoacylases (EC 3.5.1), les carboxyl-estérases (EC 3.1.1) ou les acyl-transférases (EC 2.3.1). L'acylation enzymatique en milieu aqueux est intéressante, car les substrats peptidiques y possèdent une meilleure solubilité.

Les aminoacylases représentent une classe d'enzymes d'intérêt pour réaliser la synthèse d'acides aminés acylés. De nombreuses sous-classes constituent le groupe des aminoacylases. Les pénicillines acylases sont les plus étudiées. La pénicilline G acylase est l'une des plus utilisées dans l'industrie pour la production d'antibiotiques tels que les β -lactamines polysynthétiques. De plus, cette enzyme catalyse l'hydrolyse de la liaison amide de la pénicilline G ce qui permet la synthèse de l'acide 6-aminopénicillanique qui est utilisé comme précurseur pour la production des pénicillines semi-synthétiques (Avinash et al., 2016). Les acylases I ont également été beaucoup étudiées. Elles sont notamment capables d'hydrolyser les N- α -acyl acides aminés ou encore de catalyser la synthèse d'acides aminés acylés en milieux bi-phasiques (Wada et al., 2002).

Le Tableau 1.4 synthétise les différentes enzymes appartenant à la sous-classe (EC 3.5.1) des aminoacylases ainsi que leur activité.

Tableau 1.4: Classification de quelques aminoacylases (LC= longue chaîne)

EC 3.5.1.11	Pénicilline amidohydrolase ; Pénicilline acylase ; ampicilline acylase	Pénicilline + H ₂ O ↔ carboxylate + 6-aminopénicillanate
EC 3.5.1.14	Acylase I ; L-amino-acylase; Acylase; Amino-acylase I	N-acyl-L-amino acide + H ₂ O ↔ carboxylate + L-amino acide
EC 3.5.1.15	Amino-acylase II ; Acylase II ; Aspartoacylase	N-acyl-L-aspartate + H ₂ O ↔ carboxylate + L-aspartate
EC 3.5.1.17	Acyl-lysine désacylase ; N-acyl-Lamidohydrolase	N-acyl-L-lysine + H ₂ O ↔ carboxylate + L-lysine
EC 3.5.1.60	N-(LC- acyle) : -ethanolamine désacylase -éthanolamine amidohydrolase.	N-(longue chaîne acyle)-éthanolamine + H ₂ O ↔ carboxylate à LC + éthanolamine
EC 3.5.1.71	N-féruoylglycine : -désacylase -amidohydrolase	N-féruoylglycine + H ₂ O ↔ férulate + glycine
EC 3.5.1.81	N-acyl-D-acide aminé : -désacylase -amidohydrolase.	N-acyl-D-amino acide + H ₂ O ↔ acide + D-amino acide
EC 3.5.1.82	N-acyl-D-glutamate/ -désacylase -amidohydrolase	N-acyl-D-glutamate + H ₂ O ↔ carboxylate + D-glutamate
EC 3.5.1.83	N-acyl-D-aspartate -désacylase -amidohydrolase.	N-acyl-D-aspartate + H ₂ O ↔ carboxylate + D-aspartate
EC 3.5.1.93	Céphalosporine C acylase; Glutaryl-7-ACA acylase; Céphalosporine acylase	(7R)-7-(4-carboxybutanamido) céphalosporanate + H ₂ O ↔ (7R)-7-aminocéphalosporanate + glutarate
EC 3.5.1.55	N-acyl-D-glutamate désacylase ; acide gras à LC-L-glutamate amidohydrolase.	N-acyl à longue chaîne-Lglutamate + H ₂ O ↔ carboxylate à longue chaîne + Lglutamate
EC 3.5.1.97	Acyl-homosérine-lactone acylase	N-acyl-L-homosérine lactone + H ₂ O ↔ L-homosérinelactone + carboxylate

2.1.3.1. Mécanisme enzymatique des aminoacylases

Les aminoacylases appartiennent à différentes superfamilles. Chaque superfamille se caractérise par des résidus catalytiques spécifiques, conduisant à différents mécanismes catalytiques. Certaines superfamilles regroupent des enzymes dont le mécanisme fait intervenir des ions métalliques et d'autres non.

2.1.3.1.1. Mécanisme catalytique sans ions métalliques

Certaines aminoacylases appartiennent à la superfamille de Ntn-hydrolase, telles que, l'acyle homosérine acylase, la pénicilline acylase et la céphalosporine acylase. Les enzymes de cette superfamille se caractérisent par une même organisation de la structure secondaire du domaine catalytique, malgré une homologie des séquences très faible. Elles présentent des mécanismes catalytiques probablement similaires. Toutefois, le trou oxyanionique (les résidus responsables de la stabilisation de l'oxygène de carbonyle de la liaison amide) et la liaison site actif-substrat différent partiellement. Ces hydrolases se caractérisent par un résidu nucléophile N-terminal, incorporé dans une chaîne β . Ce résidu peut être une sérine, une cystéine ou une thréonine (Brannigan et al., 1995; Oinonen and Rouvinen, 2000).

Le mécanisme catalytique des Ntn-hydrolases se caractérise par un seul nucléophile catalytique qui attaque le carbone de la liaison amide par son groupe hydroxyle de la chaîne latérale ou le groupe thiol. De même, il joue le rôle d'une base qui accepte le proton de l'agent nucléophile. Au cours des étapes intermédiaires de l'acylation ou de l'hydrolyse, des résidus s'engagent avec le produit de chaque étape, par des liaisons hydrogènes pour la stabilisation du système (Figure 1.7) (Oinonen and Rouvinen, 2000).

D'autres auteurs ont montré que le mécanisme de certaines pénicillines acylases nécessite la présence d'une molécule d'eau qui joue le rôle d'une base (Duggleby et al., 1995).

Le résidu nucléophile pour la pénicilline acylase est une sérine. Ce résidu attaque le carbone de la liaison amide. Mais, pour cette enzyme, une molécule d'eau joue le rôle d'une base. De plus, deux résidus, asparagine et valine, forment le trou oxyanionique qui sert à stabiliser les intermédiaires de la réaction (Duggleby et al., 1995). Les mêmes résidus forment le trou oxyanionique dans le cas de l'hydrolyse catalysée par une acyle homosérine lactone acylase (Bokhove et al., 2010).

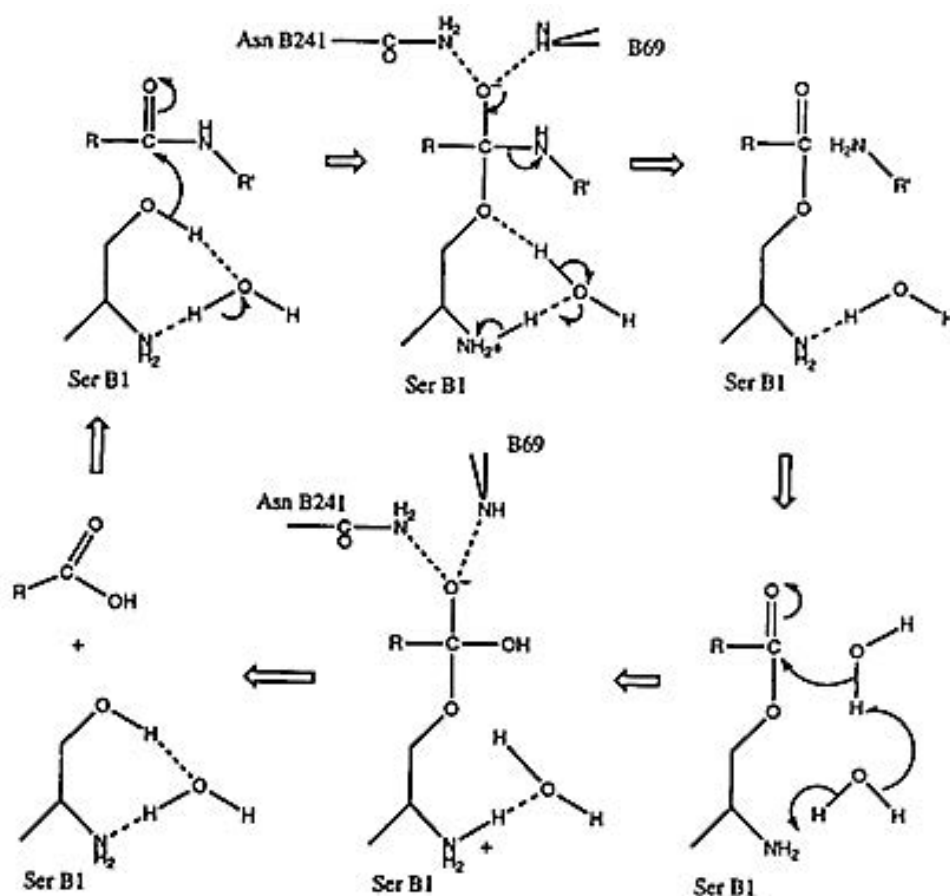


Figure 1.7 : Mécanisme catalytique de la pénicilline acylase (Duggleby et al., 1995)

2.1.3.1.2. Mécanisme catalytique avec ions métalliques

Certaines amino-acylases appartiennent aux superfamilles des métallo-hydrolases et des zincpeptidases. Généralement, ces enzymes utilisent un ion de zinc et une molécule d'eau comme nucléophile et un résidu comme une base. Ces superfamilles se caractérisent par la présence d'un ou deux ions de zinc dans le domaine catalytique. Le mécanisme des enzymes possédant un seul ion de zinc est représenté dans la Figure 1.8.

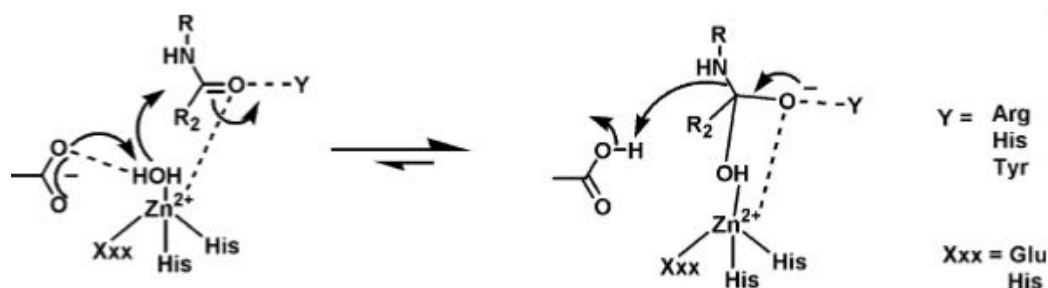


Figure 1.8 : Mécanisme catalytique des metalloprotéases (Hernick and Fierke, 2005)

Le carbonyle du substrat est polarisé par l'ion de zinc et par un glutamate. Ce résidu joue le rôle d'un catalyseur basique qui active l'attaque de la liaison entre le zinc et la molécule d'eau. Cet ion de zinc est stabilisé par une molécule d'eau, deux histidines et un autre résidu de l'enzyme (Glu ou His) (Hernick and Fierke, 2005).

D'autre part, le mécanisme catalytique général des métalloprotéases comportant deux ions de zinc est similaire à celui des métalloprotéases comportant un seul ion de zinc. Les métalloprotéases mononucléaires utilisent un résidu et un ion de zinc pour stabiliser l'état de transition et l'intermédiaire tétraédrique alors que les enzymes binucléaires utilisent un deuxième ion de zinc pour la stabilisation. Le mécanisme catalytique avec deux ions de zinc est représenté dans la Figure 1.9.

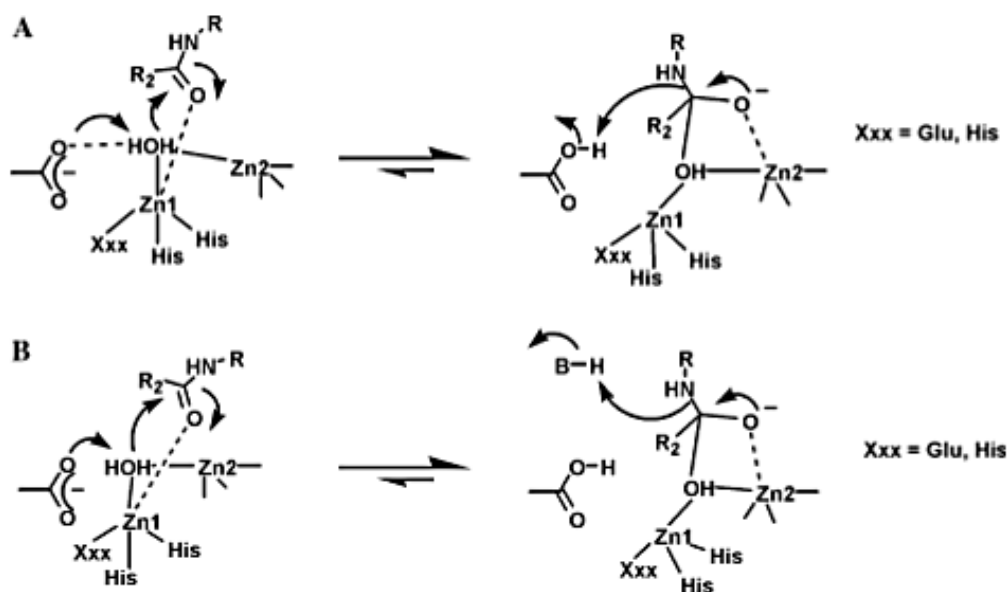


Figure 1.9 Mécanisme catalytique des hydrolases binucléaires (2Zinc) en utilisant (A) GABC bifonctionnel ou (B) paire de GABC (Hernick and Fierke, 2005)

D'autre part, pour ce groupe d'enzymes, certains mécanismes utilisent un seul résidu comme catalyseur basique et acide (GABC (general acide basic catalysis) bifonctionnel) et d'autres utilisent un résidu comme catalyseur basique et un autre résidu comme catalyseur acide (paire de GABC). Les types de résidus qui sont en liaison avec l'ion de zinc catalytique diffèrent selon la famille d'enzyme. Le Tableau 1.5 montre des exemples de familles et les résidus catalytiques correspondants.

Tableau 1.5 : Classification des métalloprotéases (Rawlings and Barrett, 2013)

Classe	Famille	Clans	Résidus catalytique
Métallo (EC3.4.24)	M1-M51	MA (M1,2, 4,5,9,13,30,36,48)	His, Glu, His
		MB (M6-8, 10-20)	His, His /asp
		MC (M14)	His, Glu, His
		MC (M15)	His, His, Asp
		ME (M16, 44)	His, Glu, His
		MF (M17)	Lys, Asp, Glu
		MF (M24)	Asp, His, Glu
		MH (M18, 20, 25, 28, 40, 42)	His, Asp, Glu

2.1.3.2. La recherche de nouveaux biocatalyseurs : les aminoacylases de *Streptomyces mobaraensis*

Entre 2005 et 2009 l'équipe de Koreishi a réalisé une recherche d'enzymes de type acylase chez le microorganisme *Streptomyces mobaraensis*. Plusieurs acylases ont pu être découvertes. Dans le Tableau 1.6 sont répertoriées les caractéristiques des aminoacylases découvertes chez cette bactérie.

Tableau 1.6: Caractéristiques des aminoacylases de *S. mobaraensis*

Nom	Classe	Structure	Taille (kDa)	Co-facteurs	Conditions optimales	Références
Aminoacylases (Sm-AA)	Peptidases M20	monomère	55	Zn ²⁺ /Ni	50°C pH : 7-8	(Koreishi et al., 2009b)
Aminoacylase			100	Co ²⁺	60°C pH : 5,5-7,5	(Koreishi et al., 2005a)
ε-lysine acylase (Sm-ela)			56	Co ²⁺ / Zn ²⁺	55°C pH 8-9	(Koreishi et al., 2005b)
Penicilline V acylase	β-Lactam acylase	dimère	19 + 61	Co ²⁺	55°C pH 7,5-8,5	(Koreishi et al., 2006)

2.1.3.2.1. N-acyl-L-amino-acide amidohydrolase

La première acylase découverte chez *S. mobaraensis* est une N-acyl-L-amino-acide amidohydrolase qui fait partie des métallo-enzymes (Koreishi et al., 2005a). L'originalité de cette enzyme est sa spécificité d'hydrolyse de tous les L-acides aminés N- α -acétylés à l'exception de la N-acétyl-proline. Même dans le cas de la L-lysine, l'hydrolyse est réalisée spécifiquement en position α . Cette aminoacylase est également capable de catalyser des réactions de synthèse en jouant sur les conditions de réaction. En effet, un ajout de 70% de glycérol à un tampon réactionnel à 37°C et pH 7 a permis d'observer la catalyse d'une synthèse entre des dérivés d'acide férulique et des acides aminés. Le Tableau 1.7 indique les rendements de conversion obtenus pour différents donneurs d'acyle avec de la L-lysine comme accepteur d'acyle, le meilleur rendement ayant été obtenu avec l'acide hydrocinnamique avec 43,2% de conversion.

Tableau 1.7 : Rendement de synthèse de L-lysine α -acylée avec différents dérivés d'acide férulique utilisés comme donneurs d'acyle après 48h de réaction (Koreishi et al., 2005a)

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

2.1.3.2.2. ϵ -lysine acylase

L' ϵ -lysine acylase de *S. mobaraensis* (Sm-ELA), possède une activité catalytique spécifiquement orientée vers la liaison amide en position ϵ de N ϵ -acyl-L-lysines et réalise également la synthèse de N- ϵ -acyl-L-lysine en présence de groupements acyles aromatiques et aliphatiques (Koreishi et al., 2005b). Dans cette étude, l'impact de la longueur de la chaîne

carbonée des donneurs d'acyl a été étudié. Les différents rendements obtenus sont représentés dans le Tableau 1.8. Ils indiquent que la longueur et la nature des acides gras a un effet sur l'efficacité de la synthèse de dérivés N- ϵ -acyl-L-lysine. En effet, les rendements avec les acides gras linéaires à courte chaîne (C10, C12, C14) sont meilleurs par rapport à ceux obtenus avec des acides gras à chaîne plus longue et que les acides organiques, benzoïque et cinnamique.

Tableau 1.8: Rendement de synthèse de la lysine en N-acyl-lysine catalysé par Sm-eLA (Koreishi et al., 2005b)

Donneur d'acyl	Rendement (%)	Durée de la réaction (h)
Acide benzoïque (C7)	Inférieur à 1	24
Acide octanoïque (C8)	58,7	72
Acide cinnamique (C9)	5,2	2
Acide caprique (C10)	100	24
Acide laurique (C12)	100	4
Acide myristique (C14)	100	24
Acide palmitique (C16)	Inférieur à 5	72
Acide stéarique (C18)	Inférieur à 5	72
Acide linoléique (C18:2)	58,9	72

2.1.3.2.3. Pénicilline V acylase

L'étude de la pénicilline V acylase (Sm-PVA) découverte chez *S. mobaraensis* a montré que celle-ci réalise l'hydrolyse de liaison amide de divers acides aminés / peptides N-acylés ainsi que leur synthèse avec une régio-sélectivité pour le groupement amine situé sur le carbone en position ϵ de la lysine des peptides (Koreishi et al., 2007). De plus, cette acylase appartient aux groupes des β -lactame acylases et possède une activité hydrolytique vis-à-vis de Pen V, NIPOAB et Pen G en plus de la capsaïcine ainsi qu'une absence d'activité vis-à-vis de l'ampicilline et de la céphalosporine C (Zhang et al., 2007) (Figure 1.10).

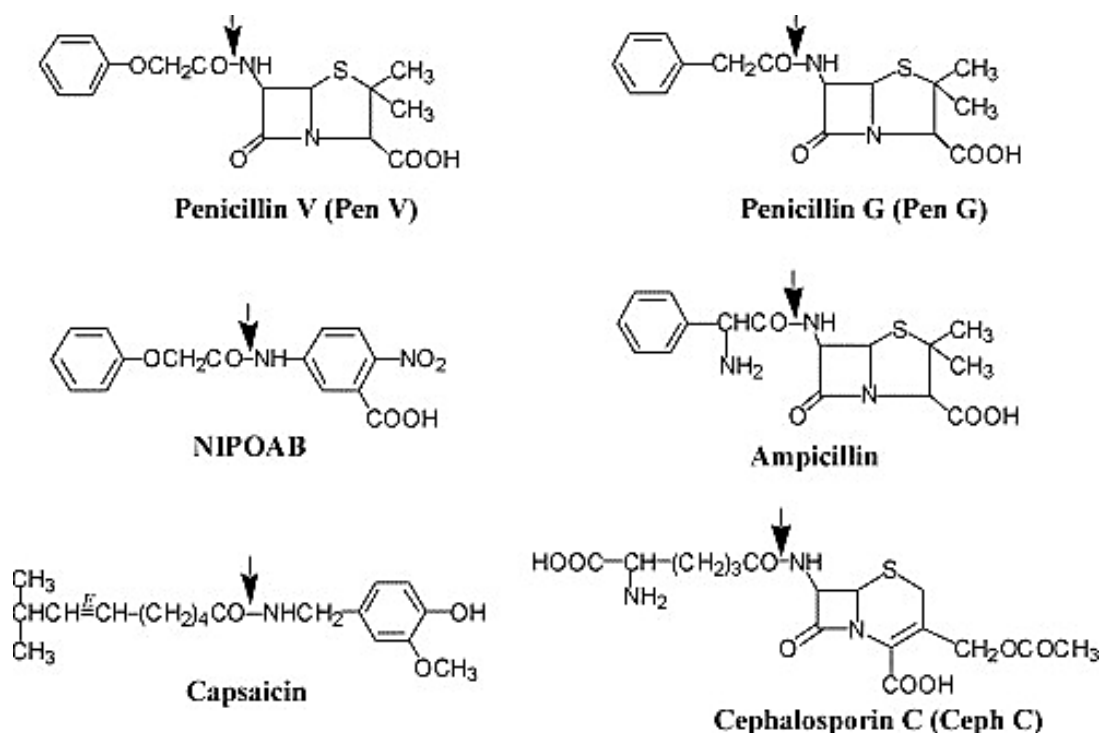


Figure 1.10 : Structure des substrats de la pénicilline acylase de *S. mobaraensis*. La flèche indique la liaison amide de chaque substrat (Zhang et al., 2007)

2.1.3.2.4. Acylase Sm-AA

En 2009, l'équipe de Koreishi décrit la découverte d'une aminoacylase, Sm-AA (Koreishi et al., 2009b). Ce monomère de 55kDa est une métalloenzyme ; cela a été vérifié en réalisant l'ajout de 1,10-phénanthroline, une molécule formant des complexes avec les ions métalliques : la perte d'activité a permis de confirmer la nature de cette enzyme. Il a été également observé que Sm-AA nécessite plus particulièrement la présence d'ions Zn^{2+} ou Ni^{2+} . Les conditions optimales de la réactivité de Sm-AA ont aussi été étudiées. Un pH d'environ 7,5 ainsi qu'une température de 50°C semblent permettre une meilleure activité de l'enzyme. Le Tableau 1.9 représente la spécificité de substrat de Sm-AA pour l'hydrolyse de L-acides aminés N-acétylés ou N-lauroylés. Ces résultats indiquent des activités hydrolytiques en faveur des acides aminés N-acétylés par rapport au N-lauroylés. Les meilleures activités ont été obtenues avec les dérivés de méthionine, d'alanine et de cystéine. Le

Tableau 1.10 représente les résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'impact de la longueur de la chaîne carbonée lors de l'hydrolyse de différents L-acides aminés N-acétylés. Ces résultats montrent que Sm-AA est capable d'hydrolyser une large gamme de longueurs de chaîne carbonée.

Tableau 1.9 : Spécificité de substrat de Sm-AA recombinant (Koreishi et al., 2009b)

Acide aminé	Activité spécifique (U ^a .mg ⁻¹)	
	N-acétyl-amino acide ^b	N-lauroyl-amino acide ^c
L-Arg	66	4
L-Hist	59	6
L-Ala	194	96
L-Asn	31	6
L-Cys	412	17
L-Leu	60	0
L-Met	530 (173^c)	72

^a Une unité a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour hydrolyser 1 μ mole de substrat dans le tampon A en 1 minute à 37 ° C et pH 7,5

^b Concentration en substrat, 15 mM

^c Concentration en substrat, 3 mM

Tableau 1.10: Activité spécifique d'hydrolyse de Sm-AA pour différents substrats à base de méthionine (Koreishi et al., 2009b)

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

^a Une unité est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à l'hydrolyse d'1 μ mole de substrat en 1 minute à 37°C et pH 7,5

2.1.3.3. Paramètres influençant les réactions enzymatiques en milieu aqueux

2.1.3.3.1. pH / température

En milieu aqueux, le pH et la température sont deux paramètres très importants à maîtriser. Le couple pH / température va avoir un impact sur les biocatalyseurs et leur activité mais également sur les substrats. Il est donc important de connaître le couple pH / température

optimal pour obtenir la meilleure activité enzymatique. Chaque biocatalyseur va posséder un pH et une température optimale comme on peut le voir dans le Tableau 1.6 présenté plus haut et dans lequel sont indiquées les caractéristiques des acylases de *S. mobaraensis*. Concernant les substrats, le pH et la température vont agir sur leur état d'ionisation et donc influencer leur réactivité.

2.1.3.3.2. Co-activateur / inhibiteur

Certaines enzymes requièrent l'intervention de co-activateur pour pouvoir réagir. C'est le cas des amino-acylases métallo-dépendantes qui nécessitent la présence d'ions métalliques. Le rôle de ce co-activateur qui est souvent un ion zinc ou cobalt n'est pas clairement défini à l'heure actuelle (Koreishi et al., 2005b, 2005a, 2006, 2009b). Un excès d'ions peut également induire une inactivation de l'enzyme en raison d'interactions non spécifiques (Koreishi et al., 2005b). Des molécules peuvent également être responsables de l'inhibition de l'activité des aminoacylases. Dans une étude de Koreishi concernant la N- ϵ -acyl-L-lysine acylase issue de *S. mobaraensis*, un agent chélatant, le 1,10-phénanthroline, a été utilisé pour inhiber l'enzyme (Koreishi et al., 2005b). La perte d'activité s'élève à 90%. En 2009, une nouvelle investigation a étudié l'effet de l'excès en acide laurique sur la synthèse de N- ϵ -acyl-L-lysine. Une baisse des vitesses initiales de synthèse de lysine acylée a alors été observée. Ceci a été confirmé lors de la mise en œuvre d'un réacteur semi-continu avec ajout progressif d'acide laurique. En effet cette réaction a donné lieu à une amélioration de la vitesse initiale de cette réaction (Koreishi et al., 2009a). Dans le

Tableau 1.11 sont indiqués quelques exemples de réactions d'acylation d'acides aminés et de peptides en milieu aqueux. Dans cette première partie les paramètres importants pour l'étude à l'échelle réactionnelle ont été évoqués. Cependant, les études expérimentales ne permettent pas de répondre à certaines questions plus fondamentales telles que : quelles sont les causes de la sélectivité d'une enzyme pour un substrat particulier, quel est le mécanisme réactionnel au niveau du site actif, quelles sont les interactions des substrats avec des résidus du site actif ? En revanche, les simulations par modélisation moléculaire permettent de réaliser des études plus fondamentales et d'apporter des éléments de réponse aux questionnements sur les mécanismes catalytiques.

La partie suivante de ce chapitre bibliographique concerne les principales approches permettant de réaliser une étude à l'échelle moléculaire illustrée par des exemples concrets.

Tableau 1.11 : Acylation en milieu aqueux

Acide amines/peptid	Agent acylant	Milieu réactionnel	Enzyme		Sélectivité	Référence
Acides aminés	Acide gras	Tampon aqueux + glycérol	Acylase I de pig kidney		N-acylation	(Wada et al., 2002)
DL-phenylalanine	phenylacetamide		pénicilline G acylase de <i>Alcaligenes faecalis</i>		N-acylation	(Gong et al., 2011)
			acyl-transférase de <i>Candida parapsilosis</i>		N-acylation	(Husson et al., 2011)
B-Ala-His	Acide oléique/ethyl oleate	Tampon aqueux	enzyme de <i>Streptomyces mobaraensis</i>		N-ε-acylation	(Koreishi et al., 2005b, 2005a)
L-Lysine	Acide laurique		enzyme de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		N-α-acylation	(Towler and Glaser, 1986)
Asn-Ala-Ala-Ala-Arg	Acide myristique		Extrait cellulaire de <i>Escherichia coli</i> K12		N-α-acylation	(Krishna et al., 1971)
L-phenylalanine	acetyl-CoA		extrait de foie de bœuf		N-ε-acylation	(Paik and Kim, 1964)

2.2. Échelle moléculaire : les principales approches de modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire est une technique qui fait appel à de nombreuses disciplines telles que la biologie, la chimie et la physique dont les lois ont été utilisées pour créer des programmes informatiques capables d'étudier le comportement de systèmes moléculaires. La modélisation trouve de plus en plus d'applications comme par exemple l'étude de matériaux, le développement de nouvelles molécules médicamenteuses ou encore la compréhension et la prédiction de la sélectivité de réactions enzymatiques. Les principaux outils de modélisation moléculaire ainsi que quelques applications sur CALB sont décrites dans cette partie.

2.2.1. Structure de CALB

Au point de départ du développement des techniques de modélisation moléculaire, il y a l'élucidation de nombreuses structures tridimensionnelles de biomolécules telles que des protéines par des techniques de cristallographie et de résolution structurale (Mala and Takeuchi, 2008). La première approche de détermination de la structure d'une enzyme est la cristallographie par rayons X. La lipase de *Rhizomucor miehei* fut la première structure de lipase étudiée par rayons X (Brady et al., 1990). De nombreuses stratégies d'obtention de cristaux existent actuellement mais le phénomène de cristallisation macromoléculaire est encore mal compris (McPherson, 1990). En effet, il n'existe pas de règles pour déterminer les conditions de cristallisation d'une protéine, celles-ci doivent être déterminées expérimentalement. La méthode de cristallographie par rayons X permet une analyse précise de la structure de la macromolécule étudiée par le passage d'un faisceau de rayons X qui est réfléchi par des plans régulièrement espacés d'un seul cristal, produisant un diagramme de diffraction. L'élucidation des structures tridimensionnelles de protéines d'intérêt est la première étape vers des études de modélisation plus précises permettant de mieux comprendre comment ces biomolécules interagissent. Cependant la modélisation comparative utilisant des structures homologues de la protéine cible peut être utilisée en cas d'absence de structure tridimensionnelle.

La structure de la lipase B de *Candida antarctica* (CALB) a été élucidée par cristallographie et diffraction aux rayons X pour la première fois en 1994 par Uppenberg (Jonas Uppenberg et al., 1994). Celle-ci possède un poids moléculaire de 33 kDa, est composée de 317 résidus et est co-cristallisée avec la N-acétyl-D-glucosamine et 286 molécules d'eau (1TCA sur Protein

Data Bank). La structure centrale de CALB est composée de 7 feuillets β dont le premier est antiparallèle aux six autres. 10 hélices α et 15 segments de boucle séparent ces 10 feuillets β centraux. À l'extrémité C-terminale de la protéine, 2 autres feuillets β adoptent une conformation en épingle à cheveux (Figure 1.11). Dans la base de données Protein Data Bank il existe à présent plusieurs structures disponibles co-cristallisées avec différentes molécules telles que 1LBS où l'enzyme cristallisée est liée de manière covalente au niveau de la sérine 105 de la triade catalytique avec un inhibiteur irréversible, le N-hexylphosphonate-éthyl-ester. Le RMSD (root mean square deviation) calculé sur les carbones α entre les structures 1TCA et 1LBS est de 0,33 Å, ce qui indique des conformations similaires.

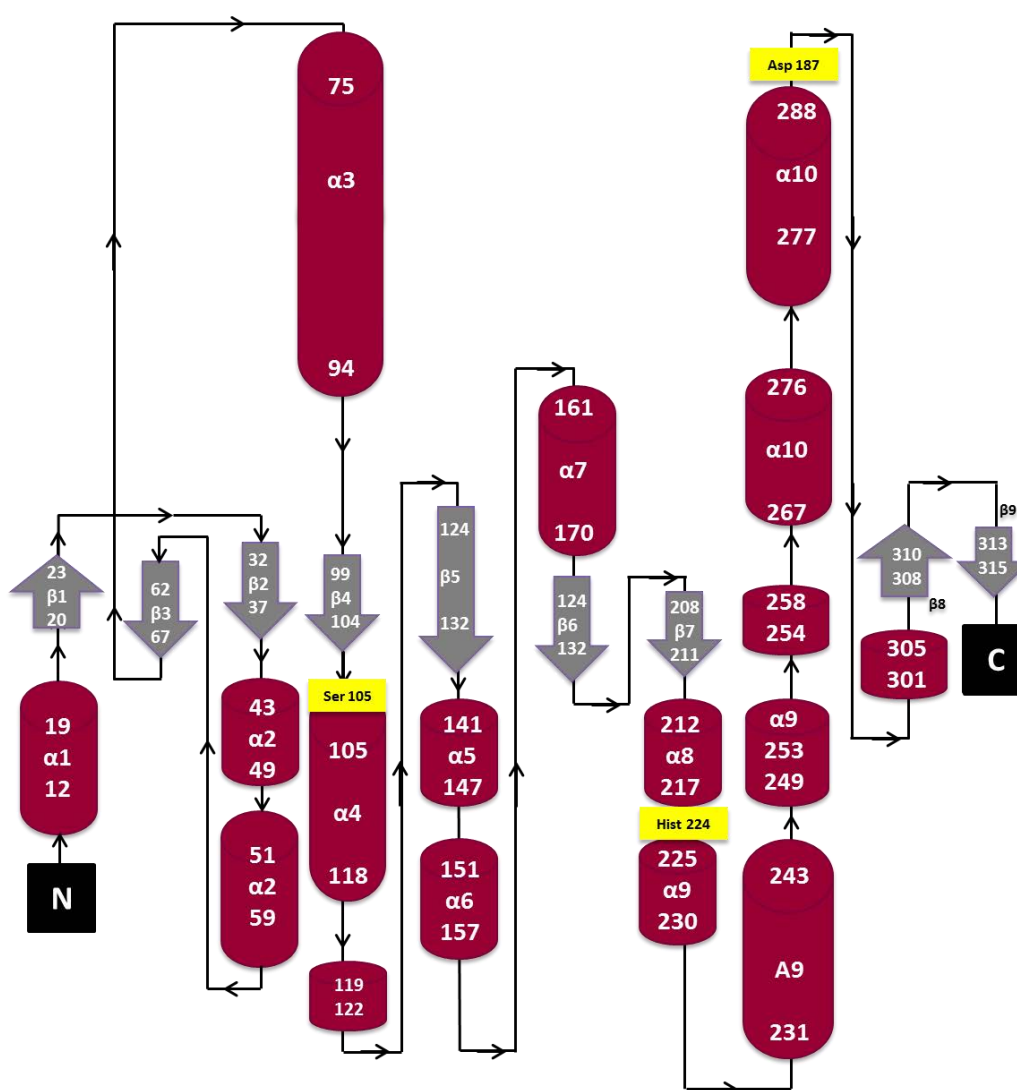


Figure 1.11: Diagramme de la structure secondaire de CALB. Les résidus catalytiques sont indiqués en jaune. Les feuillets β et les hélices α sont représentés respectivement par des flèches grises et des cylindres roses (Stauch et al., 2015).

À l'intérieur du site actif de CALB, cinq résidus jouent un rôle important dans le mécanisme catalytique : la triade catalytique est située au fond de la cavité et elle est constituée des résidus Ser105, His 224 et Asp187. La sérine catalytique (Ser 105) est située au fond de la cavité décrite comme profonde et étroite (10 Å x 4 Å de large et 12 Å de profondeur) (Jonas Uppenberg et al., 1994; Uppenberg et al., 1995). Deux autres résidus, Gln106 et Thr40, constituent le trou « oxyanionique », dont le rôle est de stabiliser les intermédiaires réactionnels à l'aide de liaisons hydrogène. Il a été également observé que la cavité du site actif peut être séparée en deux zones dont l'une est globalement hydrophobe et l'autre plus hydrophile. Le substrat donneur d'acyle se positionnerait plutôt dans la zone hydrophobe et l'accepteur en zone hydrophile (Pleiss et al., 1998). Les résidus Asp134, Gln106 et Thr40 constituent la région polaire proche de la sérine catalytique.

2.2.2. La mécanique moléculaire

La mécanique moléculaire permet de modéliser un système et d'évaluer son énergie. Cette technique utilise différentes approximations afin de simplifier la description du système modélisé. En effet, la mécanique moléculaire considère les atomes comme des particules sphériques, de charge constante et caractérisée par leur rayon de Van der Waals. Les liaisons covalentes sont, quant à elles, envisagées comme des ressorts possédant une distance d'équilibre déterminée expérimentalement ou par des calculs quantiques. Des interactions électrostatiques et de Van der Waals sont possibles entre les atomes non-liés ; de plus les paramètres d'atomes qui constituent deux molécules structurellement corrélées sont transposables. De cette manière, il sera possible d'exprimer un champ de force qui est la forme fonctionnelle de l'énergie potentielle d'un système moléculaire en fonction de paramètres géométriques comme les coordonnées dans l'espace, relatives à ce système.

La forme générale de l'équation d'un champ de force classique est :

$$V_{tot} = V_{liais} + V_{non-liais}$$

$$V_{liais} = \sum_{liaison} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - K_\theta)^2 + \sum_{dihedre} K_\phi (1 + \cos(n\phi - \delta))$$

$$+ \sum_{impropres} K_\omega (\omega - \omega_0)^2$$

$$V_{non-liais} = \sum_{non-liais} \left\{ \varepsilon_{ij}^{min} \left[\left(\frac{R_{ij}^{min}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}^{min}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 \varepsilon r_{ij}} \right\}$$

V = énergie potentielle

b = liaisons covalentes ; θ = angle de torsion ;

φ = angle dièdre ; ω = impropre

$K_{b,\theta,\varphi,\omega}$ = constantes de force

$q_{i/j}$ = charge atomiques partielles des atomes i et j

ε_0 = constante diélectrique du vide

ε = constante diélectrique relative du milieu (solvant explicite $\varepsilon = 1$)

L'énergie potentielle totale résulte de la somme des contributions énergétiques intramoléculaires telles que les étirements de liaisons chimiques (b), les torsions (θ) et flexions des angles dièdres (φ), les variations d'angle impropre (ω) ainsi que des interactions électrostatiques et de Van der Waals intermoléculaires.

En fonction des molécules étudiées, le champ de force va varier. Dans le cas de l'étude de protéines, les champs de force CHARMM (Chemistry at Harvard Molecular mechanics), GROMOS (Groningen Molecular Simulation) et AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement) sont souvent utilisés (Brooks et al., 1983; Scott et al., 1999; Weiner et al., 1984). L'application de ces champs de force permet l'évaluation de l'énergie potentielle d'un système et donc des interactions entre les atomes en les représentant dans l'espace tridimensionnel. Dans le cadre de cette étude, c'est le champ de force CHARMM qui a été utilisé.

La forme générale de l'équation de CHARMM est :

$$V_{tot} = V_{liais} + V_{non-liais} + \sum_{Urey-Bradley} K_{UB}(S - S_0)^2$$

Cette équation prend en compte un terme supplémentaire celui de Urey-Bradley qui est la contribution énergétique issue de déformations non planaires et autres étirements asymétriques observés sur les analyses par spectrométrie infrarouge.

L'optimisation de la géométrie par la minimisation de l'énergie potentielle est également une simulation de mécanique moléculaire dont le but est d'obtenir la conformation de la molécule étudiée possédant la plus faible énergie possible. Cette fonction de l'énergie potentielle va prendre en compte $3N$ variables avec N le nombre d'atomes du système étudié et les variables étant les coordonnées dans l'espace. La minimisation d'énergie va consister à rechercher les coordonnées optimisées qui vont permettre d'obtenir un système avec une géométrie optimisée et à son minimum d'énergie (Figure 1.12).

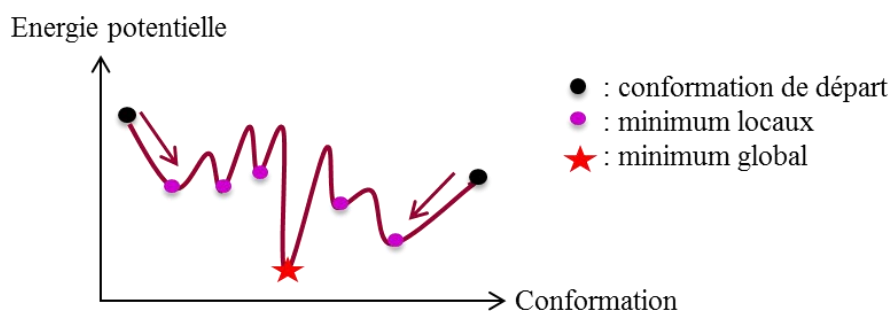


Figure 1.12: Principe de l'optimisation géométrique « statique » : à partir des coordonnées atomiques de la conformation de départ, l'algorithme retrouve des minima locaux les plus proches jusqu'à obtenir la conformation la plus stable possible qui correspond à l'énergie la plus basse.

2.2.3. Docking moléculaire

Le docking est une méthode de simulation permettant de prédire et d'étudier le mode d'interaction entre deux molécules, tel que le positionnement d'un ligand dans la cavité catalytique d'une enzyme (Leach et al., 2006; Yuriev and Ramsland, 2013). Cette technique permet l'identification des positions et orientations du ligand dans le site actif. Lors d'une simulation de docking, l'espace conformationnel du ligand est échantillonné en incrémentant chaque angle de torsion de manière aléatoire. Puis, chaque conformère généré est introduit dans la cavité cible selon différentes orientations. Ceci conduit à un ensemble de poses qui consistent en différentes conformations de complexes protéine/ligand favorables énergétiquement et géométriquement. Ces poses sont classées par des fonctions de score qui permettent l'évaluation de la complémentarité du ligand avec le récepteur en termes de forme, d'énergie électrostatique, ou de stabilisation par des interactions telles que les liaisons hydrogène (Gohlke and Klebe, 2002). Ceci constitue le scoring. Cette étape est l'un des défis

majeurs dans le développement de protocoles de docking capables d'identifier les poses les plus probables.

Plusieurs études ont fait part de grandes variations de résultats en fonction du protocole de docking utilisé ainsi que d'un manque de précision dans le classement des poses, remettant en question la robustesse des modèles de complexes obtenus (Cummings et al., 2009; Kontoyianni et al., 2004; Warren et al., 2006). Pour contrecarrer cette limitation, de nouveaux protocoles de docking ont été créés dans le but de générer des poses plus fiables et d'améliorer leur classement (Gorelik and Goldblum, 2008; Koska et al., 2008). Par exemple, les travaux menés par l'équipe de Koska ont consisté à créer un protocole de docking flexible. Deux catégories d'algorithmes de docking sont disponibles selon qu'ils appliquent ou non la flexibilité sur le ligand et/ou le récepteur : le docking de corps rigides et le docking semi-flexible ou flexible. Le docking rigide va considérer le ligand et la protéine comme deux corps rigides ce qui limite la précision des résultats mais permet des temps de calcul plus courts. Les protocoles de docking flexibles appliquent une flexibilité sur le ligand, le récepteur ou les deux ; dans ce cas l'espace de recherche est plus important et les temps de calcul sont allongés. L'équipe de Koska a travaillé à la création d'un nouveau protocole constitué d'un enchaînement d'algorithmes adaptés choisis pour leur précision et leur rapidité (Koska et al., 2008). La procédure mise en œuvre se divise en trois phases. La première est l'exploration et l'échantillonnage de l'espace conformationnel des chaînes latérales de la protéine qui auront été préalablement sélectionnées. Lors de la deuxième phase, l'espace conformationnel du ligand est à son tour exploré dans la cavité catalytique précédemment optimisée. Pour terminer, une optimisation du complexe protéine / ligand est réalisée. Ce protocole de docking flexible a été testé et validé sur plusieurs complexes protéine-ligand (Koska et al., 2008). De cette manière, ce protocole permet de modéliser la flexibilité de la protéine avant et après le placement du ligand. Des effets de type induced fit effects peuvent alors être pris en compte.

Grâce à ces outils, la modélisation moléculaire peut être efficace pour prédire la sélectivité et la réactivité d'enzymes de structure connue. Le postulat de départ est que la sélectivité et la réactivité enzymatique sont directement liées aux modes d'interactions entre l'enzyme et les substrats réactionnels. Ces modes d'interactions peuvent être étudiés en construisant des modèles moléculaires de complexes enzyme/substrats. Afin de prédire la sélectivité

enzymatique, plusieurs techniques de modélisation peuvent permettre de spécifier ou mimer le comportement de molécules. Avec les études de modélisation moléculaire ayant déjà été menées sur CALB, il a été possible de mettre en place de nouvelles approches pour comprendre les propriétés de sélectivité de cette enzyme.

Ainsi des travaux antérieurs (Bidouil et al., 2012; Oliveira et al., 2009) ont combiné des approches de docking et de dynamique moléculaire afin de déterminer la régio-sélectivité de CALB lors de l'acétylation de flavonoïdes. La première étape a consisté à réaliser la construction d'un système acyl-enzyme, correspondant à l'association de CALB avec le substrat donneur d'acyle. Pour ce faire, une liaison covalente entre le donneur d'acyle et la sérine catalytique a été créée. Puis une relaxation de la structure obtenue a été effectuée afin d'optimiser la position des atomes du système. Suite à cela, les orientations privilégiées du substrat accepteur d'acyle dans la cavité de l'acyl-enzyme ont été calculées à l'aide de simulations de docking, suivies de simulations de dynamique moléculaire pour optimiser la géométrie des systèmes. Pour identifier les poses pour lesquelles il est considéré que la réaction est possible, plusieurs critères issus de données de la littérature ont dû être pris en compte. Parmi ces critères, il y a par exemple la distance entre un groupement hydroxyle du ligand et la fonction carbonyle de l'acyl-enzyme ainsi que la distance entre le proton du même groupement hydroxyle et le résidu catalytique His224 (Figure 1.13). Le non-respect de l'un de ces critères suggère que la réaction d'acétylation ne peut avoir lieu. Ces travaux de modélisation ont été confrontés aux résultats expérimentaux et les modèles ont pu être validés.

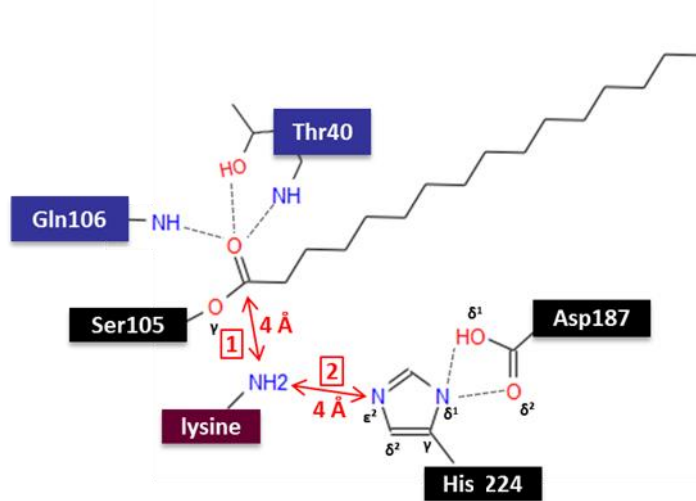


Figure 1.13: Critères de distance devant être respectés pour qu'une pose soit considérée comme productive, c'est-à-dire conduisant à la formation d'un produit. Cas de CALB.

Ces travaux de modélisation ont permis d'expliquer, à l'échelle moléculaire, la régio-sélectivité et la spécificité de substrat de CALB lors de l'acylation de flavonoïdes. Cette approche combinant docking et dynamique moléculaire a également été expérimentée par l'équipe de Ferrari dans l'objectif d'étudier la chimio- et la régio-sélectivité de l'acylation de peptides contenant un résidu lysine par l'acide oléique (Ferrari et al., 2014). Les résultats issus des simulations et les résultats expérimentaux suggèrent que CALB catalyse préférentiellement la N-acylation de la chaîne latérale de la lysine, quels que soient les acides aminés constitutifs du peptide et la position de la lysine dans la séquence. Dans ces deux études, des simulations de dynamique moléculaire ont été menées soit sur l'acyl-enzyme avant le docking du substrat accepteur d'acyle (Ferrari et al., 2014), soit sur le complexe enzyme/substrats après docking (Bidouil et al., 2012). Dans les deux cas, ce choix méthodologique fut motivé par la volonté d'accommoder la structure de l'enzyme en présence des substrats mais aussi d'optimiser la conformation des substrats à l'intérieur de la cavité catalytique. La parfaite corrélation entre les résultats expérimentaux et les modèles ont montré l'efficacité de l'approche.

2.2.4. Dynamique moléculaire

L'idée principale derrière les simulations de dynamique moléculaire est la prise en compte des mouvements des atomes pendant une période de temps et à une température donnée. Cet outil de modélisation est une méthode coûteuse en termes de temps de calcul, cependant les améliorations de ces dernières décennies dans le domaine de l'informatique rendent les simulations de plus en plus abordables (Alonso et al., 2006). La dynamique moléculaire est souvent couplée à d'autres méthodes telles que la méthode basée sur l'énergie libre pour fournir le profil d'énergie libre de la liaison protéine-ligand notamment pour la recherche de nouveaux médicaments (De Vivo et al., 2016). Des simulations de dynamique moléculaire sont également souvent utilisées en combinaison avec des simulations de docking. Cette approche permet de pallier l'absence de flexibilité de la protéine ainsi que l'absence de solvant dans le système soumis au docking et contribue à l'optimisation de la conformation des complexes enzyme/substrats. Dans le cas des réactions d'acylation catalysées par une lipase, on peut citer des travaux dans lesquels des simulations de dynamique moléculaire ont été menées soit sur l'acyle-enzyme avant le docking du substrat accepteur d'acyle (Ferrari et

al., 2014) soit sur le complexe enzyme/substrats après docking (Bidouil et al., 2012). Dans les deux cas, ce choix méthodologique fut motivé par la volonté d'accommoder la structure de l'enzyme en présence des substrats et du solvant mais aussi d'optimiser la conformation des substrats à l'intérieur de la cavité catalytique. La parfaite corrélation entre les résultats expérimentaux et les modèles ont montré l'efficacité de l'approche. Toutefois, les simulations de dynamique moléculaire associées au docking allongent les temps de simulation comparativement à des simulations de docking seul. Ceci peut diminuer l'intérêt de telles approches méthodologiques dans le cadre d'une démarche prédictive pour laquelle les simulations doivent idéalement permettre un gain de temps par rapport à l'approche expérimentale.

Plusieurs études ont utilisé la dynamique moléculaire afin d'étudier la flexibilité et le phénomène d'activation interfaciale dans le cas de CALB. Certaines lipases possèdent au niveau de leur site actif un système de couvercle permettant de bloquer ou permettre l'accès au site (Derewenda, 1994). Ces systèmes sont généralement constitués d'une hélice α qui, dans le cas des lipases, est en configuration ouverte lorsque celle-ci se trouve à l'interface phase hydrophobe/phase hydrophile et en présence de cette interface on observe une augmentation de l'activité; c'est ce que l'on appelle l'activation interfaciale (Jensen et al., 2002). Dans le cas de CALB, les hélices α 5 et 10 sont soupçonnées de jouer ce rôle de couvercle (Jonas Uppenberg et al., 1994; Uppenberg et al., 1995); toutefois le phénomène d'activation interfaciale n'a pas été démontré pour cette enzyme. Beaucoup d'études ont tenté de comprendre le rôle exact des hélices α 5 et 10 de CALB. L'équipe de Skjøt a construit des mutants de CALB *in silico* et a étudié leur comportement en milieu aqueux, au cours de simulations de dynamique moléculaire (Skjøt et al., 2009). Suite à cette étude les auteurs ont suggéré que l'hélice α 5 fonctionne comme un couvercle. Cependant l'activation interfaciale n'a pas été démontrée et aucune conformation fermée de CALB n'a été observée.

Récemment, une étude a permis de décrire les conformations ouvertes et fermées du couvercle (Figure 1.14) ainsi que l'état de protonation dans la structure cristalline de CALB, à une résolution de 0,91 Å (Stauch et al., 2015). La très bonne résolution obtenue a permis de relier l'état de protonation des résidus Asp145 et Lys290 à la conformation de la protéine, indiquant ainsi leur rôle dans les changements conformationnels de l'enzyme. Ces résultats expliquent l'absence d'activation interfaciale de CALB et offrent de nouveaux éléments pour élucider ce mécanisme, avec les conséquences qui en découlent pour les propriétés catalytiques et la classification des lipases.

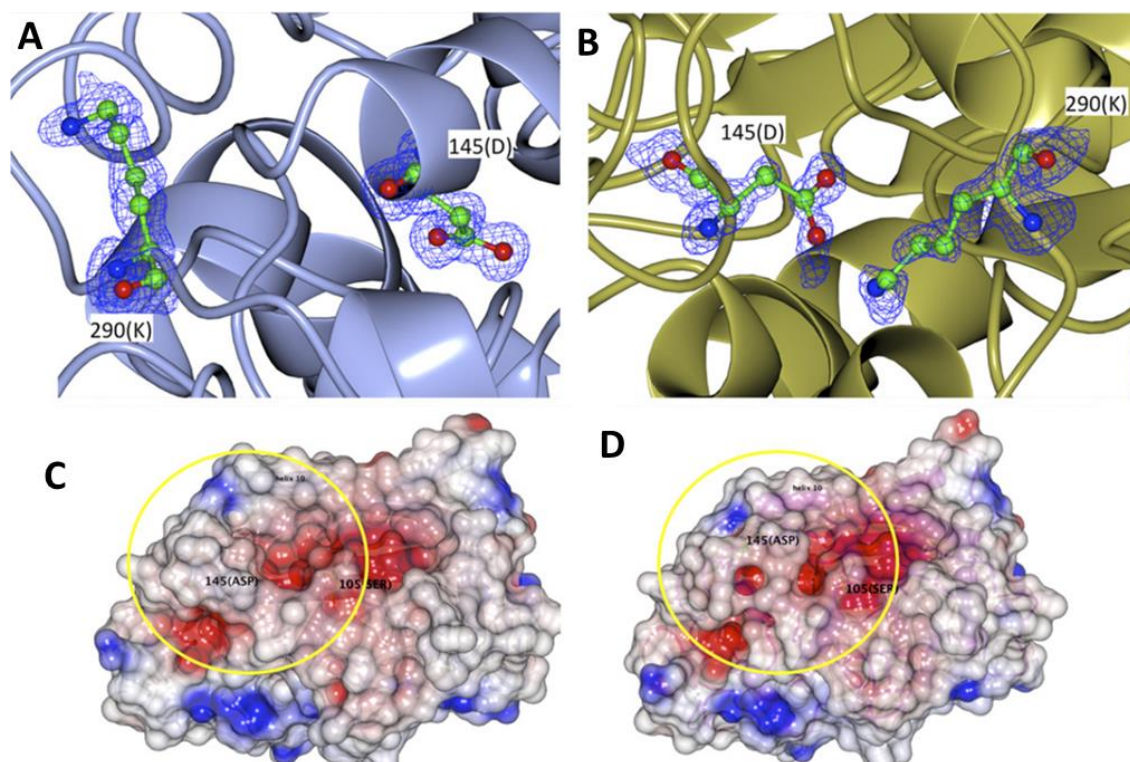


Figure 1.14: Les résidus Asp145 et Lys290 en conformation ouverte (A) et en conformation fermée (B). Représentation de la surface de CALB en conformation ouverte (C) et conformation fermée (D) (Stauch et al., 2015).

2.2.5. Mécanique quantique

Les simulations de chimie quantique sont fondées sur les principes de la mécanique quantique et ont pour but l'étude d'un système moléculaire à l'échelle atomique et électronique. Ces méthodes de calcul visent la détermination de la fonction d'onde d'un système de N particules ou atomes en résolvant l'équation de Schrödinger. Il est ainsi possible de décrire le comportement électronique de systèmes pouvant contenir quelques dizaines d'atomes avec une bonne précision. Cependant les temps de calcul restent importants.

Pour cette raison d'autres méthodes ont été mises au point, telles que la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT). Cette méthode est actuellement l'une des plus utilisées pour les calculs quantiques car elle est plus facile d'utilisation et moins coûteuse en temps de calcul. En effet, la méthode de DFT considère la densité électronique et non la fonction d'onde afin de décrire le système. La densité électronique est fonction de 3 variables (x, y, z) alors que la fonction d'onde dépend de 3N variables. De nombreuses études font état de l'étude de systèmes moléculaires par la DFT (De Oliveira et al., 2010; Syren et al., 2013).

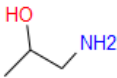
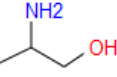
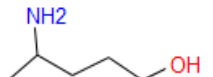
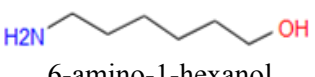
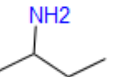
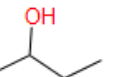
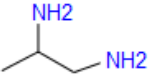
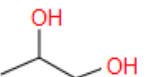
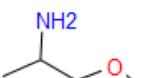
Dans l'étude de De Oliveira (2010), la DFT est utilisée afin de comparer la réactivité des groupements hydroxyles de 3 flavonoïdes différents lors de l'acétylation catalysée par CALB : la quercétine, l'isoquercétine et la rutine. Les simulations de DFT ont été réalisées sur des mini-systèmes issus de simulation de docking : le premier intermédiaire tétraédrique l'acétyl-CALB en présence d'un flavonoïde ainsi que ce même système ayant subi des modifications de charge permettant d'amorcer la formation du deuxième intermédiaire. Les résultats ont abouti à la formation du second intermédiaire dans le cas de la rutine et l'isoquercétine contrairement à la quercétine ce qui est cohérent avec les résultats expérimentaux.

Le mécanisme d'action de CALB a également été étudié par l'équipe de Le Joubioux dans le cadre de la O-acylation et de la N-acylation d'alcools et d'amines monofonctionnelles (Le Joubioux et al., 2011). Les conclusions furent la mise en évidence d'une chimiosélectivité de CALB préférentiellement dirigée vers la O-acylation au détriment de la N-acylation. Dans une seconde étude, une relation entre la structure de l'accepteur d'acyle et la chimiosélectivité avait été rapportée (Le Joubioux et al. 2013). En effet, lorsque le substrat est de type aminoalcool à chaîne courte (alaninol), la N-acylation est majoritaire et lorsque celui-ci est de chaîne plus longue (6-amino-1-hexanol), la O-acylation est majoritaire. Au vu de ces résultats expérimentaux, des simulations de modélisation moléculaire ont été réalisées pour expliquer et comprendre cette sélectivité. À l'aide de simulations DFT et de calculs d'énergie d'activation, Syren tente d'expliquer la sélectivité en faveur de la N-acylation par la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire dans le cas des amino-alcools (Syren et al., 2013). En effet, il a été observé expérimentalement que le taux de conversion d'alaninol en molécule N-acylée est largement supérieur à celui obtenu avec le 2-butylamine. Les deux molécules ne diffèrent que par la présence d'un groupement hydroxyle supplémentaire sur l'alaninol (Tableau 1.12).

L'équipe de (Syren et al., 2013) propose donc d'expliquer ce phénomène par un mécanisme de « proton navette » qui serait facilité par la présence d'une liaison intramoléculaire entre un proton de la fonction amine et l'oxygène de l'hydroxyle (Figure 1.15). Les résultats de calculs d'énergie libre d'activation pour l'acylation de groupements amines avec le mécanisme «proton navette» ont montré que celui-ci était énergétiquement plus favorable que le mécanisme « classique ». Toutes les énergies d'activations obtenues sont cohérentes avec les résultats expérimentaux et confortent l'hypothèse du mécanisme de «proton navette». Il

semblerait également que pour les aminoalcools possédant une longue chaîne, le mécanisme de «proton navette» ne fonctionne pas, ce qui explique leur O-acylation majoritaire.

Tableau 1.12 : Constantes catalytique de N- et O-acylation d'aminoalcools avec l'acide myristique catalysée par CALB (Syren et al., 2013)

	Accepteur d'acyle	Constante catalytique de N-acylation (mn ⁻¹)	Constante catalytique d'O-acylation (mn ⁻¹)
Amino-alcool	 1-amino-2-propanol	29	N.D
	 alaninol	50	N.D
	 4-amino-1-pentanol	13	85
	 6-amino-1-hexanol	12	130
Substrat mono-fonctionnel	 2-butylamine	2,3	-
	 2-butanol	-	54
Diol- et diamine	 1-2-diaminopropane	89	-
	 1-2-propandiol	-	320
Contrôle négatif	 methoxy-2-propylamine	19	N.D

N.D : non détecté.

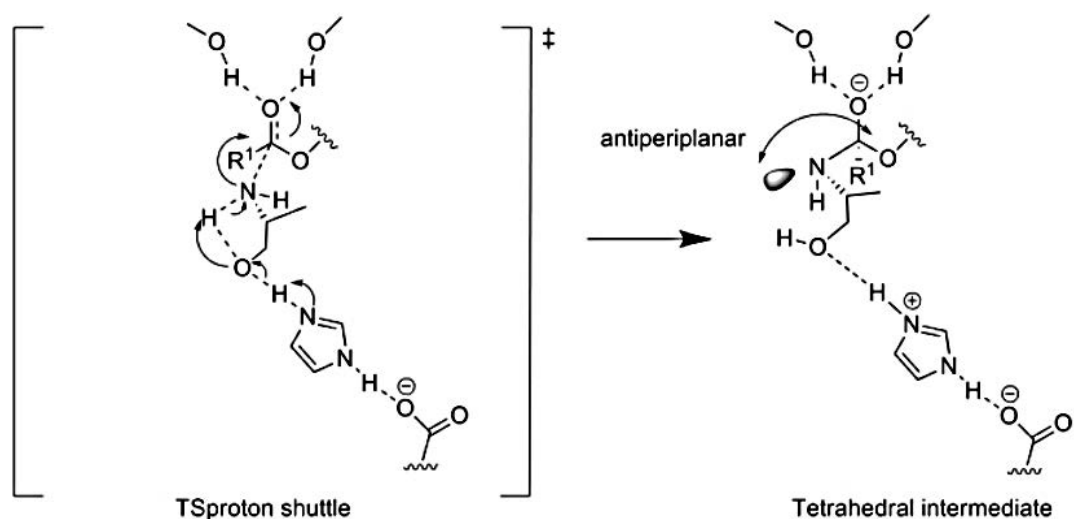


Figure 1.15: Mécanisme de proton navette (Syren et al., 2013)

Le mécanisme catalytique de CALB pour la O-acylation a été décrit comme un mécanisme bi-bi ping-pong incluant des états de transition passant par des intermédiaires tétraédriques (Fuentes et al., 2004). Celui-ci est représenté par la Figure 1.16. Une étude théorique du mécanisme de N-acylation réalisée à l'aide de simulations de docking, suggère la formation d'intermédiaires zwitterioniques (TI-Z) (González-Sabín et al., 2006). Ceux-ci résulteraient de l'attaque directe de l'amine sur le groupement carbonyle de l'acyl-enzyme, suivie d'une déprotonation assistée par l'histidine catalytique (Figure 1.17). La présence d'une molécule d'eau pourrait faciliter le transfert du proton.

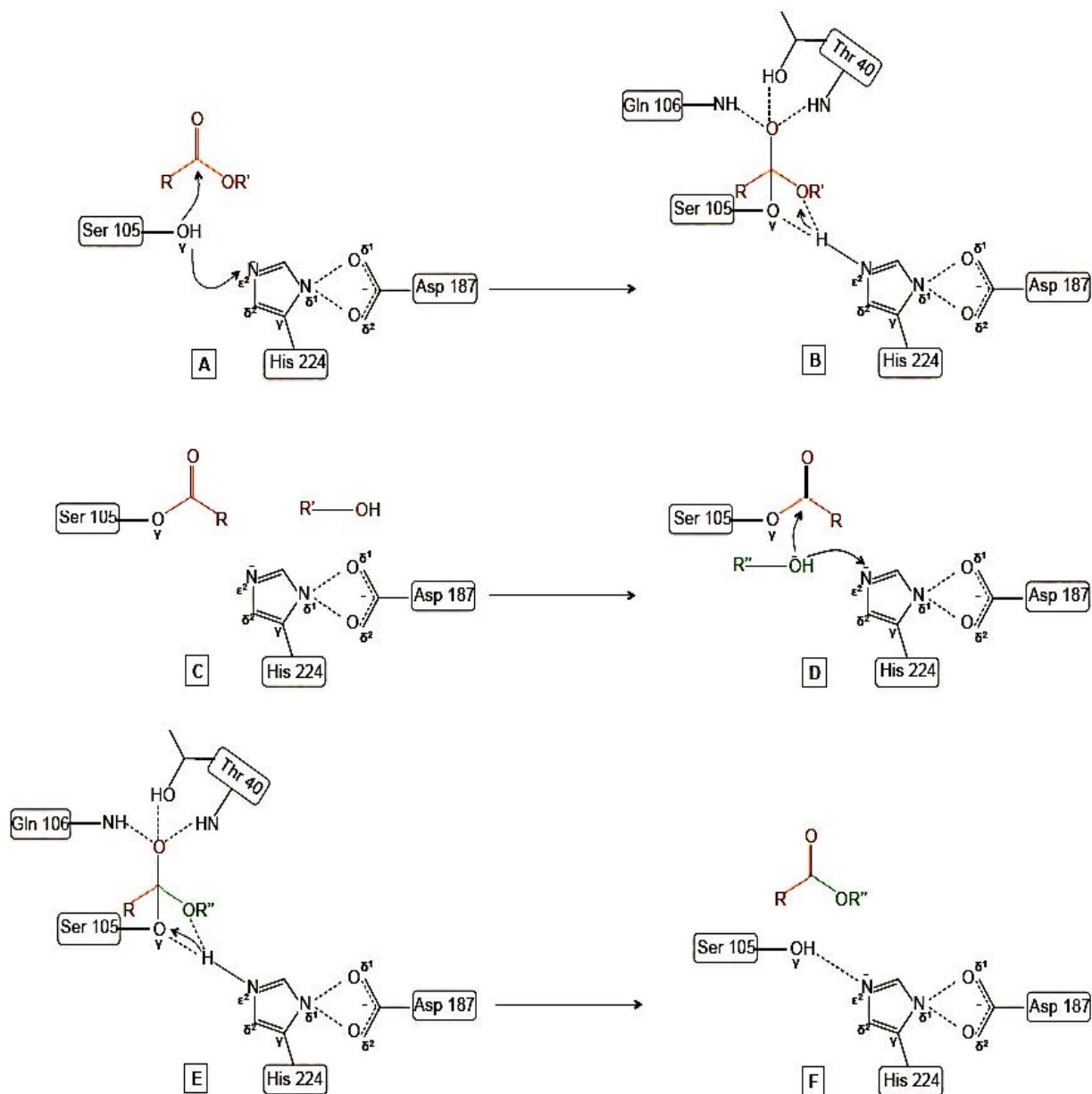


Figure 1.16: Mécanisme d'acylation catalysé par la triade catalytique de CALB selon le model bi-bi ping-pong: A) conformation native et approche du substrat donneur d'acyle ; B) premier intermédiaire tétraédrique ; C) relargage de l'alcool et formation de l'acyl-enzyme ; D) approche de l'accepteur d'acyle ; E) formation du second intermédiaire tétraédrique ; F) relargage du produit et retour à la conformation initiale de l'enzyme

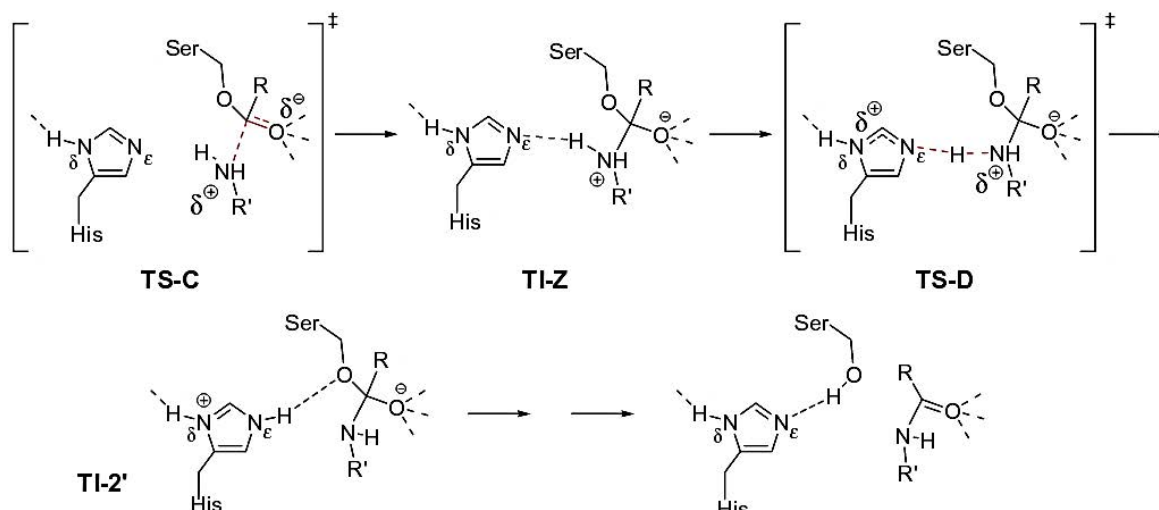


Figure 1.17: Proposition de mécanisme d'action de CALB pour une réaction de N-acylation (González-Sabín et al., 2006)

2.2.6. Méthodes hybrides : mécanique quantique/mécanique moléculaire (QM/MM) :

Les méthodes hybrides combinent la mécanique moléculaire à la modélisation quantique permettant ainsi de réaliser des simulations précises couplées à des simplifications permettant des calculs plus rapides. La Figure 1.18 représente le principe des méthodes hybrides. QM désigne la région où se produit une réaction chimique et qui doit donc être prise en compte par une approche quantique ; MM désigne le reste du système décrit par un champ de force.

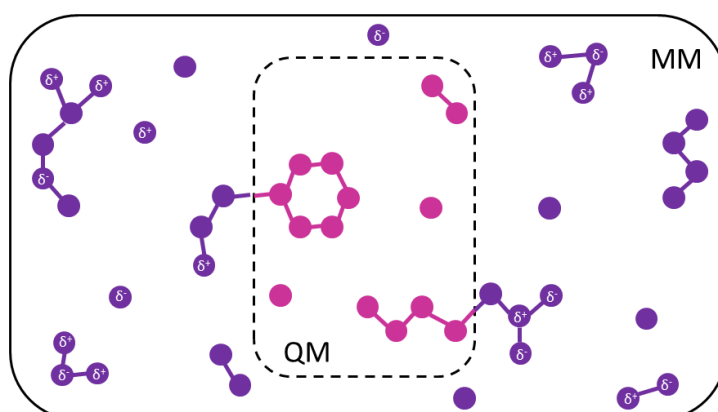


Figure 1.18: Illustration de l'approche mixte mécaniquemoléculaire/mécanique quantique (QM/MM) (Groenhof, 2013)

L'intérêt de l'utilisation d'une méthode hybride est de combiner la précision des simulations à un niveau quantique avec des temps de calcul acceptables (Bruice, 2006; Friesner, 2004; Senn and Thiel, 2009). Une étude de la stabilité et de l'activité de CALB dans les solvants organiques polaires et non polaires a été réalisée par des simulations de dynamique moléculaire et de QM/MM. Deux aspects ont été étudiés : le changement de conformation global de CALB et le changement de conformation du site actif. Les résultats montrent que la conformation globale de CALB reste stable en présence de solvants organiques. Puis au niveau du site actif, il a été observé que seuls les solvants polaires atteignent et interagissent intensivement avec le site actif en bloquant la liaison hydrogène entre les résidus Ser105 et His224. L'utilisation de la méthode hybride mécanique quantique/mécanique moléculaire a permis de conclure, *via* des calculs d'énergie d'activation, que le changement de conformation dans la région du site actif est le principal facteur qui influence l'activité de CALB en présence de solvants polaires (Li et al., 2010).

La modélisation moléculaire est donc constituée d'une multitude de méthodes permettant toute d'étudier les systèmes moléculaires allant du mécanisme catalytique à la sélectivité et les interactions qui les gouvernent. De nombreuses études utilisent les simulations de docking comme filtre conformationnel pour ensuite y associer d'autres techniques (dynamique moléculaire, DFT...). Les études de modélisation moléculaire peuvent ainsi fournir des informations cruciales afin de mieux comprendre la spécificité de substrat, la régio- et chimio-sélectivité, l'efficacité enzymatique ou encore l'effet du solvant à l'échelle moléculaire. Souvent combinaison de plusieurs méthodes pour gagner en précision tout en conservant des temps de calculs acceptables.

Dans la dernière partie de cette étude bibliographique, l'échelle du procédé enzymatique est abordée avec notamment l'immobilisation enzymatique ainsi que différents types de réacteurs permettant d'améliorer les conditions réactionnelles telles que le mélange ou le chauffage.

2.3. Échelle du procédé

2.3.1. Immobilisation d'enzymes

L'immobilisation de biocatalyseurs consiste en l'isolement physique d'enzymes au sein d'une matrice avec le maintien des activités catalytiques. Les enzymes sous leur forme immobilisée possèdent de nombreux avantages et sont plus adaptées à l'utilisation industrielle par rapport à leurs formes solubles. L'immobilisation rend possible la séparation et le recyclage des enzymes ce qui permet la diminution des coûts de production. De plus, les propriétés catalytiques sont maintenues voire améliorées, grâce à une meilleure stabilité de l'enzyme immobilisée (Cao, 2005). Par conséquent, l'immobilisation est souvent réalisée pour la plupart des procédés industriels ayant recours à la catalyse enzymatique.

Par exemple, les lipases sous forme immobilisée sont très utilisées dans l'industrie afin de catalyser des réactions d'hydrolyse, d'alkoolyse, d'estérification ou encore de transestérification d'esters d'acides carboxyliques (Tan et al., 2010). Une étude portant sur la synthèse de biodiesel par alcoolysse de différentes huiles végétales a permis d'établir une comparaison entre différentes lipases immobilisées (Hernández-Martín and Otero, 2008). Les résultats de cette étude ont montré que Novozym® 435 (lipase B de *C. antarctica* immobilisée de manière non covalente à l'intérieur de billes de résine polymérique méso-macroporeuses) permet une production de biodiesel ainsi que la conservation de son activité allant jusqu'à 85 % après neuf cycles de réaction, dans des conditions optimales, dans un réacteur discontinu.

Un autre exemple est l'optimisation de la réaction d'estérification de l'acide L-ascorbique par de l'acide laurique par l'enzyme Novozym® 435 pour former le L-ascorbyl laurate, très utilisé en cosmétique pour ces propriétés antioxydantes, qui a permis d'obtenir un rendement de conversion de 93,2 % (Chang et al., 2009).

Dans le Tableau 1.13 quelques exemples d'immobilisation de lipase sont évoqués.

Tableau 1.13: Exemples d'immobilisation de lipases avec différentes techniques et supports

Adsorption		« cross-linking »	Chimie-sorption	Encapsulation	Techniques	
octyl-glutamique agarose hétéro-fonctionnel	– silice mésoporeuse (SBA-15) – matériaux mésoporeux fluorés	glutaraldéhyde	glyoxyl-Agarose	silice méso-macro-poreuse fonctionnalisé avec du glymo* (gGlymo-Si(HIPE))	–nanoparticules magnétiques (CNPMs) de chitosane –fonctionnalisation : genipin ou glutaraldéhyde	Matériaux d'immobilisation
	Lipase de <i>Mucor miehei</i>	Mélange protéique issu de <i>Lactarius punctatus</i>	Lipase de <i>Hypocrea pseudokoningi</i>	Lipases de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	Enzyme
	– Lipase A et B de <i>Candida antarctica</i> – Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> – Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> – Lipase de <i>Candida rugosa</i> – Phospholipase (Lecitase ultra, LU)	– Lipase A et B de <i>Candida antarctica</i> – Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> – Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> – Lipase de <i>Candida rugosa</i> – Phospholipase (Lecitase ultra, LU)				Remarques
	– maintien de l'activité jusqu'à 3 recyclages – la principale limite est la désorption	– augmentation de l'activité, de la stabilité et de la recyclabilité	– augmentation de la stabilité – activité hydrolytique 15x plus élevée	– stabilisation des enzymes – maintien de l'activité enzymatique en continu pendant 2 mois – meilleure activité catalytique pour les lipaseschimisorbées par rapport à la physisorption – amélioration de la stabilité du biocatalyseur	– genipin-CNPMs = plus grande stabilité (pH, température, stockage...)	Références
	(Jacoboy et al., 2013)	(Mahmod et al., 2015)	(Pereira et al., 2015)	(Brun et al., 2011)	(Liu et al., 2016)	
						(Rueda et al., 2016)

* : 3-glycidyoxypropyl-triméthoxysilane

2.3.1.1. Les différentes techniques et matériaux utilisés pour l'immobilisation d'enzymes

2.3.1.1.1. Techniques d'immobilisation

Le choix de la méthode d'immobilisation doit permettre avant tout sa réutilisation et si possible aboutir à l'augmentation de la stabilité et de l'activité des enzymes. Ce choix diffère en fonction du catalyseur enzymatique choisi et de l'application. La Figure 1.19 représente les différentes techniques d'immobilisation.

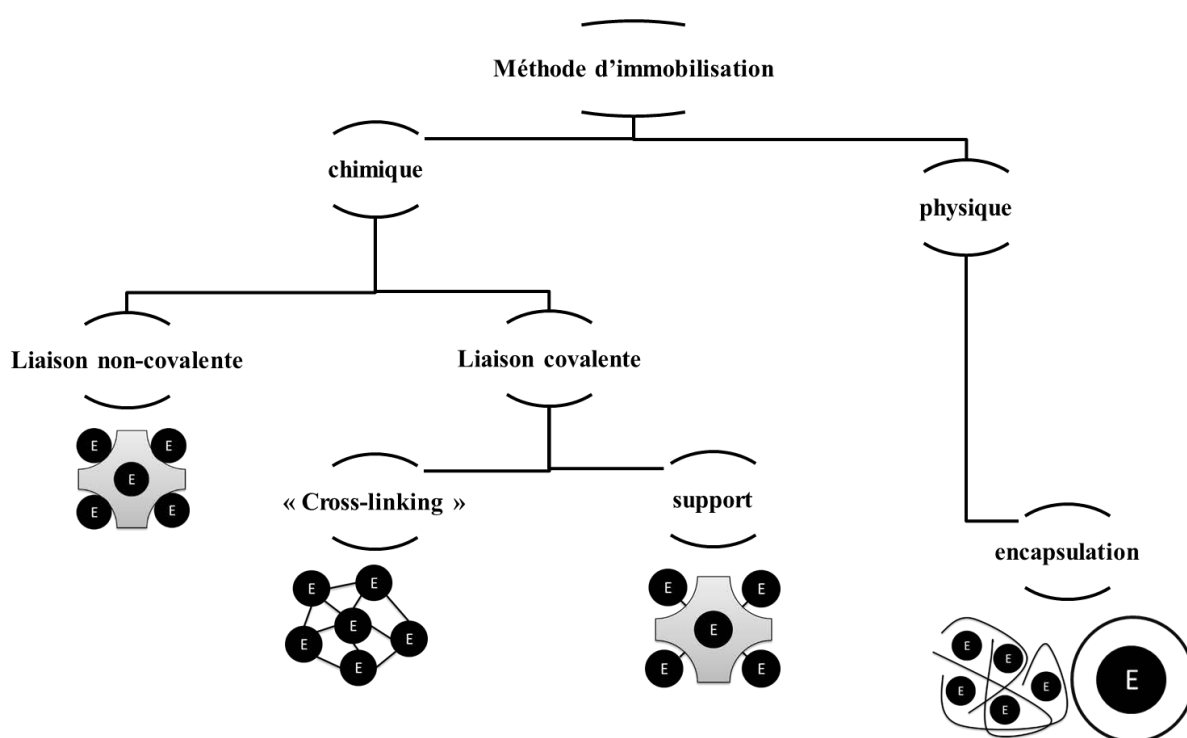


Figure 1.19: Schéma représentatif des principales techniques d'immobilisation d'enzyme

a. Immobilisation par physisorption

La technique d'immobilisation par adsorption est la méthode la plus simple à mettre en œuvre. En effet, elle consiste à mettre en immersion le support et les enzymes, sans modification chimique, afin que l'immobilisation se produise par liaisons hydrogènes ou van der Waals. Les supports utilisés peuvent être de nature plus ou moins hydrophobe ou hydrophile. Avec cette technique d'immobilisation, il est donc possible d'influencer le pourcentage d'adsorption en jouant sur les conditions d'immobilisation. Pour cette raison, il

est important de bien connaître les propriétés de l'enzyme à immobiliser telles que le point isoélectrique qui est le pH correspondant à la protéine non chargée et permet donc de maîtriser la charge de la molécule en fonction du pH et donc la physisorption. La présence de liaisons faibles constitue également l'inconvénient de cette technique d'immobilisation. En effet, ces liaisons sont réversibles et sensibles à certains paramètres, tels que le changement de température, de concentration ou de force ionique du milieu, ce qui peut provoquer une désorption irréversible du biocatalyseur. Ce phénomène de désorption conduit ensuite à la présence de biocatalyseur dans le mélange contenant le(s) produit(s) de réaction et complique ainsi le procédé de purification (Krishnamoorthi et al., 2015).

Des recherches ont porté sur la limitation de ce phénomène notamment en jouant sur le diamètre des pores pour que ceux-ci correspondent à la taille des enzymes, ce qui permet une meilleure rétention et une amélioration de l'activité enzymatique (Serra et al., 2008). Également, des traitements peuvent rendre la surface des matériaux plus hydrophobe. Dans le cas de nombreuses lipases, un phénomène d'activation interfaciale intervient par un changement de conformation. Les sites actifs étant le plus souvent de nature hydrophobe Hanefeld suppose donc que l'immobilisation de lipases sur supports hydrophobes permettrait l'immobilisation de ces lipases dans une conformation active (Hanefeld et al., 2009). Cependant, pour les substrats de grande taille ou hydrophiles, la proximité de la surface du support hydrophobe peut bloquer l'accès au site actif. La silylation post-immobilisation est une méthode permettant de limiter le phénomène de lessivage des enzymes (Hartmann, 2005). En effet, la silylation permet de diminuer la taille des ouvertures de pores des supports mésoporeux. Dans une étude menée par Manyar (2008), après l'immobilisation de l'enzyme sur SBA-15, la taille des pores a été réduite par silylation avec un aminosilane fréquemment utilisé dans le processus de silanisation le (3-Aminopropyl)triéthoxysilane (APTES). Les résultats obtenus ont permis d'éviter le lessivage tout en permettant aux substrats et produits de réactions de circuler (Manyar et al., 2008).

b. Immobilisation par chimisorption

Pour pallier la désorption des enzymes lorsqu'elles sont immobilisées par adsorption, une des solutions possibles est l'immobilisation par chimisorption. En tendance, les enzymes immobilisées de manière covalente peuvent être utilisées dans tout type de milieu tandis que

les enzymes adsorbées doivent être utilisées dans des solvants organiques afin de limiter le phénomène de désorption. Dans ce cas, la surface des supports doit être fonctionnalisée. Il faut donc effectuer un choix parmi les nombreuses fonctions permettant le greffage des enzymes. Cette technique d'immobilisation permet une réduction des risques de désorption des enzymes en milieu aqueux ainsi qu'une meilleure résistance à des conditions dénaturantes en réduisant la flexibilité conformationnelle grâce à un ou plusieurs points d'accroches limitant ainsi la dénaturation et le dépliement des protéines.

Généralement ce sont les groupements nucléophiles des chaînes latérales des acides aminés de l'enzyme tels que : la lysine, l'histidine, la cystéine, la tyrosine, etc. qui tendent à se lier aux groupements électrophiles du support. Les processus d'activation sont généralement conçus pour produire des groupes électrophiles sur le support (Homaei et al., 2013). Cependant, ces modifications chimiques réalisées en créant des liaisons covalentes avec le support sont assez difficiles à contrôler afin d'obtenir des lots homogènes d'enzymes immobilisées. Par exemple, les supports de type époxy activés sont capables de réagir chimiquement avec les groupements nucléophiles placés sur la surface de la protéine et sont très stables. Ils permettent donc de réaliser des réactions sur de longue durée. Ces supports époxy semblent être très appropriés pour stabiliser les enzymes industrielles par liaison covalente (Mateo et al., 2007). Ainsi, il est possible de trouver sur le marché plusieurs supports époxy qui sont recommandés pour immobiliser des protéines (par exemple Eupergit® C). La chimisorption de la pénicilline G acylase sur Eupergit® C permet de réaliser plus de 800 cycles de réaction avec une conservation de 60% de son activité initiale (Kallenberg et al., 2005). La lipase de *Mucor miehei* (Mm-L) a été immobilisée par chimisorption sur SBA-15 fonctionnalisée avec des groupements isocyanate (NCO-SBA-15) puis mise en oeuvre pour la transestérification d'huile de colza avec du méthanol. En comparant avec la version physisorbée sur SBA-15, il a été démontré une stabilité opérationnelle plus élevée. En effet, la chimisorption a permis 6 recyclages contre 2 uniquement pour l'enzyme physisorbée (Canilho et al., 2013).

c. Autres techniques

Encapsulation

La meilleure technique pour éviter de trop grandes modifications structurales des enzymes est l'encapsulation qui consiste à piéger les enzymes dans un réseau organique ou inorganique. L'encapsulation fait intervenir des interactions faibles mais l'enfermement des enzymes évite la désorption. Le procédé sol-gel est la technique d'encapsulation la plus répandue et utilise souvent des silices.

Une étude a été réalisée sur l'encapsulation de CALB et la lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) dans des billes d'alginate de calcium produites à partir d'alginate seul (SAC) ou modifié soit avec un anhydride dodécénylsuccinique (SAC12) soit avec un anhydride succinique (SAC0) (Falkeborg et al., 2015). Les activités spécifiques de CALB et TLL libre ou immobilisées sur les différents supports sont présentées Figure 1.20. Les résultats montrent que dans le cas de la TLL (Figure 1.20.B) l'immobilisation a permis d'augmenter l'activité spécifique de l'enzyme. De plus, l'utilisation de SAC12 a multiplié par 3 l'activité spécifique de la TLL. Dans cette étude l'hypothèse concernant cette amélioration de l'activité est liée à l'activation de l'enzyme par la reconnaissance des résidus hydrophobes de alg-SAC. Des essais de recyclage des TLL-*algSAC12* ont également montré une diminution de l'activité enzymatique puis un maintien de celle-ci à une valeur toujours supérieure à celle de la TLL libre pendant 10 cycles (Figure 1.21).

Parallèlement, les résultats obtenus avec CALB immobilisée montrent une diminution de l'activité spécifique (Figure 1.20.A). CALB ne possédant pas un important couvercle hydrophobe dans sa structure, aucune influence de l'ajout de SAC12 sur l'activation interfaciale. Les hypothèses concernant la perte d'activité spécifique sont donc l'existence de limitations de transferts trop importantes ou des interactions physiques ou ioniques avec le polymère d'alginate.

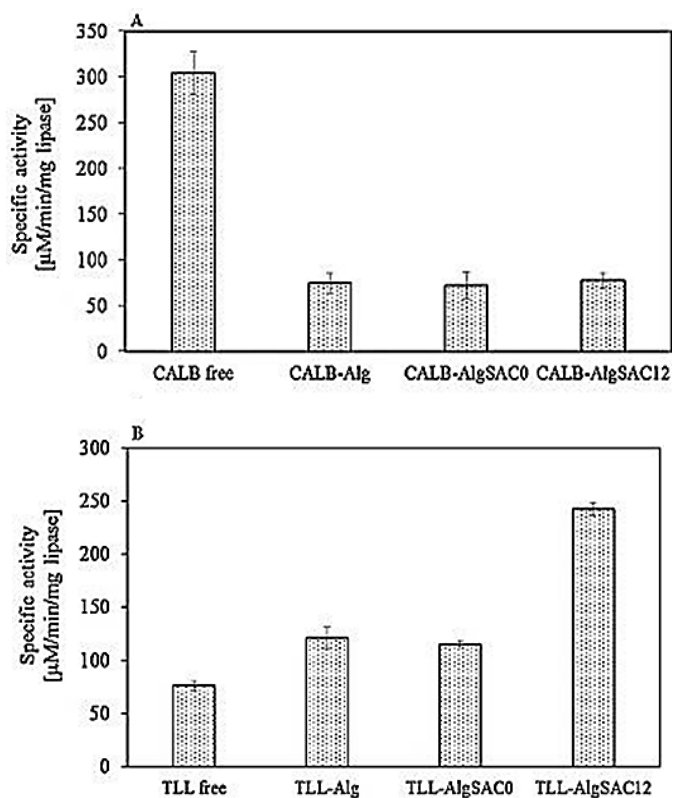


Figure 1.20: Activité spécifique de CALB (A) et TLL (B) libres ou encapsulées (Falkeborg et al., 2015)

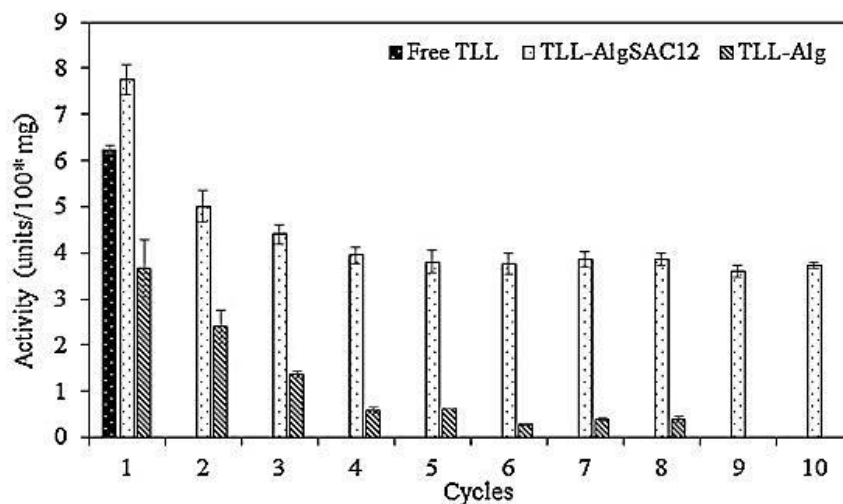


Figure 1.21: Activité enzymatique de TLL libre et lors de recyclage de TLL encapsulée dans des billes d'alginate simple (TLL-alg) ou fonctionnalisées (TLL-alg-SAC12) (Falkeborg et al., 2015)

Immobilisation par réticulation

Le cross-linking, ou réticulation, est le fait de lier les groupements terminaux des enzymes par des agents de liaisons. Cela permet l'obtention d'agrégats, "cross-linking enzyme aggregates" (CLEA) ou de cristaux, "cross-linking enzyme crystals" (CLEC) (Sheldon, 2007). Différents agents de réticulation peuvent être utilisés comme le glutaraldéhyde, le dextrane, le bis-isocyanate, le bis-diazobenzidine. Le choix de l'agent de réticulation et des paramètres va dépendre du biocatalyseur. Par exemple, dans le cas d'une enzyme possédant peu de groupement amine, l'ajout d'albumine de serum bovin permet une meilleure réticulation car celle-ci possède de nombreux groupements amine notamment grâce à une forte présence de lysine (Yusof et al., 2016). Les résidus de lysine sont capables de se lier avec le glutaraldéhyde, ce qui permet d'éviter la dénaturation de l'enzyme. Une étude a montré que la BSA a un effet significatif sur l'activité de lipases (CALB et palatase) multi-CLEA. En effet, en présence de BSA une augmentation significative de l'activité de la lipase immobilisée est mesurée (Tableau 1.14) :

Tableau 1.14: Activité de lipases (CALB et palatase) multi-CLEA avec et sans BSA (Mahmod et al., 2015)

	Activité spécifique de la lipase (U/mg)	activité (%)
CLEA	0,783 ± 0,756	54,94
CLEA-BSA	1,350 ± 0,082	94,74

Une étude portant sur la préparation de CLEA réalisée avec CALB a montré que les conditions optimales de préparation étaient les suivantes : précipitation à l'éthanol, 25 mM, d'agent de liaison, 50 mg/ml d'enzyme et un temps de contact de 45 min. Dans ces conditions les résultats ont montré une activité enzymatique plus importante que celle obtenue avec l'enzyme libre, une augmentation de la stabilité thermique, une conservation de 40% de l'activité initiale après 15 recyclages et une meilleure dispersion dans les solvants organiques (Kartal et al., 2011).

Le Tableau 1.15 résume les avantages et inconvénients de chaque technique d'immobilisation.

Tableau 1.15: Avantages et inconvénients des différentes techniques d'immobilisation (Eş et al., 2015)

Technique d'immobilisation	Avantages	Inconvénients
Physisorption	<ul style="list-style-type: none"> - simple et pas cher - une activité catalytique élevée - pas de changement de conformation du biocatalyseur - absence d'utilisation de réactifs - réutilisation de matériel coûteux 	<ul style="list-style-type: none"> - faible stabilité - possible perte de biomolécules - la présence de liaisons faibles pourrait causer la désorption de biocatalyseur
Encapsulation	<ul style="list-style-type: none"> - protection du biocatalyseur - permet le transport des composés de faible poids moléculaire - permet un fonctionnement continu dû au maintien de la densité des cellules - facilite la séparation et simplifie le processus en aval 	<ul style="list-style-type: none"> - transfert de masse limité - faible chargement en enzyme
Cross-linking	<ul style="list-style-type: none"> - liaison forte biocatalyseur - diminutions du phénomène de désorption - augmente la stabilité du biocatalyseur 	<ul style="list-style-type: none"> - peut causer une altération du site actif - provoque des limitations de diffusion - forte perte d'activité
Liaison covalente	<ul style="list-style-type: none"> - liaison forte - forte résistance thermique - facilite le contact avec les substrats - empêche l'élution des biocatalyseurs - flexibilité dans la conception des supports et la méthode 	<ul style="list-style-type: none"> - limite la flexibilité de l'enzyme et donc son activité (même si parfois l'inverse est observé) - moins d'enzyme immobilisée - liaison irréversibles (même si exceptions telles que les liaisons disulfide)

Il n'existe donc pas de méthode générique mais une nécessité de définir la méthode adéquate d'immobilisation en fonction de la nature de l'enzyme et de la réaction à catalyser.

2.3.1.1.2. Types de supports conventionnels

Dans cette partie sont évoqués les différents types de supports utilisables pour réaliser l'immobilisation enzymatique. L'échelle de taille des pores est présentée Figure 1.22.

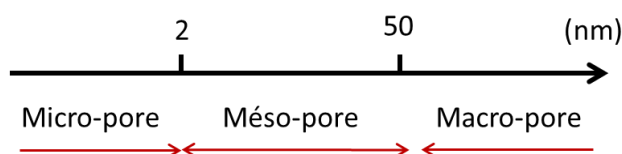


Figure 1.22: Échelle de taille des pores

a. Les polymères naturels

Les biopolymères tels que la cellulose et autres polysaccharides sont des matériaux communément utilisés pour réaliser l'immobilisation d'enzymes. Un autre biopolymère est le biochar issu de la pyrolyse de biomasse forestière qui possède un faible coût. Ce type de matériau possède des propriétés physico-chimiques et structurales intéressantes, variant en fonction de la matière première utilisée et du traitement subi : par exemple, il a été observé que la surface spécifique augmente avec la température de pyrolyse du biochar (González et al., 2012, 2013). La composition du biochar peut également avoir une importance pour l'immobilisation d'enzyme car ceux-ci peuvent contenir des métaux lourds qui peuvent avoir pour effet d'activer mais aussi d'inhiber l'enzyme. En exemple d'application de ces supports, la lipase de *Candida rugosa* a été immobilisée sur du biochar issu de la pyrolyse de coque d'avoine par adsorption dans des micropores. L'activité de l'enzyme a été conservée.

b. Les polymères synthétiques organiques

Les polymères synthétiques organiques incluent des polymères comme le polystyrène, le polyéthylène ainsi que des polysides tels que l'acétate de cellulose, le nitrate de cellulose, le dextrane, l'agarose ou encore l'alginate. Pour l'immobilisation des enzymes par physisorption, les résines acryliques sont souvent utilisées comme support. Nous pouvons citer l'exemple de la CALB dont les formes commerciales immobilisées sur billes de polymetacrylate divinyl-benzene meso-macroporeuse sont connues sous les noms "Novozym 435" ou « Lipozym 435 ». Par exemple, lors de la résolution cinétique de p-chloro-acétate de mandelonitrile dans du toluène réalisée par Hanefeld (2009), l'utilisation de Novozym 435 permet, en fin de réaction, la séparation par filtration et le recyclage de l'enzyme jusqu'à cinq cycles sans perte d'activité ou d'énantiosélectivité comme le montre les résultats présentés dans le Tableau 1.16 (Hanefeld et al., 2009).

Tableau 1.16: Recyclage de CALB (Novozym 435) lors de la résolution cinétique de p-chloro-acétate de mandelonitrile (Hanefeld et al., 2009)

Nombre de cycles	rendement (%) (excès énantiomérique)				
	1	2	3	4	5
(R)-p-Chloromandelonitrile acetate	98 (99)	96 (99)	98 (97)	98 (98)	98 (98)
(S)-p-Chloromandelonitrile THP-ether	86 (90)	86 (90)	88 (93)	90 (93)	91 (93)

c. Les supports inorganiques

Les supports inorganiques tels que les silices, les zéolithes ou les matériaux mésoporeux silicatés peuvent également être utilisés afin d'immobiliser des biocatalyseurs (Lee et al., 2009). Ce sont des matériaux inertes et stables à des températures élevées. SBA-15 (santa barbara amorphous N 15) et MCM-41 (Mobil Composition of Matter N 41) sont des matériaux mésoporeux silicatés très utilisés pour l'immobilisation par chimi- ou physisorption. Leur surface peut être fonctionnalisée facilement pour faciliter la chimisorption. En effet, la faible stabilité des enzymes et la nécessité de recycler le biocatalyseur conduisent fréquemment à la chimisorption de l'enzyme. Ces matériaux possèdent également une grande surface spécifique ainsi que des diamètres de pores uniformes avec des volumes poreux importants. Ces matériaux mésoporeux silicatés sont synthétisés à partir de silane (précurseur de silice) et de solution micellaire de tensioactifs pour obtenir des structures poreuses ordonnées avec des distributions de taille de pores étroites. Le diamètre des pores peut varier en fonction du tensioactif et des conditions expérimentales. Cela permet de viser une large gamme de diamètre de pores allant de 2 à 25 nm. Des SBA-15 ayant différents diamètres de pores ont été synthétisées et utilisées pour l'immobilisation par physisorption de la lipase de *Mucor miehei* (Mm-L) afin de produire des esters méthyliques, avec toutefois de faibles vitesses réactionnelles potentiellement dues à une limitation des transferts de matière dans les pores (Jacoby et al., 2013). Une étude portant sur l'immobilisation par physisorption de lipase pancréatique de porc sur des SBA-15 en forme de tige a montré une meilleure adaptation de l'enzyme à un pH plus élevé ainsi qu'une meilleure stabilité thermique (Li et al., 2009).

Pour citer un autre exemple de matériaux inorganiques, les High Internal Phase Emulsion (HIPE) sont des matériaux (billes ou monolithes) silicatés de type macro-méso-cellulaires (Carn et al., 2004). L'étude de Brun (2010) a consisté à immobiliser la lipase de *Candida rugosa* sur un support de type glymo-Si(HIPE) ([C-CR-lipase]@gGlymo-Si-HIPE). La Figure 1.23a) représente la comparaison de cinétiques obtenues lors de la réaction d'estérification de l'acide oléique par le butanol avec [C-CR-lipase]@gGlymo-Si-HIPE ou l'enzyme libre. Les résultats obtenus indiquent une amélioration des performances catalytiques lorsque celle-ci est immobilisée sur les HIPEs. De plus, la chimisorption des enzymes favorise également leurs recyclage, jusqu'à 20 cycles (Figure 1.23.b).

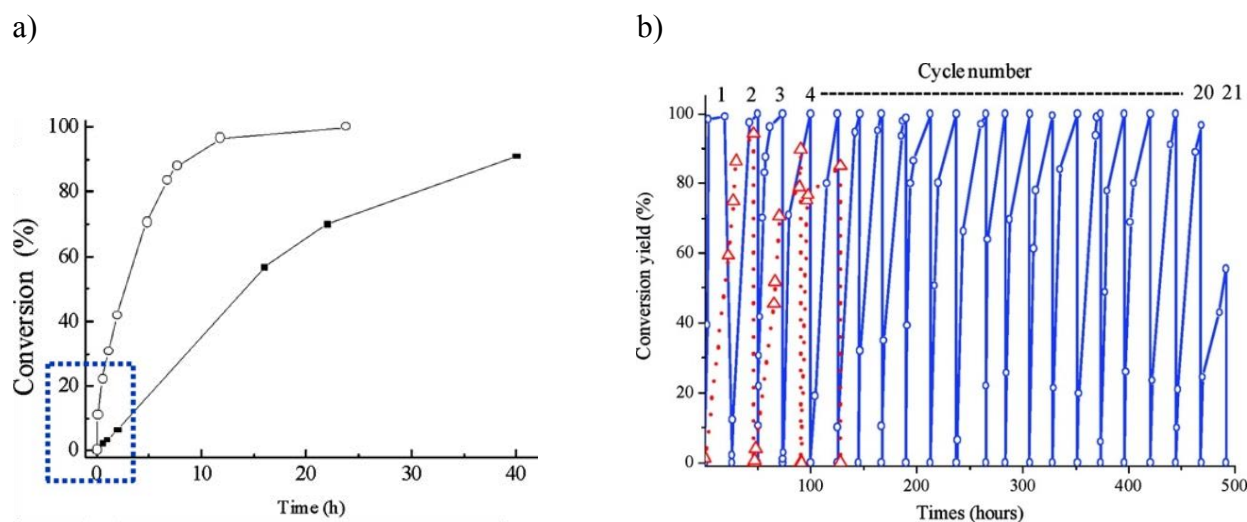


Figure 1.23: Pourcentage de conversions obtenues pour la réaction d'estérification de l'acide oléique par le butanol. (a) ○ : [C-CR-lipase]@ g Glymo-Si(HIPE) ; et ■ : lipase *Candida rugosa* libre. b) Pourcentage de conversion obtenu sur plusieurs cycles, ○ : [C-CR-lipase]@ g Glymo-Si(HIPE) et Δ : [C-CR-lipase]@Si(HIPE) (Brun et al., 2010).

d. Les supports magnétiques

Les nanoparticules magnétiques font partie des supports qui ont récemment émergé dans le domaine de l'immobilisation enzymatique. Les propriétés magnétiques de ces supports les rendent très intéressants pour l'immobilisation. En effet, ce type de matériaux permet de faciliter le recyclage des enzymes ainsi que l'orientation de leur agitation dans le tube réactionnel (Husain, 2016). Des études ont montré que l'immobilisation d'hydrolases sur les nanoparticules magnétiques permettait d'améliorer la stabilité vis-à-vis de la température et du pH et donc une meilleure résistance à la dénaturation par rapport aux enzymes libres. De plus, le maintien de l'activité a été observé pendant plusieurs cycles (Khoobi et al., 2015, 2016). La Figure 1.24 présente les résultats obtenus lors de tests d'effet du pH et de la température sur l'activité d'une lipase chimisorbée sur support magnétique dans la réaction conversion du *p*-Nitrophenyl palmitate en *p*-Nitrophenol (Liu et al., 2014). Les résultats indiquent une meilleure stabilité des enzymes immobilisées ainsi qu'une activité relative plus élevée.

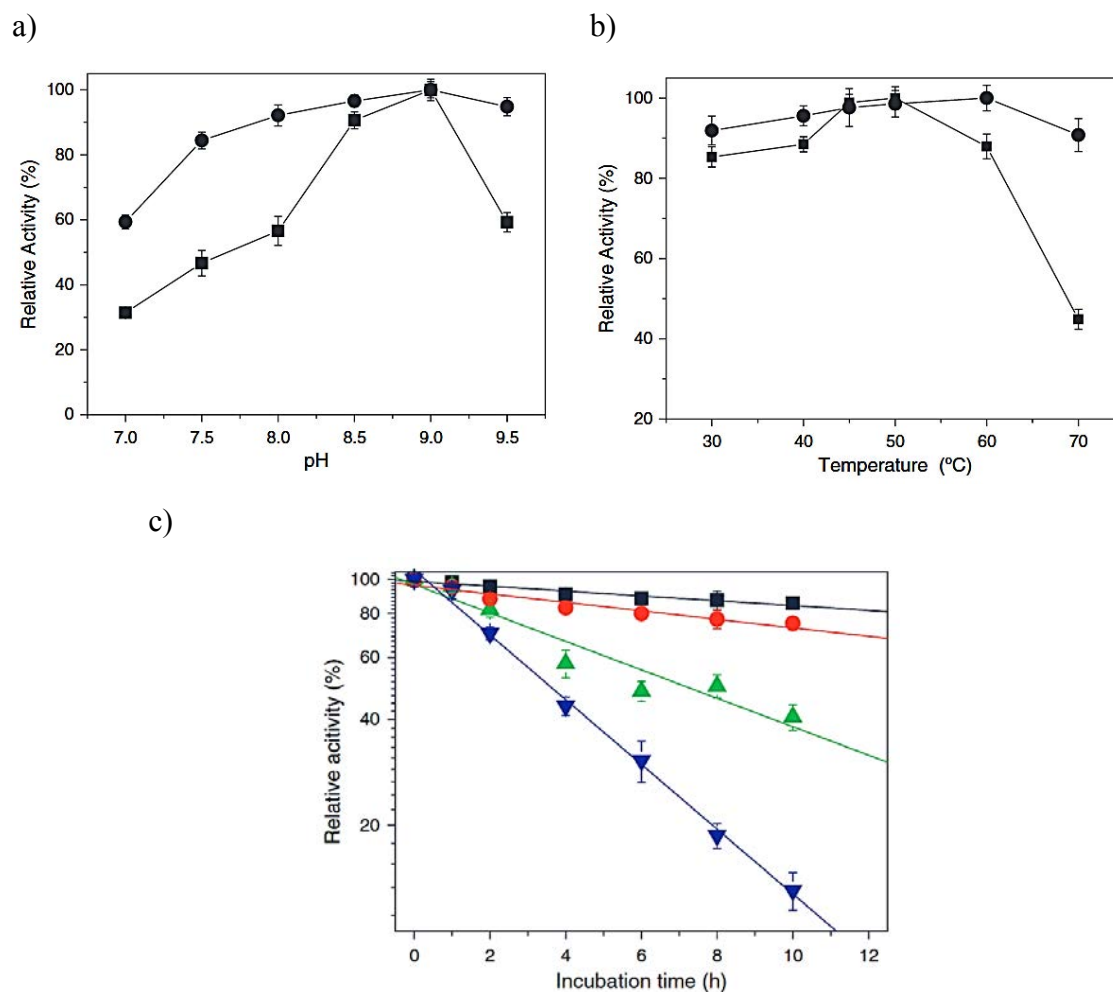


Figure 1.24: Effet du pH a) et de la température sur l'activité relative de lipases libre (■) ou immobilisé sur $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (●) ; c) Stabilité thermique des lipases immobilisées à 50 (■) ou 70°C (●) ou libre à 50 (▲) ou 70°C (▼) (Liu et al., 2014).

e. Les nanotubes de carbone

Les supports carbonés et notamment les nanotubes de carbone sont d'excellents matériaux de support pour l'immobilisation enzymatique. En effet, la surface importante du matériaux, l'efficacité pour l'immobilisation de biocatalyseurs ainsi que sa résistance mécanique sont des atouts pour l'immobilisation enzymatique (Feng and Ji, 2011). Malgré un coût élevé et un caractère pulvérulent, l'avantage de l'utilisation de nanoparticules de carbone provient également de la facilité de synthèse de ces supports en l'absence de tensioactifs et de réactifs toxiques, de l'homogénéité des particules ainsi que de leur taille adaptable (Mohamad et al., 2015). Les nanotubes de carbones sont un enroulement de feuilles de graphites en cylindre. Il

existe des nanotubes de carbone à paroi unique (SWCNT) ou à paroi multiple constitué donc de plusieurs couches de graphite (MWCNT). Les SWCNTs sont principalement utilisés afin d'exploiter les propriétés électroniques du matériau. Les MWCNTs sont le plus souvent utilisés pour l'immobilisation de biocatalyseurs car ils permettent une meilleure dispersion des substrats et possèdent de propriétés électroniques moins importantes. Ils sont aussi moins chers que les SWCNTs. L'immobilisation peut être réalisée par physi- ou chimisorption.

Dans une étude menée par Ji (2010), la lipase de *Rhizopus arrhizus* a été immobilisée de façon covalente sur un MWCNT (Ji et al. 2010). Les résultats de la comparaison des performances entre l'enzyme libre et de l'enzyme immobilisée pour la résolution du mélange racémique (*R,S*)-1-Phenyl éthanol sont présentés sur la Figure 1.25. Les résultats obtenus montrent que l'immobilisation de l'enzyme a permis d'augmenter le taux de conversion de la réaction et d'améliorer la thermo stabilité de l'enzyme.

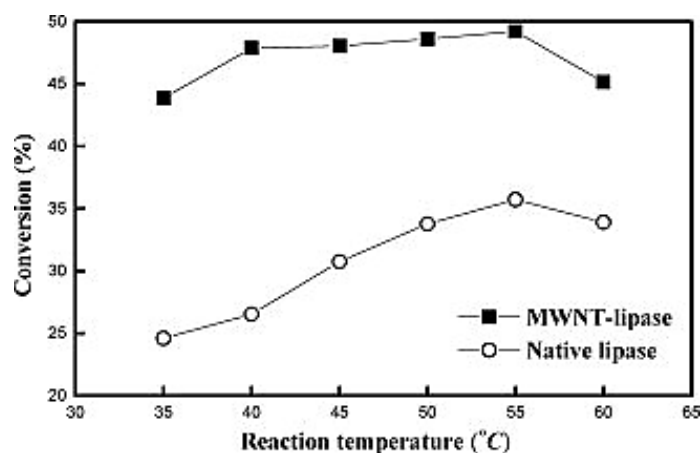


Figure 1.25: Effet de la température de la réaction catalysée par la lipase libre ou immobilisée MWNT-lipase (Ji et al., 2010).

2.3.1.2. Paramètres influençant l'immobilisation enzymatique

Le support, utilisé pour immobiliser les enzymes doit présenter des propriétés physiques adaptées à la méthode d'immobilisation et au catalyseur choisi. Plusieurs paramètres du support peuvent avoir un effet sur l'immobilisation d'enzymes tels que la taille et l'organisation des pores ainsi que les propriétés de surface du matériau (Tableau 1.17).

Tableau 1.17: Paramètres à prendre en compte lors de l'immobilisation d'enzyme (Hanefeld et al., 2009)

Enzyme	support	Facteurs spécifiques liés au système réactionnel
taille de l'enzyme	organique ou inorganique	milieu réactionnel
conformation, flexibilité requise pour le mécanisme	hydrophobe ou hydrophile	limitations diffusionnelles
point isoélectrique	charge de surface	inhibition enzymatique
groupement fonctionnel de surface/densité de charge	fonctionnalisation	précipitation du produit
glycosylation	stabilité chimique et mécanique	viscosité du milieu
stabilité aux conditions d'immobilisation	aire en surface	réaction thermodynamique
présence de région hydrophobe	porosité	support/soluté non spécifique
présence de région hydrophile	taille de particule	
additifs		

Dans le cas de l'immobilisation par physisorption, le taux d'adsorption est plus élevé lorsque la taille des pores est proche, et bien sûr légèrement supérieure à celle de l'enzyme. Cela permet également de diminuer le taux de désorption des enzymes. En revanche cela peut devenir limitant du point de vue transfert de matière avec des milieux réactionnels trop visqueux. L'organisation des matériaux peut également varier et devenir limitante pour la diffusion des enzymes dans le support. Par exemple, avec un réseau de pores unidimensionnel, il existe un risque de bouchage de certains pores, contrairement à un réseau tridimensionnel où les pores sont interconnectés. En fonction de la nature et de la composition des tensioactifs utilisés lors de la synthèse des matériaux, les propriétés de surface de ceux-ci seront différentes. En effet, les charges présentes à la surface des matériaux seront différentes s'ils ont été préparés à partir de tensioactifs cationiques (surface du matériau + négatif) ou non-ioniques. Le point isoélectrique de l'enzyme est une valeur importante pour l'immobilisation et est à prendre en compte dans la détermination du pH optimal d'immobilisation. (Jacoby et al., 2013). De la même manière, les propriétés de surface des supports sont importantes et il est possible de les moduler. En effet, dans le cas des matériaux silicatés quelques éléments inorganiques peuvent être insérés comme l'aluminium ou le titane.

2.3.2. Influence du type de réacteur

Le choix d'un réacteur approprié est une tâche importante. En effet, de nombreux types de réacteurs sont disponibles à l'heure actuelle. Le premier niveau de séparation est la réalisation de réaction en continu ou discontinu, puis viennent le fait de travailler avec un catalyseur libre (homogène) ou immobilisé (hétérogène). La nature du milieu réactionnel, la nature du solvant et les substrats utilisés, doivent être compatibles avec le mode d'agitation/circulation dans le réacteur. Enfin le contrôle des paramètres de température, pH, pression, débit, temps de séjour est ici crucial. Dans cette partie ont été décrits le réacteur micro-onde et le réacteur micro-fluidique.

2.3.2.1. Influence du mode de chauffage : les réacteurs micro-ondes

Comme vu précédemment, la température d'une réaction est un paramètre important à maîtriser afin d'avoir le meilleur rendement de conversion et la meilleure vitesse de conversion possibles. Différents modes de chauffages existent. Il y a les chauffages conventionnels, basés sur l'usage d'un fluide caloporteur et de la conduction, et les chauffages non-conventionnels dont le chauffage par micro-ondes. Le chauffage par micro-onde connaît depuis une vingtaine d'années un important essor (Collins and Leadbeater, 2007). Malgré cela, peu d'études traitent de la biocatalyse assistée par chauffage micro-onde. Mais ce nombre est en constante augmentation. Actuellement, l'effet des irradiations micro-ondes sur le système catalytique est encore discuté. De nombreuses études ont donc pour but de vérifier l'impact des irradiations micro-ondes sur les réactions impliquant un biocatalyseur.

2.3.2.1.1. Principe du chauffage par micro-ondes

Le chauffage par micro-ondes consiste à faire passer au travers d'un milieu réactionnel des ondes dont la fréquence est comprise entre 0,3 et 300 gigaHertz (Martínez-Palou, 2010). L'activation micro-onde serait due à un effet thermique engendré par l'agitation moléculaire qui résulte de l'inversion des dipôles (en particulier l'eau) face à l'alternance du champ électrique ce qui provoque des réchauffements localisés qui se propagent par la suite à l'ensemble du milieu par conduction ionique. L'augmentation de la température est alors homogène dans l'ensemble du milieu. La Figure 1.26 compare les gradients de température de deux modes de chauffage : micro-onde et bain d'huile. Ces résultats indiquent clairement que

l'irradiation par micro-ondes augmente la température de manière plus homogène en 1 minute de chauffage tandis que dans le tube chauffé par un bain d'huile, la chaleur se retrouve sur les parois du tube et non au cœur. Il est toutefois à noter que la qualité du transfert thermique peut être affectée par l'hétérogénéité du milieu réactionnel.

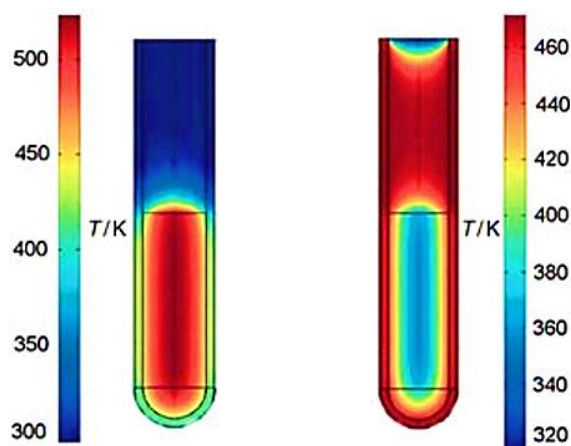


Figure 1.26: Comparaison des gradients de températures lors d'un chauffage par micro-ondes et ceux par chauffage avec un bain d'huile : après 1 min d'irradiation par micro-ondes (à gauche) et traitement dans un bain d'huile (à droite) (Kappe, 2004).

L'activation micro-onde pourrait également être liée à des effets dits non-thermiques, comme par exemple des interactions de type dipôle-dipôle entre les molécules polaires et le champ électrique, pouvant causer, par exemple, la formation d'un intermédiaire tétraédrique et donc favoriser les réactions, cela permettrait également une meilleure stabilité et sélectivité des enzymes (Fanti et al., 2015; Mazinani and Yan, 2016).

2.3.2.1.2. Effet du chauffage par micro-ondes : milieux non-aqueux

Le chauffage par réacteur micro-ondes permettrait donc d'augmenter de manière significative les rendements de réaction enzymatiques. L'équipe de Kidwai a réalisé en 2009 une étude comparative de l'acylation par CALB de l'éthanolamine avec divers acides gras en chauffage conventionnel et micro-ondes. Les résultats obtenus ont montré que les rendements étaient augmentés d'un facteur 10 sous irradiation micro-ondes comparativement au chauffage

conventionnel. Les vitesses de conversion étaient également améliorées. La sélectivité de cette réaction est orientée vers la N-acylation (Kidwai et al., 2009).

L'équipe de Yadav a observé un rendement 190 fois plus élevé sous irradiation micro-onde comparativement au chauffage conventionnel dans le cadre de l'étude de l'acétylation du citronellol par CALB. Selon ces auteurs, cette amélioration serait due à l'augmentation de l'affinité de l'enzyme pour son substrat en raison de l'augmentation de la fréquence de collision des molécules ainsi que la réduction de la constante d'inhibition sous l'effet des irradiations micro-ondes (Yadav and Borkar, 2009). La même équipe a également montré une amélioration du taux de conversion de la réaction lors de transestérification du 1,2-propanediol avec le carbonate de diméthyle pour la synthèse de carbonate de propylène par CALB avec un chauffage par micro-ondes par rapport à un chauffage conventionnel (Yadav et al., 2015). La comparaison des rendements obtenus est présentée sur la Figure 1.27. Ces résultats montrent la présence d'un effet thermique avec l'augmentation du rendement de conversion avec la température de la réaction ainsi qu'une nette amélioration du rendement par les effets non-thermiques issus du chauffage par irradiation micro-onde.

L'O-acylation énantiosélective du 2-amido-phényléthanol par la lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisées a été réalisée au sein de liquides ioniques purs ou en mélange avec un solvant organique. Outre une forte influence de la nature du solvant utilisé, cette réaction a montré que dans un mélange liquide ionique/solvant organique aucune différence n'apparaît entre le chauffage micro-ondes et le chauffage conventionnel (Lundell et al., 2005).

L'utilisation des réacteurs micro-ondes permettrait donc d'intensifier les procédés de biocatalyse enzymatique grâce à une température plus homogène dans les milieux réactionnels. Une amélioration d'origine non-thermique de l'activité et de la stabilité des enzymes est aussi espérée. Néanmoins, les conditions opératoires doivent être adaptées à ce changement de mode de chauffage (nature du solvant, puissance de chauffage...). Par ailleurs, certaines études ont indiqué que l'irradiation micro-onde n'induisait pas toujours d'effets significatifs sur les taux de conversion. Aucune amélioration de la réactivité de CALB lors de la transestérification du butanoate d'éthyle par le butanol à 110°C, dans un réacteur micro-onde, n'a été observée (Réjasse et al., 2006). Par contre CALB s'est avéré plus stable lors de la réaction menée dans ce réacteur micro-onde.

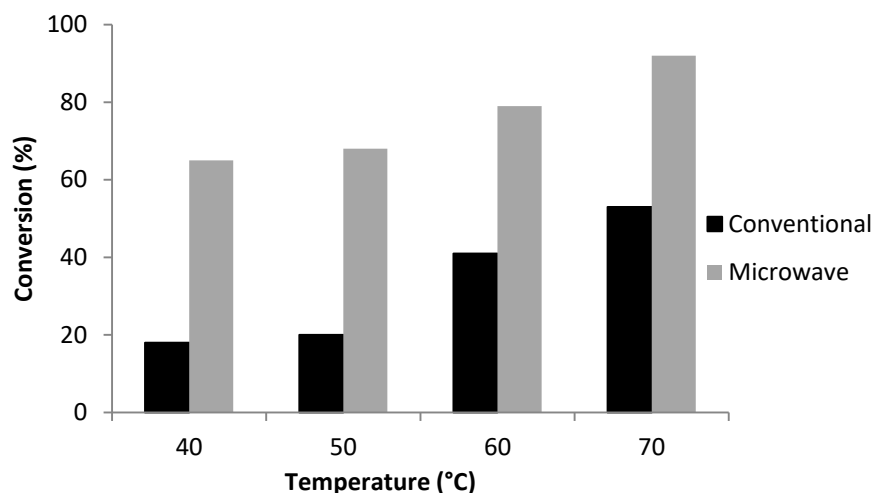


Figure 1.27: Comparaison des taux de conversion de la réaction de transestérification du 1,2-propanediol avec le carbonate de diméthyle pour la synthèse de carbonate de propylène par la lipase B, en réacteur conventionnel et en réacteur micro-ondes (Yadav et al., 2015).

2.3.2.1.3. Effet du chauffage par μ ondes : milieux aqueux

De nombreuses études ont suggéré que l'irradiation par micro-ondes n'a aucun effet sur l'activité enzymatique dans des solutions aqueuses. Le Tableau 1.18 synthétise quelques études de catalyse en milieux aqueux sous irradiations micro-ondes. La plupart des études qui ont concerné le chauffage micro-onde avec des réactions en milieux aqueux ont constaté l'absence d'effet voire un effet délétère par rapport au chauffage conventionnel. Néanmoins, l'équipe de Bradoo a réalisé une étude comparative du mode de chauffage sur plusieurs lipases et les résultats ont indiqué des taux de conversion 7 à 12 fois plus élevés avec le chauffage micro-onde (30 s à 1,35kW). Cependant, une incertitude sur la température réelle sous l'exposition aux micro-ondes ne permet pas d'affirmer clairement si cette amélioration est liée à un effet thermique ou non (Bradoo et al., 2002). Dans l'étude réalisée par Zhu (2006), l'activité hydrolytique observée possède une vitesse initiale plus élevée que lors d'une réaction menée en chauffage conventionnel. Mais le rendement final est inférieur. Il y aurait donc une inactivation thermique des biocatalyseurs (Zhu et al., 2006).

Globalement les études sur l'effet des irradiations micro-ondes en milieu aqueux ont donné lieu à des résultats divergents. En effet les résultats indiquent des inactivations enzymatiques, des améliorations d'activité voire l'absence d'effet sur la réaction (Tableau 1.18) (Zhao, 2010).

Tableau 1.18: Effet des irradiations micro-ondes sur l'activité enzymatique en milieux aqueux (Zhao, 2010)

Enzyme	Fréquence (GHz)	Puissance (W.g ⁻¹)	Température (°C)	Effet	Référence
Cellulase from <i>Penicillium funiculosum</i>	2,45	0.001-0.1	35	Pas d'effet	(Kabza et al., 1996)
<i>Trichoderma reesi</i> cellulase		3	45-55	Vitesse initiale plus élevée mais rendement plus faible	(Zhu et al., 2006)
γ -amilase from <i>Rhizopus mold</i>		0-7,5	60	Amélioration de l'activité enzymatique	(Gelo-Pujic et al., 1997)
Lactate deshydrogenase		135	/	Pas d'effet thermique	(Hategan et al., 2000)
Différentes lipases				Augmentation du taux de conversion	(Bradoo et al., 2002)
Lipase d' <i>Aspergillus carneus</i>				38-40, 90	Amélioration du rendement d'hydrolyse

2.3.2.2. Influence de l'hydrodynamique

Lorsque l'on souhaite intensifier un procédé en bioréacteur l'hydrodynamique est d'une grande importance pour s'assurer d'être dans les meilleures conditions de température et de mélange. Lorsqu'un processus enzymatique implique un milieu réactionnel biphasique, l'amélioration du mélange est un point crucial. L'utilisation de micro-réacteurs échangeurs compacts est l'une des possibilités, lorsque l'on souhaite améliorer les performances à la fois thermique et hydrodynamique d'une réaction. En effet, ce type de réacteurs permet d'avoir une surface d'échange de chaleur importante ainsi qu'une bonne capacité de mélange grâce à des géométries spécifiques complexes.

Il existe différents types de réacteurs-échangeurs. Certaines études ont réalisé des comparaisons entre plusieurs réacteurs. Ainsi, l'équipe de Elgue a réalisé une étude comparative de trois réacteurs pour intensifier une réaction d'estérification de l'éthanol avec l'acide oléique en continu catalysée par CALB en milieu aqueux. Les trois réacteurs étudiés sont représentés sur la Figure 1.28. Les réacteurs micro-fluidiques de Corning et Chart Industries sont deux réacteurs de type mélangeur statique qui permet un mélange par leur forme géométrique. Le 3^{ème} réacteur, Nitech Solutions COBR (Continuous Oscillatory Baffled Reactor), réalise un mélange dynamique par un dispositif de pulsation dans des tubes chicanés (Elgue et al., 2013). Dans ce dernier, il y a création d'un flux laminaire permettant d'obtenir des temps de séjours supérieurs par rapport aux systèmes d'écoulement turbulents.

Dans le cas du réacteur Corning, la géométrie utilisée pour réaliser le mélange est une géométrie en forme de cœur. Ce type de réacteur est caractérisé par un bon mélange, mais également des distributions de temps de séjour contrôlées, des coefficients d'échange thermique élevés ainsi que des coefficients de transfert de matière importants ont été mis en évidence (Moreau, 2014). Les résultats de l'étude comparative menée par Elgue et al., ont donc permis de prouver que les 3 réacteurs étudiés sont adaptés pour réaliser des réactions enzymatiques en milieux biphasique. Plus précisément, il s'est avéré que le réacteur Nitech était plus efficace en ce qui concerne les transferts de masse en permettant de moduler facilement le temps de séjour. Concernant les deux réacteurs Corning et Chart, il a été observé un transfert de masse dépendant du débit mais des performances intéressantes ainsi qu'une meilleure fiabilité et un coût moindre comparativement au réacteur Nitech. Dans une étude de Novak (2015), les performances de plusieurs types de réacteurs (continu avec recyclage de l'enzyme, discontinu et micro-fluidique) ont été comparées pour la synthèse d'acétate d'isoamyle catalysée par CALB dans un système biphasique. Les résultats obtenus ont confirmé l'efficacité élevée du réacteur micro-fluidique (Corning Advanced-Flow™).

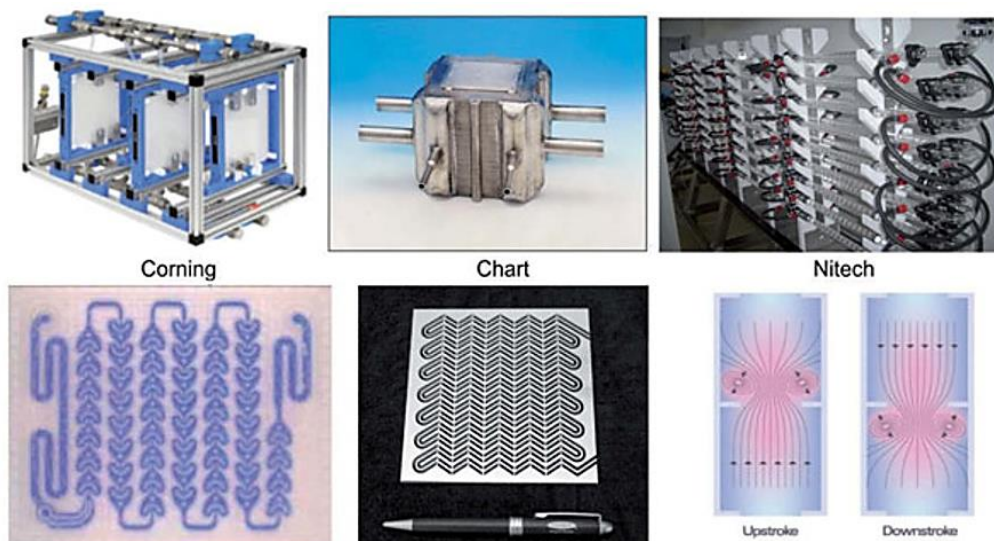


Figure 1.28: Conceptions externes et internes pour les réacteurs Corning, Chart et Nitech (Elgue et al., 2013)

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

1. Étude théorique : modélisation moléculaire

1.1. Outils informatiques

- Ordinateur : bi-processeur Intel Xeon 4CPU L5420 (2,5 Ghz, 30 cœurs de calculs, 16 Go de mémoire)
- Logiciel : Discovery Studio 4.1 (Accelrys, Inc).

1.2. Simulations de docking flexible

1.2.1. Construction des structures

1.2.1.1. Structure des ligands

Les outils du module Builder de Discovery Studio 4.1 ont été utilisés pour réaliser la construction des structures tridimensionnelles des acides aminés et peptides étudiés. Le champ de force CHARMM a été appliqué sur chaque structure. Cette étape permet le typage des atomes qui est une étape importante avant de réaliser une minimisation. En effet, cette étape assure que le système moléculaire est correctement paramétré et que les résultats pourront être exploités. L'étape suivante est la réalisation d'une correction géométrique (clean geometry) permettant d'ajuster la longueur des liaisons ainsi que les angles. Suivi d'une étape de minimisation des énergies des systèmes de 2000 itérations avec l'algorithme : Steepest Descent.

1.2.1.2. Structure de CALB et de l'acyl-CALB

La structure cristallisée 1LBS a été choisie dans la protein data bank (PDB) pour réaliser cette étude. Ce cristal de l'enzyme CALB est composé de six chaînes protéiques. Chacune de ces chaînes est constituée de 317 acides aminés, et contient un inhibiteur éthyl-hexylphosphonate lié de manière covalente à la sérine catalytique. La triade catalytique de CALB est constituée des résidus : Ser105, His224 et Asp187. Les chaînes contiennent aussi un dimère de N-acétyl-glucosamine lié au résidu asparagine 74. De plus, 92 molécules d'eau sont adsorbées à la chaîne A. Dans les études de modélisation moléculaire portant sur cette lipase, la forme cristalline 1LBS fait partie des structures les plus citées. En effet, la présence de l'inhibiteur

phosphonate fournit des informations expérimentales sur le mode d'ancrage et l'orientation du ligand vis-à-vis des résidus de trou oxyanionique : Thr40 et Gln106. La structure de l'oléoyl-CALB construite et optimisée dans les travaux de thèse de Ferrari (2014) a été utilisée comme point de départ pour notre étude. La construction de cette structure a été réalisée en plusieurs étapes :

- suppression de l'inhibiteur éthyl-hexylphosphonate et du dimère N-acétyl-glucosamine
- addition des atomes d'hydrogène
- ajustement de l'état de protonation des résidus à un pH neutre.
- la structure est solvatée avec des molécules d'eau de type TIP3P.
- le système est neutralisé avec un contre-ion

Par la suite, des simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées afin d'étudier à la fois la stabilité structurale de l'oléyl-CALB et le positionnement de la chaîne acyle carbonée à l'intérieur de la cavité. Les différents acyl-enzymes utilisés dans cette étude ont été construits en modifiant la chaîne du système oléyl-CALB. L'énergie des systèmes a été minimisée afin de réajuster la position des atomes.

1.2.2. Définition du site actif

La définition du site actif permet d'indiquer la zone dans laquelle le ligand va être amarré. Afin de définir le site actif la méthode dite des cavités a été employée. Cette méthode considère les cavités présentes à la surface de l'enzyme comme des sites de liaison probables.

Le schéma sur la Figure 2.1 représente les deux étapes de cette recherche du site actif :

- dans un premier temps, une grille tridimensionnelle (x, y, z) est créée autour de la protéine avec un espacement de 0,5 Å, puis chaque point de cette grille est classé comme étant libre ou occupé par la structure de la protéine
- dans un second temps, les points libres sont progressivement éliminés jusqu'à atteindre la structure de la protéine

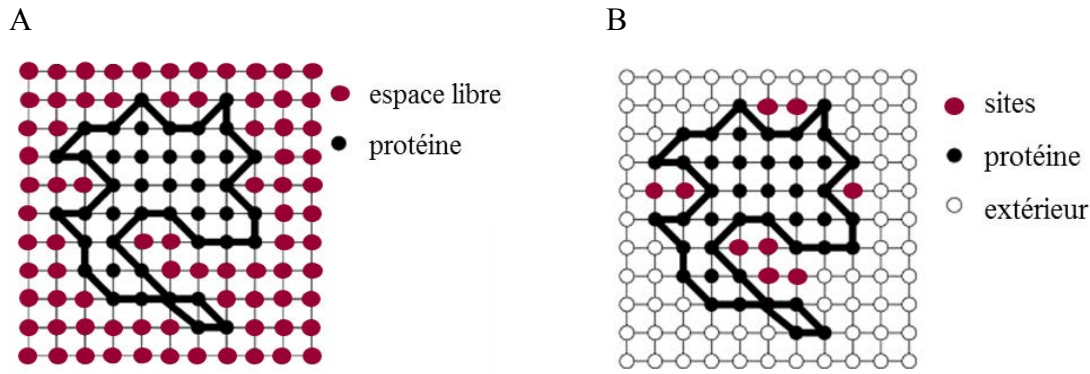


Figure 2.1: Schéma représentant les étapes de la recherche de cavité au sein d'une grille tridimensionnelle avec espacement de 0,5 Å : (A) détermination des espaces occupés par la protéine et des espaces vides, (B) élimination progressive des points jusqu'à atteindre la zone souhaitée (Venkatachalam et al., 2003).

Cet outil conduit à l'obtention de plusieurs sites possibles. Le choix du site est donc ensuite réalisé sur la base des connaissances de l'enzyme étudiée comme les résidus catalytiques par exemple. Dans le cas de CALB, la cavité de site actif est déjà bien connue. En effet, la cavité catalytique de CALB a été décrite comme profonde et étroite de dimension : 10 Å x 4 Å de largeur et 12 Å de profondeur (J. Uppenberg et al., 1994). Cette cavité est divisée en deux zones : l'une hydrophobe constituée de résidus aliphatique tels que Leu140, Ala141, Leu144, Val149, Val154, Asp187, Ile189, His224, Leu278, Ala281, Ala282, Ile285 et Val286 ainsi qu'une petite zone à caractère plus hydrophile causé par la présence des résidus Thr40, Asp134 et Gln157.

1.2.3. Simulation de docking

Le docking moléculaire est une méthode de calcul permettant la prédiction du positionnement d'un ligand à l'intérieur du site actif de la protéine cible. Cette méthode utilise des algorithmes permettant d'explorer l'espace conformationnel du ligand et de le positionner selon différentes orientations dans le site actif. Il existe plusieurs types d'algorithmes de docking permettant ou non d'appliquer une flexibilité sur l'enzyme et le ligand.

1.2.3.1. Algorithme de docking rigide

Le protocole ligandfit est constitué de plusieurs étapes dont l'enchaînement est représenté sur la Figure 2.2 (Venkatachalam et al., 2003).

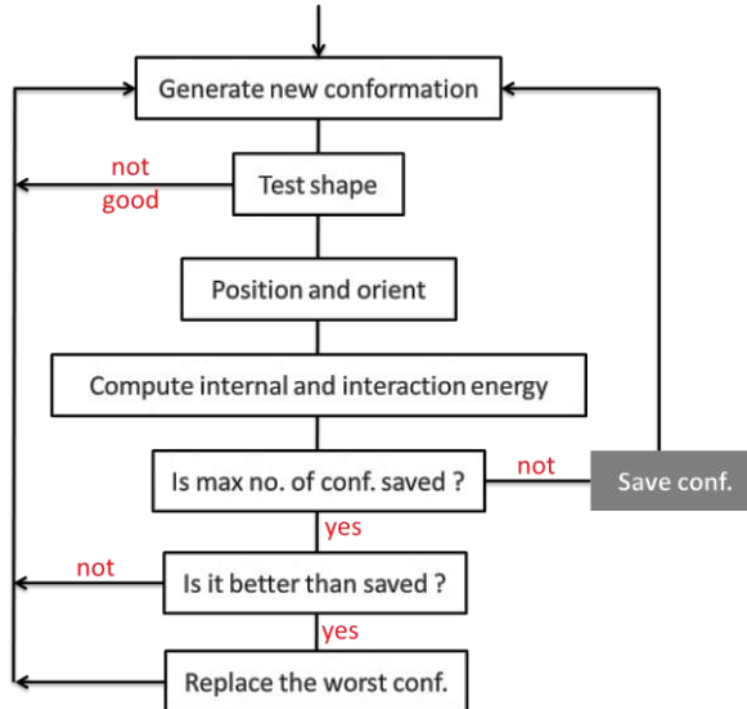


Figure 2.2: Organigramme des étapes principales suivies par l'algorithme de docking LigandFit

L'étape qui suit la définition du site actif est l'échantillonnage de l'espace conformationnel du ligand selon une méthode stochastique (Monte Carlo). La génération et la sélection des différents conformères du ligand sont réalisées selon la méthode suivante. À partir d'une conformation initiale n du ligand, chaque angle de torsion de la molécule est soumis à une incrémentation aléatoire, ce qui permet d'obtenir un nouveau conformère $n+1$ (Oldfield, 2001). Chacun des conformères obtenus va être ensuite placé à l'intérieur du site actif selon 4 orientations conduisant à 4 positionnements différents du ligand (Figure 2.3).

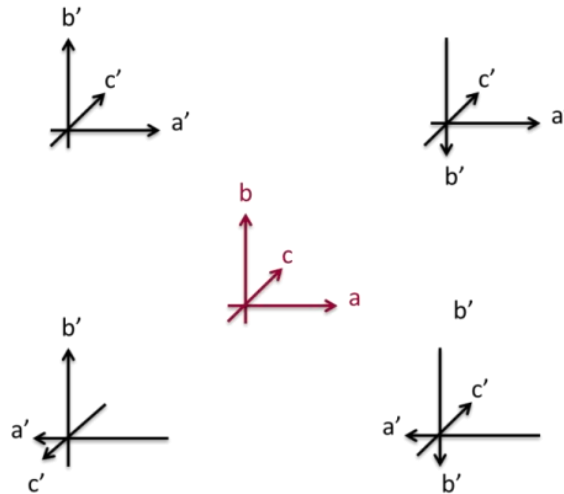


Figure 2.3: Représentation des 4 orientations (a, b et c) selon lesquelles le ligand est placé dans la cavité du récepteur. représentation des 4 positionnements générés pour un ligand donné (a', b' et c') (Venkatachalam et al., 2003)

L'étape suivante consiste à évaluer la concordance de forme du ligand dans le site actif, appelé filtre géométrique. Ce protocole utilise un principe de comparaison mathématique basé sur la représentation du ligand et de la cible sous la forme d'un ensemble de points dans l'espace cartésien tridimensionnel. Les poses présentant une bonne concordance géométrique avec le site actif cible sont retenues à l'issue du filtre géométrique. L'énergie d'interaction est alors évaluée comme étant la somme des contributions des forces de Van der Waals et électrostatiques. Cette énergie est calculée selon l'équation ci-dessous (terme de Lennard Jones 9-6) :

$$E = \sum_{i,j} \varepsilon_{ij} \left[2 \left(\frac{r^*_{ij}}{r_{ij}} \right)^9 - 3 \left(\frac{r^*_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{332.1}{\varepsilon} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{r_{i,j}}$$

→ $r^*_{ij} = \sqrt{r^*_i r^*_j}$: distance entre les atomes i du ligand et j de la protéine avec r^* le rayon de Van der Waals de l'atome

→ $\varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j}$ avec ε = paramètre d'énergie de l'atome i du ligand et j de la protéine

→ ε : la constante diélectrique du terme électrostatique

→ q : les charges électriques des atomes i et j

Pour chaque conformère du ligand, ces étapes sont répétées jusqu'à atteindre le nombre maximal de conformères fixé par le modélisateur. La dernière étape consiste à classer les différents complexes acyl-enzyme / ligand, appelés également « poses », ayant favorablement

passé les filtres géométriques et énergétiques. Le classement de ces poses (scoring) est réalisé en appliquant des fonctions de score. Dans le cas présent, le scoring des poses est déterminé sur la base d'un consensus associant plusieurs fonctions de score, de manière à améliorer la fiabilité du classement. Le consensus score définit le nombre de poses retenues et les classe en fonction du score obtenu par chaque pose selon chaque fonction de score et du nombre de fois où une pose apparaît dans le meilleur classement de chaque fonction de score. Les 6 fonctions de scores utilisées sont : PLP1 et PLP2 (Gehlhaar et al., 1995), LigScore1 et 2 (Krammer et al., 2005), Jain (Jain, 1996) et PMF (Muegge, 2006; Muegge and Martin, 1999). À l'issue de ce consensus de score, le classement d'une pose correspondra au nombre d'apparition de cette pose dans les différents classements établis par les fonctions de score utilisées.

1.2.3.2. Algorithme de docking flexible

L'équipe de Koska (2008) a mis au point un protocole permettant de réaliser un docking flexible rapide et précis (Koska et al., 2008). Le cheminement des différentes étapes de ce protocole sont représentées sur la Figure 2.4.

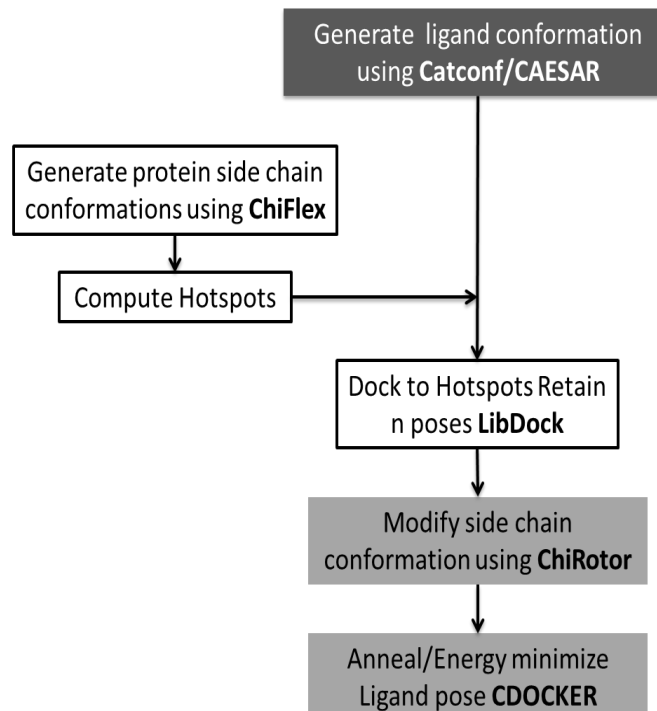


Figure 2.4: Protocole de docking flexible issu de l'étude de Koska (2008). Protocole en trois étapes : génération des conformations des chaînes latérales des résidus flexibles de la protéine ; génération des conformations de ligand et placement des ligands rigides dans chaque cavités ; flexibilité des chaînes latérales affinements en présence du ligand.

Ce protocole a été mis au point en s'inspirant d'autres protocoles existants, notamment pour le choix des algorithmes utilisés permettant d'appliquer une flexibilité sur les chaînes latérales de résidus choisis.

Le choix des résidus sur lesquels la flexibilité a été autorisée, s'est porté sur ceux constituant la région hydrophobe du site actif : Leu140, Ala141, Leu144, Val149, Ser150, Ala151, Val154, Ile189, Lys290, Leu278, Ala281, Ala282, Ile285 et Ala286. Ont été également sélectionnés, les résidus du trou oxyanionique (Thr40, Gln106), la triade catalytique (Ser105, His224, Asp187) ainsi que les résidus à caractère hydrophile Asp134 et Gln157.

La première étape utilise l'algorithme ChiFlex qui permet d'explorer l'espace conformationnel des chaînes latérales des résidus sélectionnés et de minimiser leur énergie au travers du champs de force CHARMM (Annexe 1) (Spasov et al., 2007). Pour chaque conformation des récepteurs ainsi générées, les points chauds d'interactions correspondant aux zones polaires et apolaires sont localisés. En parallèle, l'algorithme Catconf est utilisé pour échantillonner les conformations du ligand, permettant ainsi de générer rapidement un large panel de conformations (~ 50 conformères.mn⁻¹) (Li et al., 2007; Smellie et al., 1995a, 1995b, 1995c).

À l'étape suivante, l'algorithme LibDock est appliqué afin de permettre un docking rapide et précis des ligands dans les récepteurs (Diller and Merz, 2001). Un docking rigide guidé par les identifications des correspondances entre les points chauds de la protéine et les groupements polaires et apolaires du ligand est alors réalisé. Les poses possédant des interactions favorables entre le ligand et le récepteur vont ensuite subir une minimisation de l'énergie par CHARMM, permettant la flexibilité du ligand dans le site actif.

Les deux dernières étapes de ce protocole vont permettre d'affiner les résultats en appliquant la flexibilité des résidus du site actif préalablement sélectionnés. Les algorithmes ChiRotor et CDOCKER sont basés sur le champ de force CHARMM. ChiRotor va permettre d'affiner le positionnement des chaînes latérales flexibles, la minimisation et le calcul des énergies en présence du ligand dans la cavité. Un schéma détaillé du processus est présenté en annexe 2. Pour finir l'algorithme CDOCKER va affiner les différentes poses du ligand dans un récepteur considéré comme rigide, réaliser une minimisation et calculer l'énergie d'interaction au sein de chaque système (Wu et al., 2003). La stratégie de parallélisation de ces différentes étapes est représentée sur la Figure 2.5.

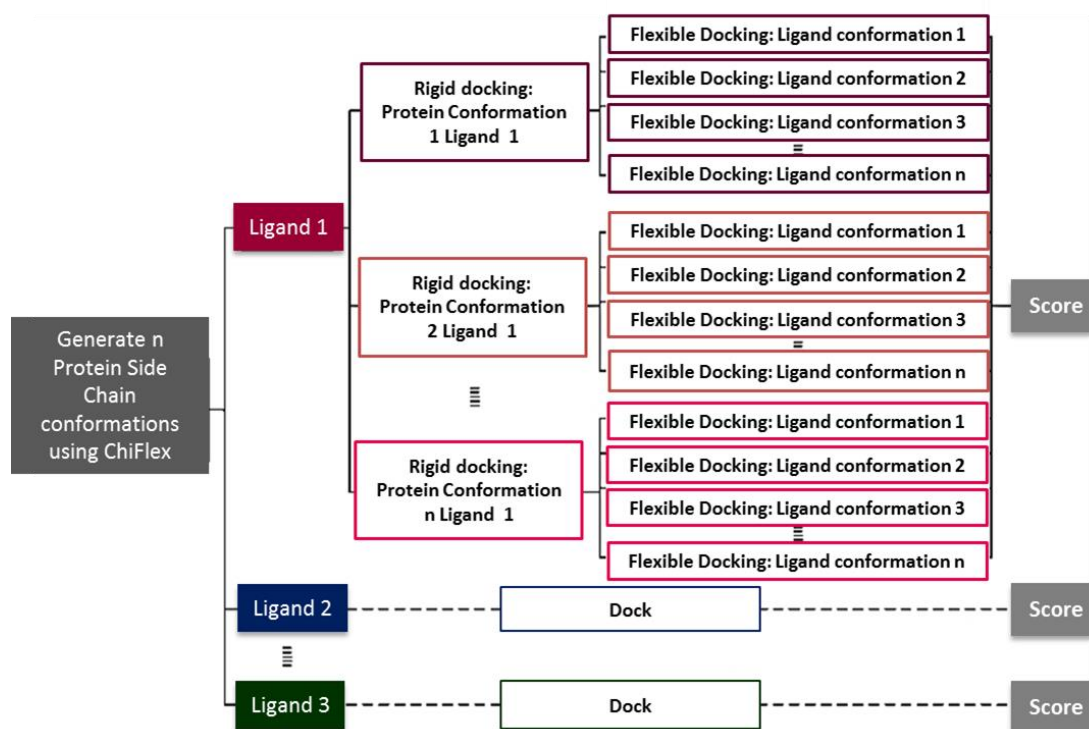


Figure 2.5: Stratégie de parallélisation appliquée lors du protocole Flexible Docking (Koska et al., 2008)

1.2.4. Analyse des résultats

1.2.4.1. Critères de distance

À l'issue du calcul de docking les complexes enzyme/ligand les plus probables sont obtenus. La première analyse réalisée sur ces complexes est la mesure de deux distances impliquées dans le mécanisme catalytique (Figure 2.6):

- [1] l'azote nucléophile de la fonction amine devant être acylée doit être à moins de 4 Å du carbone électrophile de l'acyl-enzyme afin qu'une attaque nucléophile puisse avoir lieu
- [2] un proton de la fonction amine devant être acylée doit être à moins de 4 Å de l'histidine catalytique afin de permettre un transfert

Le respect de ces deux critères indique la possibilité qu'un complexe puisse conduire à la formation du 2^{ème} intermédiaire tétraédrique et donc à la production de molécule acylée. De tels complexes sont qualifiés de productifs.

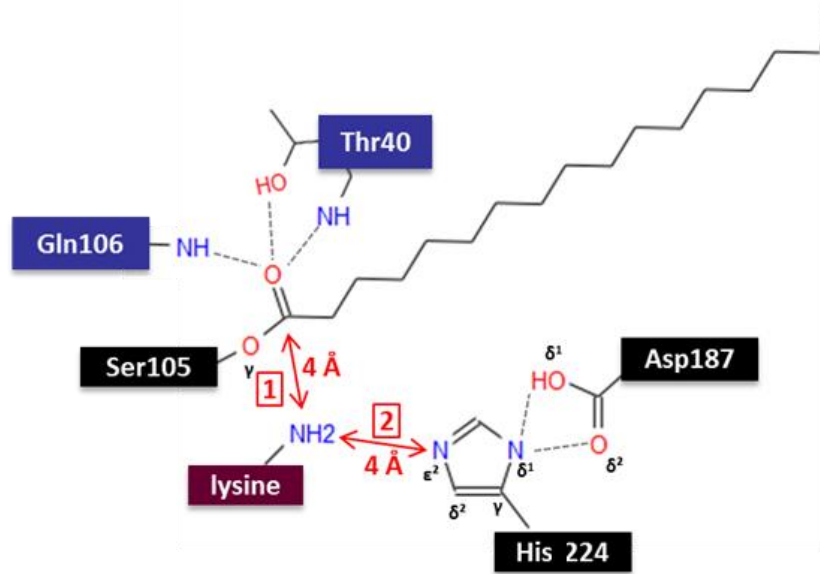


Figure 2.6: Critères de distance pour une réaction d'acylation efficace, catalysée par CALB.

1.2.4.2. Énergie d'interaction électrostatique

Les énergies d'interactions électrostatiques entre les résidus du site actif et la lysine ont été calculées. La détermination de l'énergie d'interaction électrostatique repose sur la méthode d'intégration exacte et sphérique autour des atomes. Les valeurs de l'énergie d'interaction ont été calculées selon l'équation ci-dessous qui correspond à l'intégrale de la densité d'électrons (obtenue par modélisation à partir d'une librairie d'atomes multipolaire) de la molécule A multiplié par le potentiel électrostatique de la molécule B, ou réciproquement (Domagała et al., 2011).

$$E_{elec} = \int \rho_A \phi_B dr_A = \int \rho_B \phi_A dr_B$$

La détermination de ces énergies d'interactions électrostatiques a été réalisée par l'équipe BioMod du laboratoire de Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations de la Faculté de Sciences et Technologie de Vandœuvre-lès-Nancy.

2. Étude expérimentale

2.1. Production des aminoacylases

2.1.1. Souches utilisées

Souche sauvage : *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877

Souches mutantes *S. ambofaciens* ATCC 23877:

- $\Delta SAM23877_1734::scar$
- $\Delta SAM23877_1485::scar$
- $\Delta SAM23877_1485::scar\Delta SAM23877_1734::scar$
- $\Delta SAM23877_1485::scar\Delta SAM23877_1734::scar\Delta SAM23877_0977::scar\Delta SAM23877_6191::scar$

Les mutants simples et double ont été construits au cours d'un travail précédent (Ferrari, 2014). La souche chez laquelle tous les gènes codant pour des amino-acylases potentielles chez *S. ambofaciens* ont été délétés a été construite au cours de ce travail dans le cadre d'un partenariat avec l'UMR 1128 DynAMic (Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne). Ces souches sont conservées à -80°C dans une solution de 15-20% de glycérol.

2.1.2. Obtention du quadruple mutant *S. ambofaciens* $\Delta SAM23877_1485::scar$

Le système REDIRECT (Gust et al., 2003) gènes des 4 gènes codant pour des amino-acylases potentielles chez *S. ambofaciens* ATCC 23877, *SAM23877_1485*, *SAM23877_0977*, *SAM23877_1734* and *SAM23877_6191* comme décrit dans des travaux précédents (Bunet et al., 2008; Pang et al., 2004). La cassette de mutagenèse *aac(3)-IV-oriT* utilisée pour le remplacement des gènes a été synthétisée par PCR à partir de pSPM88T pour *SAM23877_1485*, *SAM23877_0977* et *SAM23877_1734* ou de pIJ773 pour *SAM23877_6191*. Les caractéristiques de ces plasmides ainsi que les amorces utilisées sont regroupées dans le Tableau 2.1 et le Tableau 2.2. *E. coli* BW251113/pKD20 a ensuite été transformée, dans un premier temps par le BAC contenant le gène de l'acylase ciblée puis avec le produit de PCR contenant la cassette de mutagenèse permettant de remplacer le gène de l'acylase par recombinaison homologue. *E. coli* ET12567/pUZ8002 a ensuite été transformée avec les BAC mutés ainsi obtenus pour réaliser l'étape de conjugaison avec *S. ambofaciens* ATCC23877.

Les remplacements des différents gènes ont été confirmés par PCR avec des amorces flanquant les différents gènes ciblés (Tableau 2.2).

Tableau 2.1: Liste des souches, BAC et plasmides utilisées pour l'obtention du mutant Δ SAM23877_1485::scar Δ SAM23877_1734::scar Δ SAM23877_0977::scar Δ SAM23877_6191::scar

Souches, BACs ou plasmides	Caractéristiques principaux	Source ou référence
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	Souche contenant un plasmide permettant la mobilisation du cosmide recombinant lors de la conjugaison avec <i>Streptomyces</i>	(Macneil et al., 1992)
<i>E. coli</i> BW25113/pKD20	Souche utilisée pour la mutagenèse dirigée par PCR (<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> , <i>bla</i>)	(Datsenko and Wanner, 2000)
BAB8ZA11, BAA10ZD3, BAA12ZH2, BAB3ZC8	BACs issus de la banque de données de génome de <i>S. ambofaciens</i> (<i>cat</i>) portant des gènes codant pour des acylases	(Ferrari, 2014.)
BAB8ZA11::neo/ Δ SAM23877_1485:: <i>aac(3)IV+oriT</i>	<i>SAM23877_1485</i> remplacé par la cassette apramycine et le gène <i>cat</i> par le gène <i>neo</i>	
BAA10ZD3::neo/ Δ SAM23877_1734:: <i>aac(3)IV+oriT</i>	<i>SAM23877_1734</i> remplacé par la cassette apramycine et le gène <i>cat</i> par le gène <i>neo</i>	
BAB3ZC8::neo/ Δ SAM23877_0977:: <i>aac(3)IV+oriT</i>	<i>SAM23877_0977</i> remplacé par la cassette apramycine et le gène <i>cat</i> par le gène <i>neo</i>	
BAA12ZH2::neo/ Δ SAM23877_6191:: <i>aac(3)IV+oriT</i>	<i>SAM23877_6191</i> remplacé par la cassette apramycine et le gène <i>cat</i> par le gène <i>neo</i>	
pIJ773	<i>oriT</i> , <i>aac(3)IV</i>	(Gust et al., 2003)
pPSM88T	pOSV503 dérivé contenant <i>oriT</i>	(Raynal et al., 2006) ; A. Thibessard, pers. Com)

Tableau 2.2: Liste des amorces utilisées pour l'obtention du mutant Δ SAM23877_1485::scar Δ SAM23877_1734::scar Δ SAM23877_0977::scar Δ SAM23877_6191::scar.

Amorces	Nucleotide sequence (5'→3')
disrupt_sam1485_F	TGCCGGCCGGTCCGGCGAGGGGGGAGACTGGTCCATGATCCGGCCGGCCTTCGTTCCGGACGAA
disrupt_sam1485_R	CCCCGGAGAAGATCATCGCCCCGTCGGCCGGCAGATCAATCTGCCTCTTGTCGCCGAAGCAACT
disrupt_sam1734_F	AGCAGGGACACCAGCAGTGACAGCGGGAGGAACCACTGATCGCCGCCGCTTCGTTCCGGACGA
disrupt_sam1734_R	CTCGGGCGGTTCAGGACGCGTGAATCTCGGGCGGTTCAATCTGCCTCTTGTCGCCGAAGCAACT
disrupt_sam0977_F	TCAGCCGCCCTCCCAAGACGTCGGGAGGCACGATGATCGCCGCCGCTTCGTTCCGGACGA
disrupt_sam0977_R	GCTCGGCCGGCGGGTCCGGGACGGCCGGTCTCAATCTGCCTCTTGTCGCCGAAGCAAC
disrupt_sam6191_F	TCACCACGATCGCCTCCGCCCGCTGGAGGACGATGATTCGGGATCCGTCGACC
disrupt_sam6191_R	TCGTTCTGGGCCGTCCGCTCCGGACCCTGCGGCTCCTAATGATGAGGCTGGAGCTGCCTTC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGCCACGCCCTAC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGCCACGCCCTAC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGCCACGCCCTAC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGCCACGCCCTAC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGCCACGCCCTAC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGCCACGCCCTAC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGCCACGCCCTAC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGCCACGCCCTAC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGCCACGCCCTAC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGCCACGCCCTAC

Les nucléotides en gras sont identiques aux séquences présentes aux extrémités des gènes des différentes acylases.

2.1.3. Milieux de culture et conditions de production de l'extrait protéique

Quelle que soit la souche utilisée, la production d'aminocyclases de *S.ambofaciens* se déroule en plusieurs étapes. La première est l'étape de germination des spores dans du milieu ICS pendant 48h, à une température de 28°C, sous une agitation de 250 rpm. Pour réaliser cette étape, un volume de 100µL de spores est introduit dans 40mL de milieu ICS contenu dans une fiole d'Erlenmeyer stérile. L'étape suivante est la mise en pré-culture des bactéries obtenues à l'issue de l'étape de germination, en ensemençant du milieu de pré-culture « Koreishi » avec 10% (v/v) de la culture précédente (germination). La pré-culture est réalisée pour une durée de 48 heures dans les mêmes conditions de température et d'agitation. Cette étape de préculture permet d'obtenir une croissance bactérienne importante. Pour terminer, l'étape de production des aminocyclases est réalisée en ensemençant le milieu de culture « Koreishi » avec 3% (v/v) de la pré-culture. Cette étape dure 7 jours et se déroule à 28°C et 250rpm. Les compositions des milieux de cultures sont détaillées dans le Tableau 2.3.

Tableau 2.3: Compositions des milieux de cultures utilisés lors de la production du mélange d'aminocyclases par *S. ambofaciens*

Milieu	Composition	Proportion
ICS	Saccharose	15 g.L ⁻¹
	(NH ₄)SO ₄	10 g.L ⁻¹
	NaCl	3 g.L ⁻¹
	KH ₂ PO ₄	1 g.L ⁻¹
	MgSO ₄ , H ₂ O	0,2 g.L ⁻¹
	CaCO ₂	1,25 g.L ⁻¹
	Cornsteep (12,5 g.L ⁻¹)	400 mL.L ⁻¹ d'ICS
Koreishi (pré-culture ; pH 6,5)	Glucose	10 g.L ⁻¹
	Dextrines blanches	10 g.L ⁻¹
	Extrait de levure	5 g.L ⁻¹
	Hydrolysate de caséine	5 g.L ⁻¹
	CaCO ₂	1 g.L ⁻¹
Koreishi (culture ; pH 7)	Extrait de viande	40 g.L ⁻¹
	Amidon soluble	40 g.L ⁻¹
	Hydrolysate de caséine	20 g.L ⁻¹
	MgSO ₄ , H ₂ O	20 g.L ⁻¹
	K ₂ HPO ₄	2 g.L ⁻¹

2.1.4. Traitement des surnageant de culture

2.1.4.1. Lyse des cellules

La lyse des cellules a pour but de récupérer la totalité des protéines, intra- et extracellulaires. La lyse est réalisée par l'intermédiaire d'un disrupteur de cellule (Constant cell disruption system). Les cellules sont ainsi lysées par une succession de cycles de pression-décompression. Dans notre cas, la suspension bactérienne va subir deux passages au travers du cell disruptor à 1500 bars. L'élimination des débris cellulaires est ensuite effectuée par centrifugation à 8200 g, à 4 °C pendant 15 min (Avanti 30, Beckman) et le surnageant est récupéré.

2.1.4.2. Précipitation des protéines

L'addition de sulfate d'ammonium à forte concentration diminue la quantité d'eau disponible pour solvater les protéines qui précipitent. La précipitation s'effectue sous agitation pendant 2 heures à température ambiante en présence de sulfate d'ammonium, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, à 60% de la saturation. Les protéines précipitées sont ensuite récupérées après une centrifugation à 8200 g, à 4 °C, pendant 20 min (Avanti 30, Beckman). Le culot solide est ensuite re-solubilisé dans du tampon de réaction, Tris-HCl (25mM) NaCl (50mM) à pH 8.

2.1.4.3. Dialyse et diafiltration

À l'issue de la précipitation des protéines, l'excès de sulfate d'ammonium, doit être éliminé. En fonction du volume à traiter deux techniques ont été utilisées.

Une dialyse est réalisée contre du tampon Tris-HCl (25mM) NaCl (50mM) à pH 8. Lors de la dialyse, le transfert de sel se produit dans le sens de la solution la plus concentrée vers la solution la moins concentrée. La solution protéique est placée dans un boudin réalisé à l'aide de membranes de dialyse dont le seuil de coupure est de 12-14kDa (Spectrum laboratories, Inc.). Les boudins sont ensuite placés dans un bain de 10L de tampon Tris-HCl (25mM) NaCl (50mM) à pH 8. Un changement de tampon est répété 6 fois. Après 24 heures, le dialysat est récupéré.

La diafiltration permet le traitement de volumes plus importants. Dans ce travail, cette technique a été utilisée pour traiter des volumes de solutions protéiques de plusieurs centaines

de millilitres. Celle-ci a été réalisée sur un pilote Pilote Cogent® µScale (Millipore, Molsheim, France). La diafiltration est réalisée au travers d'un empilement de membranes planes en cellulose régénérée présentant un seuil de coupure de 1 kDa. Le principe de la diafiltration est de maintenir le volume de rétentat (fraction contenant les protéines) constant en ajoutant du tampon Tris-HCl (25mM) NaCl (50mM) à pH 8. Le perméat va contenir les sels et autres petites molécules provenant de la solution protéique initiale.

2.1.4.4. Concentration des protéines

Pour obtenir une fraction concentrée contenant des peptides de masse inférieure à 10 kDa, une ultrafiltration par centrifugation (système Amicon Ultra-15 ; Millipore, Billerica, MA, Etats-Unis) est réalisée. Le volume de la solution à concentrer est déposé dans le compartiment « rétentat » et centrifugé 30 min à 5000 g à température ambiante (20°C). De même que précédemment, dans le cas d'un volume élevé à traiter, il est possible d'utiliser l'ultrafiltration tangentielle avec le même pilote que précédemment. La différence réside dans l'absence d'ajout de tampon.

2.2. Immobilisation des aminoacylases de *S. ambofaciens*

Dans le cadre du projet d'ANR-15-CE07-0023 : « Intensified & Sustainable Enzymatic Acylation Processes on Innovative Macroporous/Mesoporous Materials », les enzymes issues de la culture de *S. ambofaciens* ont été immobilisées sur un support silicaté mésoporeux SBA-15. La fabrication de ce matériau ainsi que l'immobilisation des enzymes ont été réalisés par l'équipe Nouveaux Assemblage Nano-Organisés du laboratoire Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes à la Faculté de Sciences et Technologie de Vandœuvre-lès-Nancy.

2.2.1. Synthèse de SBA-15 (Santa Barbara amorphous 15)

La SBA-15 a été synthétisée selon le procédé sol-gel (ou solution-gélification) en conditions acides en présence du tensioactif structurant P123 ainsi que le précurseur de la silice, le tétraméthylorthosilicate (TMOS) (Figure 2.7). Le procédé sol-gel consiste en l'hydrolyse et la polycondensation du précurseur TMOS en dehors des micelles formées par le tensioactif

P123. Des lavages successifs à l'éthanol permettent ensuite d'éliminer le tensioactif et libérer la porosité de la silice.

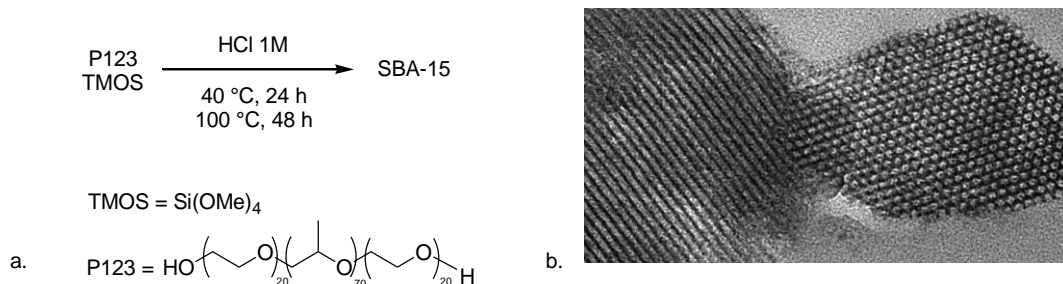


Figure 2.7: a) Synthèse SBA-15, b) Image MET d'une SBA-15

La silice SBA-15 a été caractérisée par plusieurs méthodes. L'adsorption-désorption d'azote est la méthode utilisée pour déterminer la surface spécifique des silices avec la méthode BET (Brunauer, Emmett et Teller) ainsi que la distribution du diamètre des pores par la méthode BJH (Barrett, Joyner et Halenda). La courbe enregistrée (Figure 2.8) montre un isotherme caractéristique de solides mésoporeux de type 2D-hexagonaux. Les silices SBA-15 synthétisées aux laboratoires SRSMC ont une surface spécifique de 877 m²/g, un volume poreux de 1,1 cm³/g et un diamètre des pores de 9,8 nm.

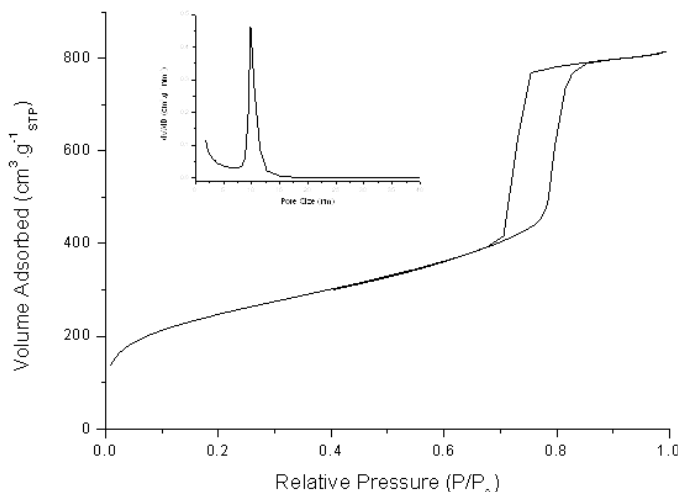


Figure 2.8: Isotherme d'adsorption d'une SBA-15 avec en insert la distribution du diamètre moyen des pores ; Surface spécifique = 877 m²/g ; volume poreux = 1,1 cm³/g ; diamètre des pores = 9,8 nm

La diffraction des rayons X aux petits angles (ou SAXS pour Small Angle X-ray Scattering) permet de déterminer la structure des silices SBA-15, ainsi que la distance de Bragg (d) et le

paramètre de maille (a) (Figure 2.9). Dans notre cas, les silices SBA-15 sont de structure 2D-hexagonale avec $d = 10,9$ nm et $a = 12,6$ nm.

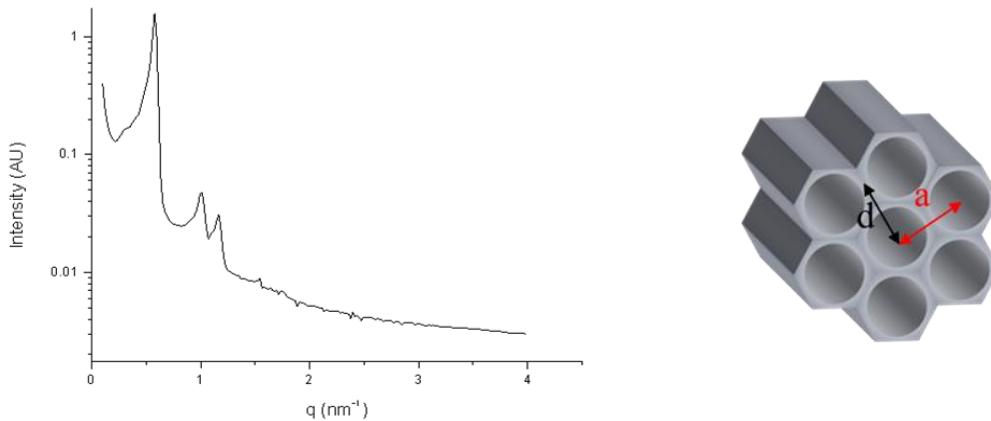


Figure 2.9: Diffractogramme SAXS d’une silice de type SBA-15 ; Distance de Bragg $d = 10,9$ nm ; paramètre de maille $a = 12,6$ nm

L’infrarouge permet de déterminer le type de liaisons présentes dans l’échantillon analysé. Dans le cas d’une silice de type SBA-15, les liaisons visibles sont les ponts siloxanes Si-O-Si, à 800 cm^{-1} , $1000\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ et $1850\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ (Figure 2.10). Les liaisons O-H des silanols sont également présentes, que ceux-ci soient impliqués dans des liaisons hydrogènes ($3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$) ou non (3750 cm^{-1}). Enfin, le spectre permet de remarquer qu’il reste du tensioactif malgré son extraction grâce aux bandes à 1650 et 2950 cm^{-1} .

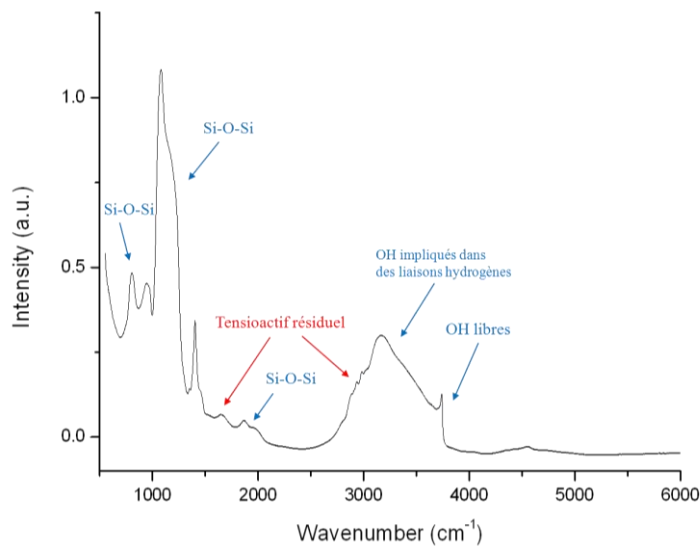


Figure 2.10: Spectre infrarouge d’une SBA-15

La physisorption d'acylase a été réalisée par simple contact entre l'enzyme et la SBA-15 dans une solution de tampon TRIS-HCl 25 mM, NaCl 50 mM (pH = 8) et agité pendant 3h à 250 rpm (Figure 2.11). Puis le mélange a été filtré, rincé avec le tampon TRIS-HCl 25 mM, NaCl 50 mM (pH = 8), et laissé sécher une nuit à l'air libre.

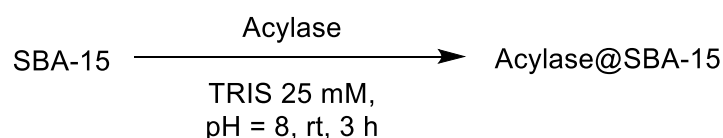


Figure 2.11: Physisorption d'acylase sur SBA-15

2.2.2. Fonctionnalisation du SBA-15

Une fois la silice SBA-15 synthétisée et analysée, celle-ci a été fonctionnalisée par plusieurs groupements organiques afin de pouvoir créer des liaisons covalentes avec les enzymes. Dans un premier temps, les silices ont été fonctionnalisées par un groupement glutaraldéhyde, très utilisé pour l'immobilisation d'enzymes, qui permettra la formation d'une liaison imine avec une amine d'un groupement lysine par exemple. Le greffage d'une fonction organique est réalisé par réaction des silanols de surface de la silice sur les groupements trialkoxysilane d'organosilanes. Ici une fonction amine a tout d'abord été greffée par chauffage au reflux dans le toluène de SBA-15 en présence d'aminopropyltriéthoxysilane (Figure 2.12). La silice SBA-15-glu est ensuite obtenue par réaction avec du glutaraldéhyde dans une solution de TRIS (trishydroxyméthylaminométhane).

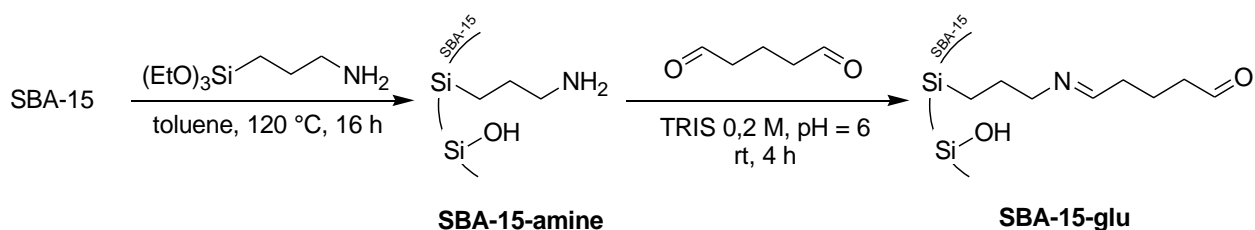


Figure 2.12: Fonctionnalisation de SBA-15 par un groupement glutaraldéhyde

En faisant varier la proportion d'organosilane par rapport à la SBA-15, il est possible d'obtenir plusieurs taux de fonctionnalisation de groupements organiques dans la silice. Celui-ci est déterminé selon la formule :

$$\tau = \frac{\text{nombre de moles d'organosilane}}{\text{nombre de moles d'organosilane} + \text{nombre de moles de silice}} \times 100$$

Ainsi, si le nombre de moles d'organosilane est égal au nombre de moles de silice, le taux de fonctionnalisation théorique sera égal à 50%. Les différents taux permettront de chimisorber plus ou moins d'enzymes et de comparer l'efficacité des différents biocatalyseurs ainsi synthétisés. Dans notre cas, les synthèses ont été effectuées pour des taux théoriques de 50, 10 et 5%. La silice SBA-15-amine fonctionnalisée à un taux de 50% sera notée SBA-15-amine^{50%}. L'immobilisation est réalisée par contact entre l'enzyme et la SBA-15 dans une solution de tampon TRIS-HCl 25 mM, NaCl 50 mM (pH = 8) et agité pendant 3h rotavapor à 100 mbars et 24 h sur le plateau rotatif. Puis le mélange a été filtré, rincé avec le tampon TRIS-HCl 25 mM, NaCl 50 mM (pH = 8), et laissé sécher une nuit à l'air libre.

2.3. Mise en œuvre des réactions enzymatiques

2.3.1. Types de réacteurs

Plusieurs types de réacteurs ont été utilisés pour la mise en œuvre des réactions d'hydrolyse et d'acylation. Les réacteurs utilisés sont présentés en Figure 2.13.

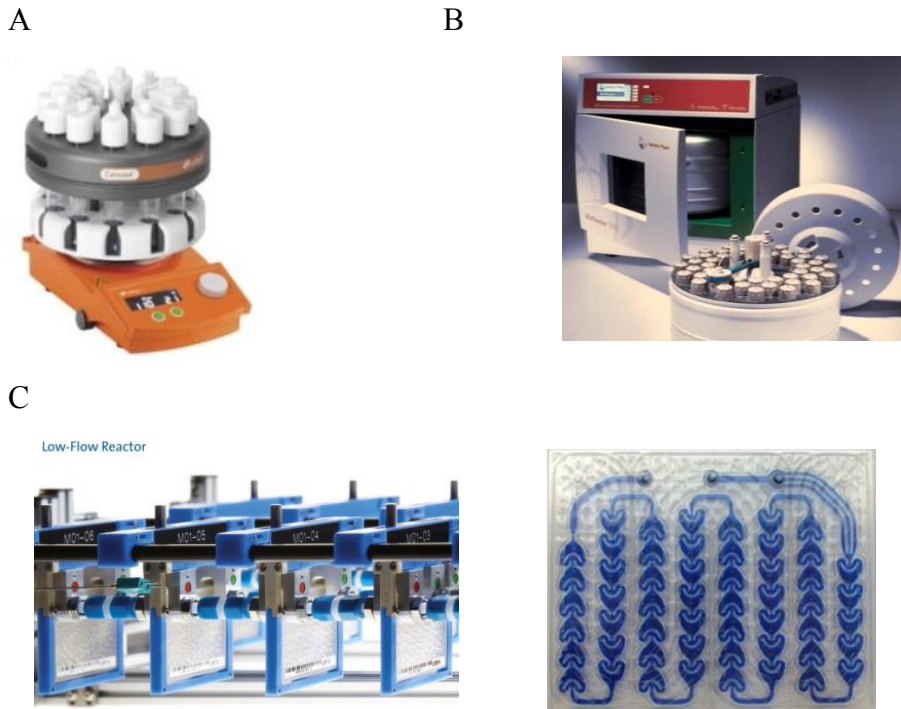


Figure 2.13: Réacteurs enzymatiques utilisés au cours de ce travail. (A) réacteur Carousel 12 Plus Reaction Station™ (B) réacteur Multiwave 3000 SOLV Anton Paar (C) réacteur Corning®Advanced-Flow™ Reactors LF.

2.3.1.1. Réacteur agité mécaniquement, chauffage conventionnel

Le Carousel 12 Plus Reaction Station™ a été utilisé pour réaliser les réactions d'acylation de la lysine avec Novozym435®. Equipé de barreau aimanté et thermo régulé, ce réacteur permet de réaliser 12 réactions en parallèle (Figure 2.13.A). Les réactions d'acylations catalysées par les aminoacylases de *S. ambofaciens* ont quant à elles étaient réalisées dans des tubes à vis équipés de barreaux aimantés et chauffés par une plaque chauffante thermo régulée (IKA). Les réactions réalisées dans ces deux réacteurs ont des volumes réactionnels de 2ml.

2.3.1.2. Réacteur agité mécaniquement, chauffage micro-onde

Afin de réaliser une étude sur l'impact du mode de chauffage, un réacteur réalisant un chauffage par irradiation micro-onde a été utilisé, le Multiwave 3000 SOLV Anton Paar (Figure 2.13.B). Afin de garantir la mesure de température, un tube témoin, sans enzyme, dans lequel est placée une sonde, est utilisé. L'évolution de la température et de la pression au cours de la réaction a été contrôlée pour vérifier le bon déroulement de l'expérimentation. L'influence du mode de chauffage a été étudiée pour les réactions d'acylation catalysées par CALB et les aminoacylases de *S. ambofaciens*. Les expériences en réacteurs micro-ondes ont été réalisées à 45, 55 et 70°C (environ 30 W). Le volume réactionnel des réactions sous micro-onde est de 8 ml et l'agitation est assurée par l'intermédiaire d'un barreau aimanté.

2.3.1.3. Réacteur micro-fluidique, chauffage conventionnel

Le réacteur Corning®Advanced-Flow™ Reactors LF est constitué de blocs modulables contenant les plaques réactionnelles en verre entourées par une double enveloppe permettant la régulation thermique (Figure 2.13.C). La géométrie interne en forme de cœur de ce réacteur a été conçue pour permettre un bon mélange (Elgue et al., 2013), des distributions de temps de séjour contrôlées, des coefficients d'échange thermiques élevés ainsi que des coefficients de transfert de matière important (Saïen et al., 2006 ; Lavric and Woehl, 2009). Le montage expérimental utilisé est représenté sur la Figure 2.14.

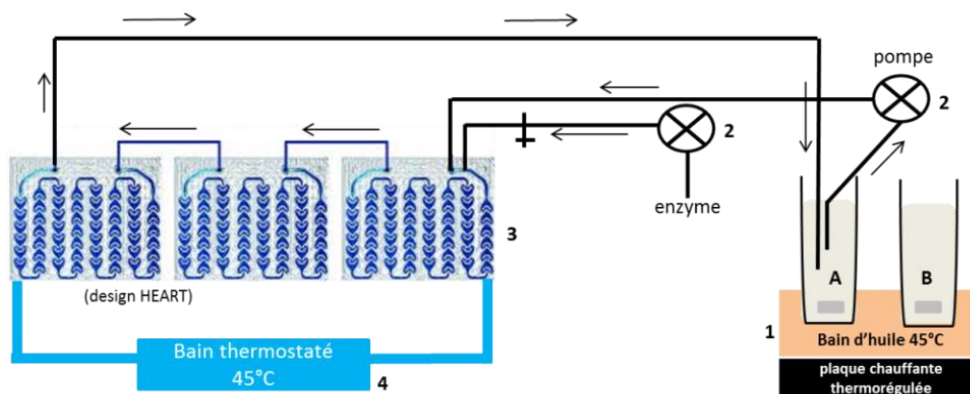


Figure 2.14: Schéma du montage utilisé pour réaliser les réactions de synthèse en réacteur micro-fluidique : 1 : bain d'huile chauffé par l'intermédiaire d'une plaque chauffante ; 2 : pompes ; 3 : plaques micro-fluidiques ; 4 : bain marie. A : tube à vis agité et thermostaté contenant le milieu réactionnel sans enzyme et B : tube à vis pour les réactions agitées mécaniquement.

Celui-ci est constitué d'une succession de plaques thermostatées par un bain marie à 45°C et de 2 pompes LC-20-AT Shimadzu. Un bain d'huile à 45°C permet de maintenir à la température voulue le mélange réactionnel et un second tube dans lequel sont réalisées des réactions en batch, avec une agitation par un barreau aimanté. Ce second tube sert à réaliser, en parallèle, et à titre de comparaison, la même réaction enzymatique que celle réalisée dans le réacteur micro-fluidique. Le volume interne de ce montage est de 12 ml.

2.3.2. Réactifs

Une liste des produits chimiques utilisés dans cette étude est indiquée dans le Tableau ci-dessous :

Tableau 2.4: Différents produits utilisés pour réaliser les réactions enzymatiques :

	produits	Pureté (%)	Fournisseur
Biocatalyseur	Novozym 435 (CALB)	-	Sigma-Aldrich
Molécules acylées	L-Lysine	99	Sigma-Aldrich
	Lys-Ser	99	Bachem
	Leu-Gln-Lys-Trp	95	Genosphere
	Glycine	99	Sigma-Aldrich
	Gly-Gly	99	Sigma-Aldrich
	Methyl-Gly	99	Sigma-Aldrich
	Ter-butyl-Gly	99	Acros-organics
Agents acylants	Acide caprylique	98	Fluka
	Acide laurique	99	Sigma-Aldrich
	Acide palmitique	99	Sigma-Aldrich
	Acide oléique	99	Sigma-Aldrich
Substrats d'hydrolyse	N- α -acétyl-Llysine	99	Sigma-Aldrich
	N- ϵ -acétyl-L-lysine	99	Sigma-Aldrich
Solvants réactionnels	2-méthyl-2-butanol	99,4	Sigma-Aldrich
	Triéthylamine	99,5	Sigma-Aldrich
	Trizma Base	99	Sigma-Aldrich
	NaCl	99	Bachem

2.3.3. Hydrolyse enzymatique

Les hydrolyses de N- α -acétyl-L-lysine et de N- ϵ -acétyl-L-lysine sont réalisées avec les extraits protéiques de *S. ambofaciens* afin de détecter la présence des aminoacylases. Le produit de ces réactions d'hydrolyse est la lysine. La réaction hydrolytique est effectuée dans un bain d'huile thermostaté à 37°C. Dans des tubes à vis contenant le tampon Tris-HCl (25mM) NaCl (50mM) à pH 8, 0,5 g.L⁻¹ d'extraits protéiques et 4 mM de substrat sont ajoutés. La présence de lysine est vérifiée par chromatographie sur couche mince et chromatographie liquide à haute performance.

2.3.4. Synthèse enzymatique

2.3.4.1. En milieu aqueux en réacteur agité et micro-fluidique

La réaction de synthèse d'oléoyl- ou de lauroyl-lysine a été réalisée. Dans un volume réactionnel de 2 mL de Tris HCl 25 mM, NaCl 50 mM ajusté à pH8, sont ajoutés la lysine (0,12 M) et l'acide laurique ou oléique (0,24 M) ainsi les aminoacylases issus de la culture de *S. ambofaciens*, libres ou immobilisées (0,5 g.L⁻¹). Le mélange subit une étape de sonication de 2,5 min à 40 % de la puissance maximum de l'appareil ULTRASONIC PROCESSOR (Bioblock Scientific, Thermofisher) afin d'émulsifier l'acide gras dans le tampon aqueux. Les réactions sont réalisées à 45°C avec des agitations variables de 50, 250 et 500 rpm. Pour des réactions préliminaires en réacteur micro-fluidique, la réaction d'acylation de la lysine par l'acide oléique a été étudiée. L'acide oléique a été choisi pour sa température de fusion faible lui permettant d'être fluide à température ambiante afin d'éviter d'éventuel problème de bouchage. Les concentrations en substrat et en extrait protéique sont les mêmes que précédemment mais pour un volume réactionnel de 15 ml total. Les échantillons ont été récupérés et dilués 10 fois avec du méthanol (100 %). Chaque réaction est répétée deux ou trois fois.

2.3.4.2. En solvant organique en réacteur agité

L'accepteur d'acyle (0,12 M) et le donneur (0,24 M) sont ajoutés dans un volume réactionnel dans 2 mL de 2-méthyl-2-butanol (M₂B₂) préalablement déshydraté sur tamis moléculaires 4Å. De la triéthylamine a été ajoutée au milieu réactionnel en excès (2,4 mol L⁻¹) pour

privilégier la forme neutre de groupes amino (Reyes-Duarte et al., 2002). Puis le mélange subit une étape de sonication de 2,5 min à 40 % de la puissance maximum de l'appareil ULTRASONIC PROCESSOR (Bioblock Scientific, Thermofisher) et est laissé une nuit sous agitation (250 rpm) et à la température de réaction afin de solubiliser au mieux le substrat accepteur d'acyle. La réaction d'acylation est démarrée par l'ajout de 10 g L⁻¹ de Novozym 435® (CALB). Les réactions sont réalisées à 55°C et 250 rpm. Les échantillons prélevés en cours ou en fin de réaction ont été dilués 10 fois avec de l'eau/méthanol (80/20, v/v). CALB a été éliminé par filtration. Tous les échantillons sont ensuite stockés à température ambiante. Chaque réaction est répétée deux ou trois fois.

2.4. Méthodes analytiques

2.4.1. Réactifs et solvants

Une liste des produits chimiques utilisés dans cette étude est indiquée dans le Tableau ci-dessous :

Tableau 2.5: Différents produits utilisés pour réaliser les réactions enzymatiques :

	Produits	Fournisseurs
Dosage acides aminés	Sodium Borate	Sigma B
	β-mercaptopropionic acid	Fluka
	Ortho-phthalaldehyde	Sigma P
	4-Chloro-7-nitrobenzofurazan	Fluka
	Sodium phosphate mono basic dehydrate	Fluka
	Disodium hydrogenphosphate	Fluka
	Acetonitrile	Carlo-Erba
Dosage acide gras et produits acylés	Methanol	Carlo-Erba
	acide trifluoroacétique	Sigma-aldrich
	n-undecylenoyl-l-Phénylalanine	SEPPIC
	Standard lysine acylés	Gencust
Chromatographie sur couche mince	Butanol	Sigma-aldrich
	Acide acétique	Carlo-Erba
	ninhydrine	Sigma-aldrich

2.4.2. Chromatographie sur couche mince

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

2.4.3. Dosage acide aminé

Le dosage de la lysine produite lors des hydrolyses est réalisé par chromatographie liquide à haute performance. La Figure 2.15 ci-dessous représente un schéma des équipements qui constitue la chaîne LC-20, de la marque SHIMAZU utilisée.

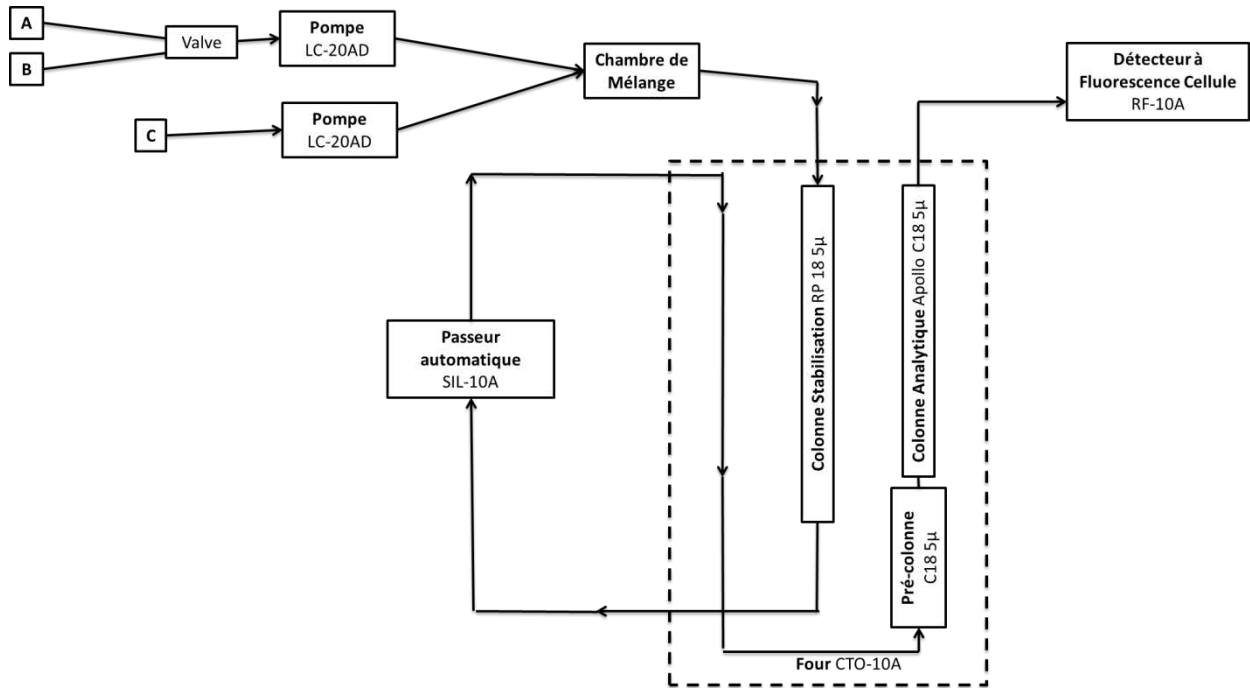


Figure 2.15: Schéma de la chaîne HPLC pour le dosage des acides aminés

La méthode utilisée pour réaliser la séparation et la quantification de la lysine a été développée par Shimadzu®. Afin de détecter les acides aminés une étape de dérivation des acides aminés par l'ortho-phthalaldéhyde (OPA) est réalisée, ce qui permet d'observer une fluorescence à 460 nm après excitation à une longueur d'onde de 350 nm (Figure 2.16). Suite à cette étape de dérivation, 2 µL de l'échantillon sont injectés dans le système de colonnes et la séparation est réalisée dans la colonne de chromatographie C18 (150x4,6 ; 5 µm Alltech, États-Unis) à un débit de 1 mL.mn⁻¹. La composition des réactifs de dérivation est donnée dans le Tableau 2.6. Les colonnes sont thermo-stabilisées à 45°C. Puis un gradient d'acétonitrile est appliqué afin de désorber les molécules (Tableau 2.7.B). La composition des phases mobiles est décrite dans le Tableau 2.7.A.

Tableau 2.6: Composition des réactifs de dérivation

Réactif	Composition
Tampon Sodium Borate	1,55 g acide borique dans 250 mL d'eau milliQ (ajuster le pH à 9 avec NaOH 30% (30g NaOH dans 100 mL))
A	100 µL de β-mercaptopropionique dans 100 ml tampon borate
B	200 mg OPA dans 30 mL acétonitrile et 100 mL tampon borate
C	1g NBD-Cl dans 100 mL acétonitrile

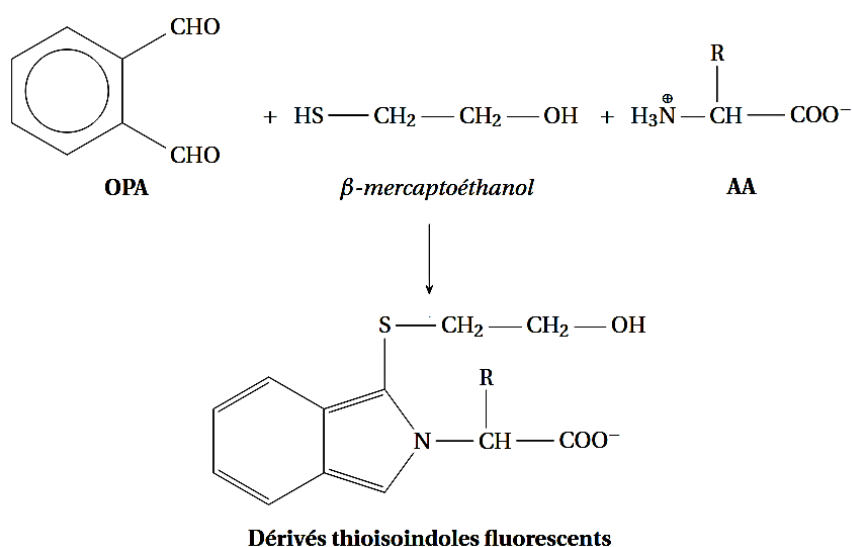


Figure 2.16: Réaction de dérivation des acides aminés par l'OPA

Tableau 2.7: (A) Composition des phases mobiles pour le dosage des acides aminés ; (B) gradients de phases mobiles pour le dosage des acides aminés

A	
Phase mobile	Composition
A	NaH ₂ PO ₄ 0,78 g.L ⁻¹ , Na ₂ HPO ₄ 1,79 g.L ⁻¹
B	Phase A 600 mL, Acétonitrile 300mL
C	Acétonitrile 80% (v/v), eau distillée (20 v/v)

B	
Temps	% de phases mobiles
0 à 1 min	phase A : 95% et phase B : 5%
1 à 10 min	phase A : 5% et phase B : 95%
10 à 15 min	phase B : 100%
15 à 16 min	phase A : 100%
16 à 21 min	phase C : 100%
21 à 34 min	phase A : 95% et phase B : 5%

2.4.4. Dosage et étude structurale des acide gras et produits acylés

Afin de réaliser le dosage des substrats et produits de réactions ainsi que de réaliser une étude structural des produits formé un couplage chromatographie liquide/spectrométrie de masse a été utilisé (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA). La séparation est réalisée après injection de 10 μ L par une colonne C18 amide (Grace/Alltech, Darmstadt, Germany) ainsi que d'une pré-colonne C18 amide (150x2,1. 5 μ m) (Grace/Alltech, Darmstadt, Germany). Les colonnes sont thermo-statées à 25°C. Puis un gradient de méthanol est appliqué afin de désorber les molécules (Tableau 2.8.B). La composition des phases mobiles est indiquée dans le Tableau 2.8.A.

La détection des molécules se fait par l'intermédiaire d'un détecteur à barrette de diode (PDA) ainsi que d'un analyseur de masses correspondant à une trappe ionique LQT (Linear Trap Quadripole) avec une source d'ionisation positif de type ESI⁺ (ElectroSpray Ionisation).

Tableau 2.8: (A) Composition des phases mobiles pour la séparation et le dosage des substrats et produits d'acylation ; (B) gradients de phases mobiles pour la séparation et le dosage des substrats et produits d'acylation

A	
Phase mobile	Composition
A	méthanol/eau/acide trifluoroacétique (80:20:0.1, v/v/v) à l'exception des réactions avec l'acide caprylique méthanol/eau/acide trifluoroacétique (50:50:0.1, v/v/v)
B	méthanol/acide trifluoroacétique (100:0.1, v/v)

B	
Temps	% de phases mobiles
0 à 5 min	phase B : de 0 à 100%
5 à 23 min	phase B : 100%
23 à 25 min	Phase B : de 100 à 0 %

Afin de déterminer la structure des produits formés au cours des réactions d'acylation la fragmentation par spectrométrie de masse a été utilisée. Les éléments constitutifs d'un spectromètre de masse permettant la fragmentation sont indiqués sur la Figure 2.17. Après séparation des molécules par CLHP, celles-ci vont être ionisées par un premier analyseur (SM) en fonction de l'ion d'intérêt. L'ion parent obtenu va subir une fragmentation au niveau de la chambre de collision puis passer au travers d'un deuxième analyseur (SM²) qui va fournir les valeurs m/z des ions fils ainsi obtenus. Les spectres obtenus sont ensuite retraités par le logiciel Xcalibur® soft (THERMO) et permettre l'identification structurale des molécules étudiées. Les conditions utilisées lors de la spectrométrie de masse sont indiquées dans le Tableau 2.9.

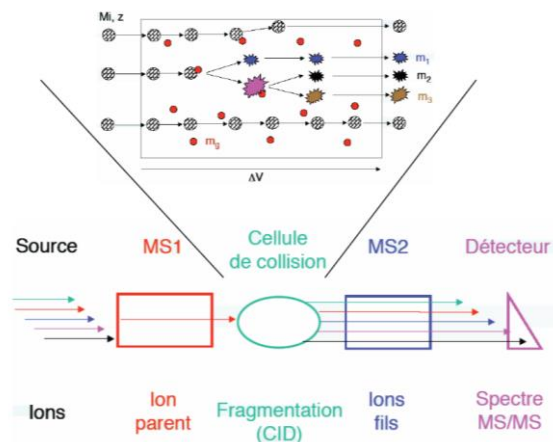


Figure 2.17: Schéma des constituants d'un spectromètre de masse et détails sur la chambre de collision (Husson, 2008)

Tableau 2.9: Paramètres de l'analyse par spectrométrie de masse

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

2.4.5. Dosages des protéines

2.4.5.1. Bradford

La concentration protéique des échantillons est déterminée selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique au bleu de Coomassie G-250, après sa liaison aux résidus arginine et aux résidus hydrophobes des protéines. Le réactif de Bradford est préparé à partir de 10 mg de bleu de Coomassie G-250 solubilisé dans 5 mL d'éthanol 95% et additionné de 10 mL d'acide phosphorique (pour un volume final de 100 mL par ajout d'H₂O). Un volume de 20 µL de solution protéique à doser est ajouté dans 980 µL de réactif de Bradford et laissé 15 min dans l'obscurité, puis l'absorbance est mesurée à 595 nm. La concentration en protéines est alors déterminée en se référant à une courbe de calibration réalisée à partir d'une solution étalon (de 0,5 à 2 g/L) d'albumine de sérum bovin (BSA).

2.4.5.2. BCA

Une seconde méthode de dosage protéique a été utilisée, la méthode BCA (BiCinchoninic acid Assay). Ce dosage colorimétrique est basé sur l'utilisation d'acide bicinchoninique qui est un réactif colorigène qui forme un complexe de couleur pourpre avec le Cu(I) produit issu de la réduction de Cu(II) par les protéines. Ce complexe pourpre absorbe entre 540 et 590 nm et plus généralement à 562 nm. Deux réactifs sont utilisés pour réaliser ce dosage : les réactif A et B dont les compositions sont présentés dans le Tableau 2.10. Le mélange des réactifs se fait

avec un ratio de 50 de réactif A pour 1 de réactif B ce qui engendre un mélange de couleur verte de faible stabilité. À un volume de 100 µL de solution protéique à doser, sont ajoutés 2ml du mélange de réactif. Puis le mélange échantillon réactif est incubé soit 120 min à 25°C soit 30 min à 37°C, avant la mesure de l'absorbance à 562 nm. Les concentrations protéiques sont ensuite déterminées par comparaison avec une gamme d'étalonnage réalisé sur la BSA.

Tableau 2.10: Composition des réactifs A et B pour le dosage BCA

	Composition
Réactif A	Dans NaOH 0,1 N : – acide bicinchoninique – carbonate de sodium – tartrate de sodium – bicarbonate de sodium
Réactif B	Solution de sulfate penta-hydrate de cuivre (II).

2.4.6. Détermination d'activité enzymatique

L'activité spécifique d'une enzyme pour une réaction définie la vitesse à laquelle celle-ci va produire de la lysine dans le cas de l'hydrolyse d' α - ou ϵ -acétyl-lysine ou dans le cas de la réaction d'acylation le produit formé ou le substrat consommé. L'activité spécifique a été calculée selon la formule ci-dessous :

$$\text{Activité spécifique} = \frac{\text{Taux de conversion (mmol/h)}}{\text{concentration protéique (g)}}$$

2.4.7. Détermination d'un facteur d'efficacité relative

Lors des analyses par CLHP-MS-MS pour les échantillons des réactions menées en réacteur micro-onde, des difficultés ont été rencontrées lors de la détection UV. Pour cette raison un étalon interne (le n-undécylénoyl-L-Phénylalanine) inerte vis-à-vis des substrats et produit de réaction et de temps de rétention différent, a été ajouté afin de pouvoir corriger l'abondance relative du produit de la réaction et ainsi comparer les résultats entre eux. Les résultats des réactions réalisées en réacteur micro-onde sont exprimés au travers d'un facteur d'efficacité relative, θ (Téta) défini par la formule ci-dessous :

$$\theta = \frac{Abondance\ relative_{[X]}}{Abondance\ relative_{[Xref]}} \times 100$$

ou $[X]$ et $[X]_{ref}$ sont les aires sous les pics du produit monoacylé issu des spectres MS.

$[X]_{ref}$ de référence est l'aire sous le pic correspondant à 24h de réaction en chauffage conventionnel. Ce choix est lié aux résultats précédents qui ont indiqué un équilibre thermodynamique atteint à 24h de réaction. Cette constante de spécificité est donc de 1 pour la référence et est comprise entre 0 et 1 pour les autres échantillons.

En réacteur conventionnel, des réactions de 1h et 24h ont été réalisées. Les réactions en chauffage conventionnel pendant 24h constituent le maximum car il a été observé, que dans les conditions réactionnelles utilisées, l'équilibre thermodynamique était atteint à 24h. Le facteur θ pour cette réaction référence est égale à 1 et constitue donc le 100 % avec lequel sont comparés les autres échantillons.

Chapitre 3 : Étude de l'acylation enzymatique de la lysine à l'échelle moléculaire

1. Introduction

L'acylation enzymatique est une stratégie permettant d'envisager l'obtention de dérivés d'acides aminés/peptides à propriétés bioactives et/ou techno-fonctionnelles. L'un des intérêts majeurs de la voie enzymatique est de proposer des synthèses innovantes dans des conditions expérimentales douces et avec une régio-sélectivité importante qu'il est difficile d'atteindre en synthèse chimique (Jiang et al., 2002; Schmid et al., 2001). En effet, la maîtrise de la sélectivité de la réaction est d'une importance capitale, car les modifications structurales subies par les biomolécules vont modifier ses propriétés (effet bénéfique ou délétère) et/ou lui conférer de nouvelles propriétés recherchées.

De nombreuses études rapportent l'utilisation d'enzymes pour la synthèse de dérivés acylés de diverses biomolécules (Melika Ardhaoui et al., 2004; Furutani et al., 1996; Gremos et al., 2011; Husson et al., 2009, 2010; Kim et al., 2003). Actuellement, le biocatalyseur le plus utilisé dans l'industrie est la lipase B de *Candida antarctica* (CALB). Cette enzyme est très étudiée pour la synthèse de composés multifonctionnels dans les solvants organiques tels que des dérivés de vitamine, des sucres, des acides aminés ou des phénols (Ganske and Bornscheuer, 2005; Klivanov, 2001; Wescott and Klivanov, 1994; Zaks and Klivanov, 1985). Ces études portent généralement sur l'impact de divers paramètres sur l'efficacité de la réaction tels que : la nature de l'enzyme, la structure du substrat, la nature du milieu réactionnel... La problématique de la sélectivité de ces réactions est quant à elle peu étudiée. Il s'agit pourtant d'une question scientifique cruciale dans le cas de l'acylation d'acides aminés et de peptides dont la structure contient souvent plusieurs groupements fonctionnels de même nature.

Des études se sont focalisées sur la compréhension de la sélectivité de CALB lors de l'acylation de composés polyfonctionnels. De Oliveira (2009) a proposé une méthodologie permettant de discriminer des complexes enzyme-substrats « productifs », c'est-à-dire capables de conduire à des produits acylés, et des complexes « non productifs ». Cette méthodologie consiste à mesurer des distances importantes entre les groupements potentiellement acylables du substrat et les résidus catalytiques Ser105 et His224 ou encore

entre l'acyle devant être transféré et les résidus du trou oxyanionique Thr40 et Gln106. Dans une autre étude, Ferrari (2014) applique cette méthode avec succès pour prédire la régiosélectivité et la chimiosélectivité de CALB lors de la N-acylation de différents peptides. Par ailleurs, des simulations reposant sur la même approche méthodologique ont permis d'expliquer l'absence d'acylation de la quercétine en présence de CALB par la présence d'interactions hydrophobes entre le flavonoïde et les résidus Ile189 et Ile285 ainsi que des interactions électrostatiques avec les résidus Asp134 et Gln157 (Bidouil et al., 2011). L'ensemble de ces travaux souligne l'importance non seulement de la conformation des complexes enzyme/substrats, mais également des interactions au sein de ces complexes.

Ce chapitre est consacré à l'étude, au niveau moléculaire, de l'acylation de la lysine catalysée par CALB en présence d'acides gras comme donneurs d'acyles. Le but est d'améliorer la compréhension des causes de la sélectivité de cette réaction. Le postulat de départ étant que la sélectivité réactionnelle est liée aux modes d'interaction entre l'enzyme et ses substrats, différentes simulations ont été réalisées à l'aide d'outils de modélisation moléculaire dans le but de proposer des modèles de complexes enzyme/substrats. La lysine constitue ici un substrat de choix pour l'étude de la régio-sélectivité de la réaction d'acylation catalysée par CALB car elle possède deux groupements NH_2 : l'un en position N-terminal sur le carbone α , l'autre situé à l'extrémité de la chaîne latérale sur le carbone ϵ (Figure 3.1). L'état de protonation des fonctions amines de la lysine pouvant impacter la réactivité de ces groupements, une base forte la triéthylamine est ajoutée expérimentalement.

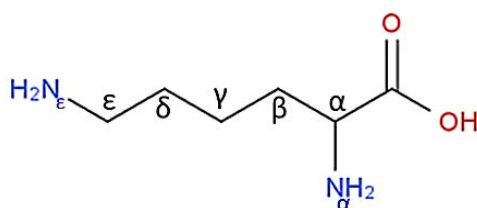


Figure 3.1: Structure de la lysine

2. Choix du protocole de docking

Le docking est une méthode permettant de prédire les modes d'interactions les plus probables d'un ligand au sein du site actif d'une enzyme, en générant un échantillonnage

conformationnel de complexes enzyme/ligand représentatifs de la réalité. Dans le cadre de cette étude, la cible pour le ligand est un acyl-enzyme résultant de la liaison covalente du substrat donneur d'acyle sur la sérine catalytique et le ligand est une lysine. La construction de cet acyl-enzyme a été réalisée selon la méthode proposée dans les travaux de Ferrari (2014), en s'inspirant du positionnement d'un inhibiteur co-cristallisé avec l'enzyme, afin de positionner correctement la chaîne grasse. Puis la géométrie du système a été optimisée par des simulations de dynamique moléculaire afin de proposer un modèle robuste d'acyl-enzyme.

Plusieurs protocoles sont disponibles afin de réaliser les simulations de docking. Dans un premier temps le module LigandFit, utilisé dans plusieurs études antérieures portant sur la réaction d'acylation de biomolécules catalysée par CALB (Bidouil et al., 2011; De Oliveira et al., 2009; Ferrari et al., 2014), a été testé. Ce protocole de docking considère l'acyl-enzyme cible comme un élément rigide, tandis que le ligand est considéré comme un élément flexible. Il se déroule en plusieurs étapes : recherche conformationnelle appliquée au ligand, docking du ligand dans la cible, minimisation du complexe enzyme/ligand et scoring qui permet le classement des différents complexes obtenus. L'étape finale de minimisation peut être insérée ou non dans le protocole ; celle-ci permet l'ajustement de la conformation de l'enzyme en présence du ligand.

Des simulations ont été réalisées avec ou sans minimisation du complexe enzyme/ligand afin d'observer l'impact de cette étape sur les résultats de docking. Les résultats obtenus ont indiqué que lorsqu'une minimisation post-docking est réalisée, la lysine est majoritairement orientée avec son groupement α -NH₂ vers le fond de la cavité. En revanche, sans cette étape de minimisation post-docking c'est le groupement ϵ -NH₂ de la lysine qui s'approche des résidus catalytiques. L'étape de minimisation post-docking semble donc avoir un fort impact sur l'orientation du ligand et le classement des poses issues du docking et suggère un ajustement conformationnel de la cavité de l'acyl-enzyme en présence de la lysine.

Afin de mieux comprendre les raisons de ce phénomène, les conformations de la cavité catalytique de l'acyl-enzyme avec ou sans étape de minimisation post-docking ont été comparées. Le schéma sur la Figure 3.2 représente les différents angles d'observation des complexes. Sur la Figure 3.3 la sphère rouge représente la zone dans laquelle le logiciel recherche la cavité catalytique, matérialisée par un ensemble de points blancs ou verts.

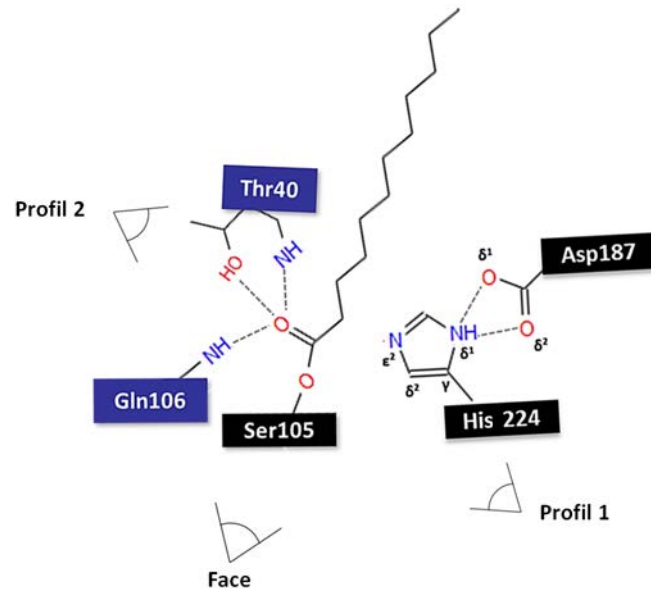


Figure 3.2: Schéma des résidus catalytiques et du trou oxianionique

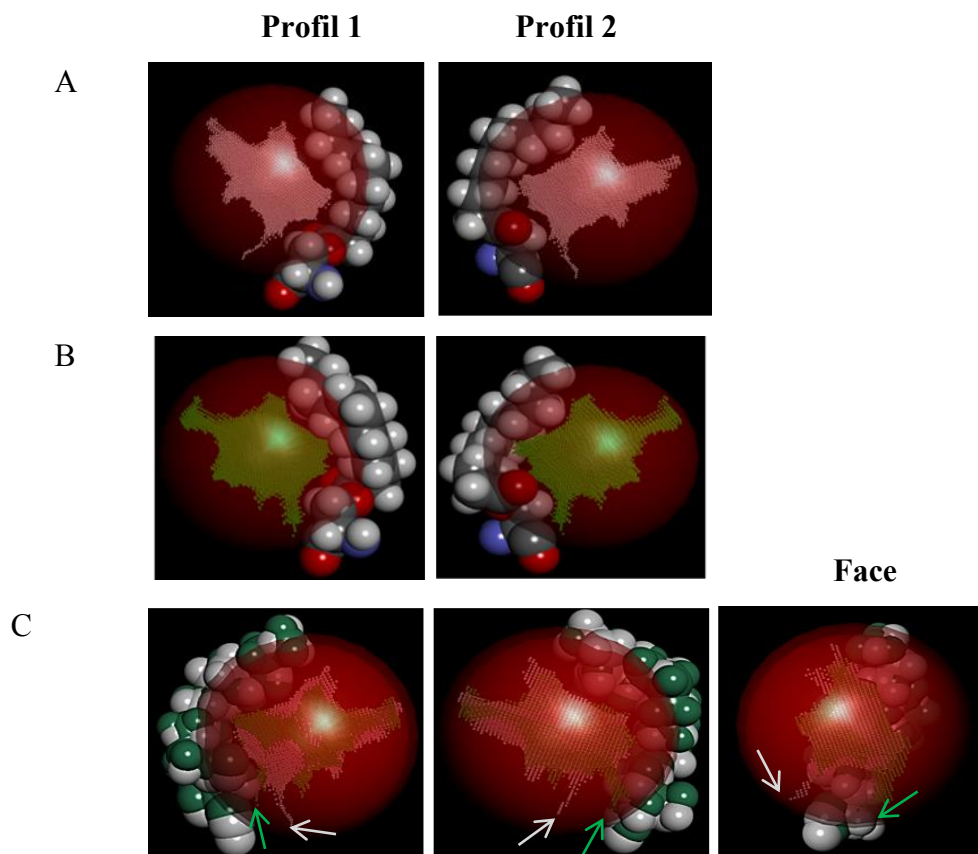


Figure 3.3: Représentation de la chaîne lauroyle reliée à la sérine catalytique et de la région sur laquelle la recherche de cavité est effectuée (sphère rouge). A: vue latérale du site actif avant minimisation (blanc) ; B: vue latérale du site actif après minimisation (vert) ; C: superposition des deux cavités

Sur cette figure, il est possible d'observer que les deux cavités sont de tailles similaires, mais présentent des géométries légèrement différentes. En effet, le fond de la cavité est plus étroit en l'absence de minimisation post-docking (Figure 3.3.A) que lorsque la conformation des complexes a été minimisée (Figure 3.3.B). Ceci pourrait expliquer les résultats de docking obtenus, une cavité plus étroite étant plus accessible à la chaîne latérale de la lysine qu'à sa chaîne principale. La Figure 3.3.C représente la superposition des deux cavités : la couleur verte représente la cavité après minimisation et en blanc sans minimisation. Sur cette figure il apparaît que les deux cavités ne se superposent plus en profondeur du site. En effet, si l'on observe l'acyl-Ser105 de face, sans minimisation, la cavité est orientée vers la gauche, c'est-à-dire le trou oxyanionique. En revanche, après minimisation, la cavité est orientée vers la droite où se situe l'His224. Cette étude préliminaire indique une adaptation conformationnelle de l'acyl-enzyme en présence de la lysine (phénomène d'induced fit effect) et suggère la nécessité de prendre en compte la flexibilité de la protéine et plus particulièrement des résidus de son site actif dans les simulations de docking. De plus, il semblerait que dans le cas d'un ligand de petite taille comme la lysine, de petites modifications du site actif comme celles apportées par l'étape de minimisation ont un impact important sur les résultats de docking.

Un protocole de docking flexible a donc été utilisé pour les études suivantes (Koska et al., 2008). La flexibilité a été appliquée aux chaînes latérales de résidus sélectionnés, bordant la cavité catalytique.

3. Acylation de la lysine catalysée par CALB : Étude expérimentale et théorique de la régiosélectivité

L'objectif de cette étude est de définir les raisons de la régiosélectivité à l'échelle moléculaire et de répondre aux questions scientifiques suivantes :

- La géométrie des complexes enzyme/substrats et notamment le respect des distances catalytiques sont-ils des critères suffisants pour discriminer des complexes productifs et non productifs ?
- Est-il possible de prédire la régio-sélectivité de la réaction et si oui quelle est la méthodologie la plus appropriée ?
- Quels sont les règles qui régissent cette régiosélectivité ? Existe-t-il des résidus clés et des interactions spécifiques pouvant expliquer cette sélectivité ?

Dans l'étude suivante, une méthodologie associant des simulations de docking et des calculs d'interaction a été développée pour comprendre et prédire la régiosélectivité de CALB lors de l'acylation de la lysine par différents acides gras. Dans le souci de proposer un outil prédictif pertinent, des méthodes de simulations peu coûteuses en temps de calcul ont été privilégiées.

Les résultats de cette étude sont présentés sous la forme d'une publication soumise dans le journal *Process Biochemistry*, suivi de résultats complémentaires.

Molecular rules for selectivity in lipase-catalyzed acylation of lysine.

Dettori L.¹ Jelsh C.² Guiavarc'h Y.¹ Delaunay S.¹ Framboisier X.¹ Chevalot I.¹ and Humeau C.¹

¹ Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, CNRS UMR-7274, Université de Lorraine, 2 av. de la Forêt d'Haye, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

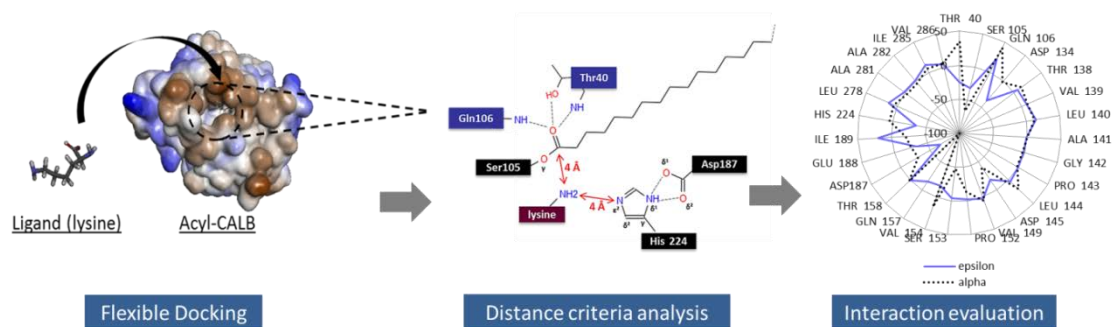
² Laboratoire de Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations, Institut Jean Barriol, CNRS-UMR 7036, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

[mailto:Corresponding author:](mailto:Corresponding author)

E-mail: catherine.humeau@univ-lorraine.fr

Postal address : Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, CNRS UMR-7274, Université de Lorraine, 2 av. de la Forêt d'Haye, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Graphical abstract



3.1. Abstract

The selectivity of L-lysine acylation by lauric acid catalysed by *Candida antarctica* lipase B (CALB) was investigated combining experimental and theoretical methodologies. Experiments showed the near-exclusive acylation of lysine ϵ -amino group; only traces of product resulting from the acylation of lysine α -amino group were observed fleetingly. Molecular modelling simulations were performed aiming to understand the molecular rules for selectivity. Flexible docking simulations combined with structural investigations into lysine/CALB binding modes also suggested the preferential acylation of the lysine ϵ -amino group without, however, excluding the acylation of the lysine α -amino group. Electrostatic interaction energy between lysine and the residues covering the catalytic cavity was calculated in order to understand the discrimination between the two lysine amino groups. Key interactions with the polar region covering the catalytic triad were identified and a plausible explanation for selectivity was proposed.

Keywords: lysine acylation, docking, selectivity, electrostatic energy, *Candida antarctica* lipase B

3.2. Introduction

Amino acids and peptides include molecules presenting various positive effects (antioxidant, opioids, anti-hypertensive, anti-cancer...) that are receiving increasing interest from pharmaceutical, cosmetic and nutraceutical industries (Chi et al., 2015; Harris et al., 2013; Hernández-Ledesma et al., 2011; Lindqvist et al., 2015). However, their polarity may limit their transfer through cell membranes and their efficiency may be restricted by their short half-life due to potential hydrolysis catalysed by endo-proteases. One possibility to circumvent these problems consists in acylating their structure with a fatty acid chain, leading to derivatives with improved activities and/or new techno-functional properties (Bordes and Holmberg, 2015; Craik et al., 2013). Previous studies showed that acylation of peptides could facilitate their transport through biological membranes by increasing their lipophilic properties. In addition, this could protect them against endogenous proteolytic attack and thus increase their stability (Nestor and others, 2009). Acylated derivatives of amino acids are commonly used as surfactants that are important ingredients in cosmetics, due to their excellent surface-active properties, combined with interesting biological activities and low potential for toxicity (Morán et al., 2004). Acylation process can be performed by either enzymatic or chemical pathways. Major advantages of using enzymes instead of chemical catalysts are a high selectivity leading to the grafting of acyl chains on specific positions and the possibility to apply mild reaction conditions that respect the green chemistry requirements. Hydrolytic enzymes and mainly lipases (EC 3.1.1.3) are most often used to catalyse such reactions in non-aqueous media, and besides already applied to industrial bioprocesses in the food, pharmaceuticals and cosmetics area (Nestl et al., 2011). In addition to broad substrate specificities, lipases do not require any coenzyme. Moreover, some of them are highly stable, especially when immobilized. The lipase B from *Candida Antarctica* (CALB) has already been used in many acylation bioprocesses applied to a wide range of compounds as vitamins, sugars, amino acids or phenols (Ganske and Bornscheuer, 2005; Husson et al., 2011; Soo et al., 2004). Development of such bioprocesses and control of selectivity requires that enzyme/substrates binding modes as well as molecular rules for selectivity are understood in depth. To achieve this, several studies reported the use of molecular modelling simulations, especially based on docking methodologies.

In case the enzyme structure is known, docking appears as an efficient method to predict the preferred orientations of substrates within the target catalytic cavity and then to analyze interactions (Leach et al., 2006; Yuriev and Ramsland, 2013). Poses issued from docking

calculations are ranked using score functions, based on binding affinity approximation (Gohlke and Klebe, 2002). This ranking step represents a decisive stage in docking protocols that may strongly impact the accuracy of the models. Many molecular modelling studies aiming to understand substrate specificity as well as selectivity have already been performed on CALB-catalyzed reactions. An approach combining docking and molecular dynamics simulations was applied to study the regioselectivity of CALB during flavonoid acetylation at the molecular level (Bidouil, 2012; Oliveira, 2009). Similarly, the acylation of lysine-based peptides was studied and the regioselectivity of the reaction was successfully predicted (Ferrari et al., 2014). Regardless of the peptide structure, simulation results suggested the preferential N-acylation of the lysine lateral chain. This was also evidenced in experiments. The lysine structure has two amino groups that are prone to acylation. One is located at the end of the lysine lateral chain (position ϵ), and the other on the carbon α . Lysine acylation catalyzed by the lipase from *Rhizomucor miehei* has already been investigated experimentally (Montet et al., 1990; Soo et al., 2004). Results showed the exclusive acylation of lysine ϵ -amino group but no clear explanation was given for this selectivity. The present work aimed to study CALB-catalyzed acylation of lysine with lauric acid. Experimental evidence was given for selectivity whereas models brought a deep knowledge of lysine/CALB binding modes. Molecular rules for selectivity were determined through electrostatic interaction energy calculations.

3.3. Materials and methods

3.3.1. Enzymatic reactions

3.3.1.1. Chemicals and enzyme

Novozym 435® (lipase B from *C. antarctica* immobilized on an acrylic resin) with propyl laurate synthesis activity of 7000 PLU g⁻¹ and protein grade of 1–10% was from Novo Nordisk A/S (Bagsværd, Denmark). Lysine and lauric acid were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). 2-Methyl-2-butanol (M₂B₂) and triethylamine of HPLC quality were purchased from Carlo Erba (France).

3.3.1.2. Syntheses

L-lysine (0,12 M) and Lauric acid (0,24 M) were solubilized in 2 mL of 2-methyl-2-butanol previously dehydrated on 4 Å molecular sieves, for 12 h at 55°C. Amines have increased pKa values in organic solvents compared to aqueous solutions (Rödm et al., 2007). To ensure that the amine groups of the lysine were not protonated a large excess of triethylamine was added to the reaction medium (2.4 mol L⁻¹). Only scarce acylation reaction did actually occur when no triethylamine was added to the medium (results not shown). The acylation reaction was started by the addition of 10 g.L⁻¹ of the enzymatic preparation Novozym 435®. The reaction medium was stirred at 250 rpm and kept at 55°C. Samples were withdrawn over time, diluted with methanol/water (80/20, v/v), and then, stored at ambient temperature before LC–MS analysis. At the end of the reaction, the enzyme was removed by filtration. Each reaction was repeated at least thrice.

3.3.1.3. Analysis of reaction media

The synthesis of lysine derivatives was followed on a HPLC–MS-MS system (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) consisting in a binary delivery pump connected to a photodiode array detector (PDA) and a LTQ ion trap as mass analyzer (Linear Trap Quadrupole) equipped with an atmospheric pressure ionization interface operating in positive electrospray mode (ESI⁺). Chromatographic separation was performed on a C18 column (150 mm × 2.1 mm, 5 µm porosity – Grace/Alltech, Darmstadt, Germany) equipped with a C18 pre-column (7.5 mm × 2.1 mm, 5 µm porosity – Grace/Alltech Darmstadt, Germany) at 25°C. Mobile phases consisted in methanol/water/TFA (80:20:0.1, v/v/v) for the phase A and methanol/TFA (100:0.1, v/v) for the phase B. Acylated peptides were eluted using a linear gradient from 0% to 100% of B for 5 min and then an isocratic step at 100% of B for 10 min, at a flow rate of 0.2 mL min⁻¹. Mass spectrometric conditions were as follows: spray voltage was set at +4.5kV; source gases were set for sheath gas, auxiliary gas and sweep gas at 30, 10 and 10, respectively (in arbitrary units min⁻¹); capillary temperature was set at 250°C; capillary voltage was set at 48 V; tube lens, split lens and front lens voltages were set at 120 V, -34 V and -4.25 V, respectively. Full scan MS spectra were performed from 100 to 1000 m/z and additional MS² scans were realized in order to get structural information based on daughter ions elucidation. Raw data were processed using Xcalibur software (version 2.1 Thermo Scientific).

3.3.2. Molecular modeling simulations

3.3.2.1. Computational resources

Several modules of the software Discovery Studio 4.1 (Accelrys, Inc.) were used in this study:

- CHARMM: force field for molecular mechanics (Brooks et al., 1983)
- Flexible Docking: module for docking simulations including receptor and ligand flexibility (Koska et al., 2008)
- Calculate binding energies: module for estimation of binding energy between a receptor and a ligand (Tirado-Rives and Jorgensen, 2006)

Simulations were carried out on a computer cluster equipped with 2 Quad Core Intel Xeon processors L5420, 2.5 GHz and 16 GB of RAM on a Linux Platform.

3.3.2.2. Lysine construction

The three-dimensional structure of lysine was built using the Builder module of the program package Discovery Studio 4.1. All atoms were typed by applying the general CHARMM force field. The resulting structure was submitted to a geometric correction aiming to remove atomic disorder.

3.3.2.3. Acyl-enzyme construction

The 1LBS PDB entry was chosen as the reference structure for CALB. The 1LBS crystal structure is composed of six independent protein chains per asymmetric unit. Each of these chains consists of 317 amino acids, one ethyl-hexyl-phosphonate (HEE) inhibitor covalently bound to the catalytic serine (Ser105), one N-acetyl-glucosamine (NAG) dimer covalently bound to the residues Asn74. The main interest of this structure is the presence of the inhibitor that provides experimental evidence for the orientation of the acyl moiety towards the oxyanion hole and more generally, towards the residues constituting the catalytic cavity. The acyl-enzyme model was built according to the procedure previously described by Ferrari *et al.* (2014) with adaptation to lauroyl chain (Ferrari et al., 2014). Asp134 was modelled as protonated as observed in high resolution crystal structure (Stauch et al., 2015).

3.3.2.4. Flexible Docking protocol

A protocol of docking including the flexibility of both the ligand and the lateral chain of residues constituting the binding site was used (Koska et al., 2008). The first step used the ChiFlex algorithm (CHARmm based molecular mechanics) to explore the conformational space of flexible residues and generate a set of low energy conformations of the protein (Spasov et al., 2007). For each of these, hotspots corresponding to polar and non-polar zones were identified. Parallely, the Catconf algorithm was used to search low energy conformations of the ligand (~ 50 conformers.mn⁻¹) (Li et al., 2007; Smellie et al., 1995a, 1995b, 1995c). Then, each ligand conformation was docked rigidly against each conformation of the protein aligning with the hotspots, using the LibDock program (Diller and Merz, 2001). Finally, refinement of side chain positions in the presence of the ligand and then, final refinement of docked poses in the presence of the receptor were performed with ChiRotor and CDOCKER, respectively (Wu et al., 2003). For each final pose, the CHARMM energy and the interaction energy were calculated. The poses were sorted by the CHARMM energy and the top scoring poses were retained.

In the present study, the flexibility was applied to the residues: Thr40, Ser105, Gln106, Asp134, Leu140, Ala141, Leu144, Val149, Val154, Gln157, Asp187, Ile189, Hist224, Leu278, Ala281, Ala282, Ile285 and Val286 (Figure 3.4). The root mean square deviation (RMSD) was computed on these residues, referring to the input structure.

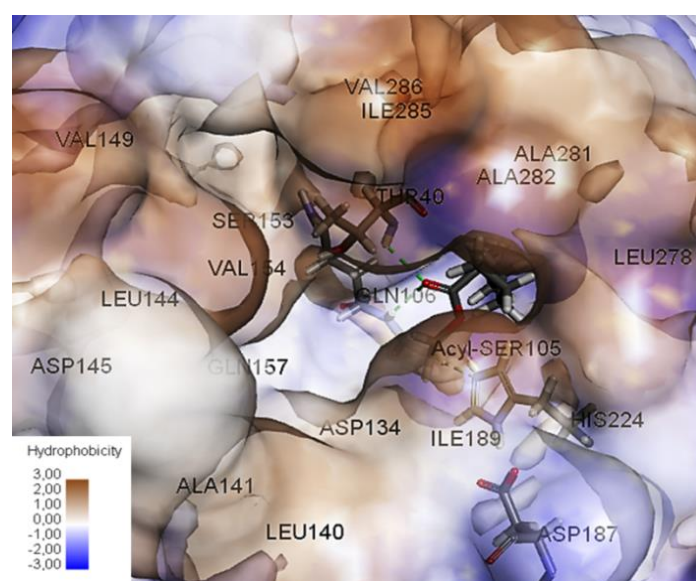


Figure 3.4: View of the CALB active site pocket. Residues of CALB for which side chains were considered as flexible during docking simulations are marked.

3.3.2.5. Analysis of docking results

3.3.2.5.1. Distance criteria

Inside the active site of CALB, five residues play an important role in the catalytic mechanism: Ser105, His224 and Asp187 residues forming the catalytic triad and the oxyanion hole residues Gln106 and Thr40. The catalytic serine is located at the bottom of the cavity described as a deep and narrow channel (10Å x 4Å wide and 12Å deep) (Uppenberg et al., 1995, 1994). The two oxyanion hole residues stabilize the reaction intermediates through hydrogen bond interactions with the main chain N-H moieties and Thr40 O-H hydroxyl. It was also observed that the active site cavity can be separated into two areas, one of which is globally hydrophobic and the other mostly hydrophilic. The acyl donor substrate is assumed to lodge all along the hydrophobic area whereas the acyl acceptor substrate is acknowledged to access the catalytic triad through the hydrophilic area (Pleiss et al., 1998). The residues Asp134, Gln106, and Thr40 constitute a polar region surrounding the catalytic serine. Based on these structural insights, the likeliest complexes issued from docking simulations were analysed taking into account two distance requirements (Figure 3.5):

- [1]: the nitrogen atom to be acylated must be at a distance lower than 4 Å from the acyl-enzyme electrophilic center so that a nucleophilic attack can happen.
- [2]: the acidic proton of the amino group to be acylated must be at a distance lower than 4 Å from the catalytic histidine so that a proton transfer could occur.

Respect or non-respect of these criteria has previously (De Oliveira et al., 2009) been presumed to correlate with the formation of productive complexes that could lead to the formation of the 2nd tetrahedral intermediate and then to the product.

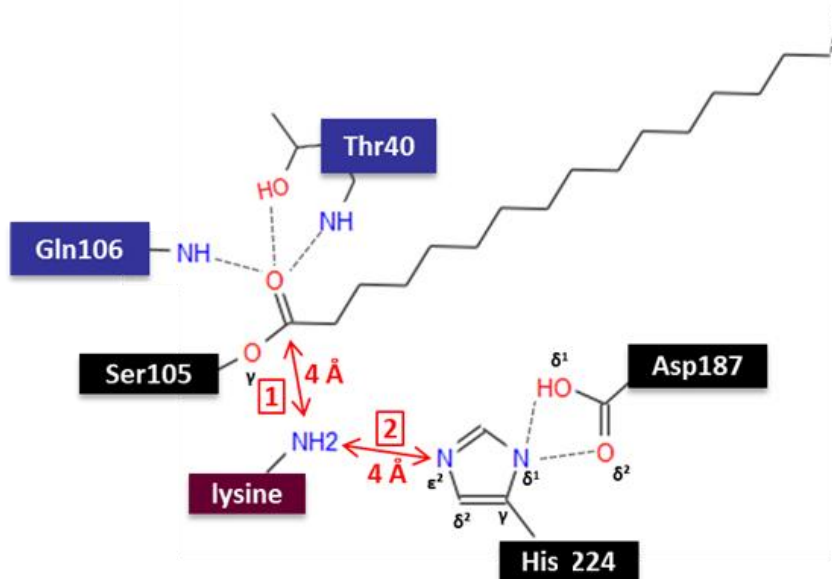


Figure 3.5: Theoretical distance criteria (d_1 and d_2) to be met by productive complexes.

3.3.2.5.2. Electrostatic interaction energy

To obtain accurate electrostatic energies, a multipolar atom model was used. The electron density was transferred from ELMAM2 database modelling protein atom types and common chemical groups (Domagała et al., 2011). The interaction energy values were computed as an integral over the electron density ρ_A of molecule A multiplied by the electrostatic potential φ_B of molecule B, or reciprocally (Domagała et al., 2011).

$$E_{elec} = \int \rho_A \varphi_B dr_A = \int \rho_B \varphi_A dr_B$$

Determination of the electrostatic interaction energy was executed by using numerical method of exact integration around selected atoms (Volkov et al., 2004), taking into account the electron density overlap of atoms, as implemented in the MoProSuite software (Jelsch et al., 2005). The methodology was for instance applied to complexes of human aldose reductase to discriminate the electrostatic energy of ligand inhibitors (Fournier et al., 2009).

3.4. Results and discussion

3.4.1. Study of lysine binding modes within CALB

3.4.1.1. Flexible Docking results

A molecular modelling approach was developed to study the regioselectivity of lysine acylation catalysed by CALB, assuming that the binding mode of the amino acid within the catalytic cavity plays a decisive role. The strategy consisted in building a target-model of acyl-enzyme firstly and then, to submit lysine to flexible docking simulations. 41 complexes, also called "poses", associating the acyl-enzyme lauroyl-CALB and the acyl acceptor lysine were obtained. These poses were grouped according to the orientation of lysine within the cavity, either its α - or its ϵ -amino group pointing towards the catalytic triad. For more clarity, these two orientations are designated by the symbols α and ϵ in the remainder of the article. 26 out of the 41 poses showed the lysine α -amino group orientated towards the cavity bottom (α orientation), whereas the 15 other poses showed a reversed orientation of the lysine (ϵ orientation).

These complexes were then subjected to various supplementary analyses aiming to deepen knowledge and understanding of lysine binding modes. First, the active site flexibility was studied. The choice of the flexible residues fell on the catalytic triad Ser105, His224 and Asp187, the oxyanion hole residues Thr40 and Gln106, and several residues covering the hydrophobic area of the cavity Leu140, Ala141, Leu144, Val149, Ser150, Ala151, Val154, Ile189, Lys290, Leu278, Ala281, Ala282, Ile285 and Ala286. The root mean square deviation (RMSD) applied to the side-chain of flexible residues was calculated by comparing with the input acyl-enzyme structure. Whatever the orientation α or ϵ of the lysine ligand, the most flexible residues were Ile189, Asp187, His224, Asp134, Gln106, with a maximum for Gln157 ($\text{RMSD}_\alpha = 2.00 \pm 0.08 \text{ \AA}$ and $\text{RMSD}_\epsilon = 2.00 \pm 0.21 \text{ \AA}$). The orientation α led to a higher RMSD value for the residue His224 than the orientation ϵ ($\text{RMSD}_\alpha = 0.94 \pm 0.12 \text{ \AA}$ and $\text{RMSD}_\epsilon = 0.48 \pm 0.21 \text{ \AA}$). Conversely, the residue Asp187 was more mobile in the orientation ϵ compared with the orientation α ($\text{RMSD}_\alpha = 0.68 \pm 0.14$ and $\text{RMSD}_\epsilon = 1.08 \pm 0.24$). However, this residue is not directly in contact with the ligand.

The Figure 3.6 shows the two main orientations of the His224 lateral chain observed among the complexes. Important distances ensuring that the active conformation of the enzyme is maintained and that the catalytic mechanism could occur are also indicated.

The conformation presented on the Figure 3.6.A respected the distances allowing hydrogen atom transfers involved in the catalytic pathway. In contrast, in some complexes, the His224 lateral chain was observed to rotate leading to a wrong conformation and then distance to Asp187 was increased (Figure 3.6.B). The capacity of the poses issued from docking to react was studied through two distance measurements (Figure 3.5). The first one corresponded to the distance between the electrophilic carbon atom of the acyl donor (lauroyl:C) and the nucleophilic nitrogen atom of the acyl acceptor (lysine:N) (distance 1). The second one provided information on the proximity between the hydrogen atom of the group becoming acylated and the His224:Ne (distance2). These distance criteria have already been successfully used to explain and even predict the selectivity of acylation reactions (De Oliveira et al., 2009; Ferrari et al., 2014). When the lysine was in the α orientation, the distance 1 was lower than 4Å for 8 out of 26 poses, vs. 7 poses out of 15 in the case of the ϵ orientation. These results showed that, whatever the orientation of the lysine, the substrate could approach the electrophilic centre of the acyl-enzyme. The distance 2 seemed more difficult to meet and was respected in 4 poses out of 26 for the orientation α vs. 5 out of 15 for the orientation ϵ . Combining the two distance criteria led to 2 and 4 correct poses for the orientations α and ϵ , respectively. In a previous study, rigid docking simulations were carried out on the peptides SK, SYK, KYS and LQKW against oleoyl-CALB target (Ferrari, 2014). When comparing with the present study, peptides seemed overall closer to the catalytic triad than lysine. However, results remained difficult to compare as both the acyl-enzyme and the ligand were different.

Figure 3.7 represents the distance d_1 according to the distance d_2 for each pose issued from docking simulations. Poses were grouped, depending on the orientation α or ϵ of lysine. Trend lines showed that the distance criteria were respected for some systems belonging to both groups of poses. However, when lysine adopted the α orientation, the proximity of the NH₂ moiety to His224 seemed difficult to meet. This result was consistent with previous observations relating to the rotation of the His lateral chain.

Anyway, these theoretical results suggested that the acylation of both amino groups of lysine could occur, leading to two distinct mono-acylated products. A possible limitation to the acylation of the lysine α -amino group could be the hydrogen transfer from the lysine α -amino group to His224, due to the non-favourable orientation of imidazole ring. However, at the docking stage, no theoretical evidence could be found to really discriminate between the two acylation sites.

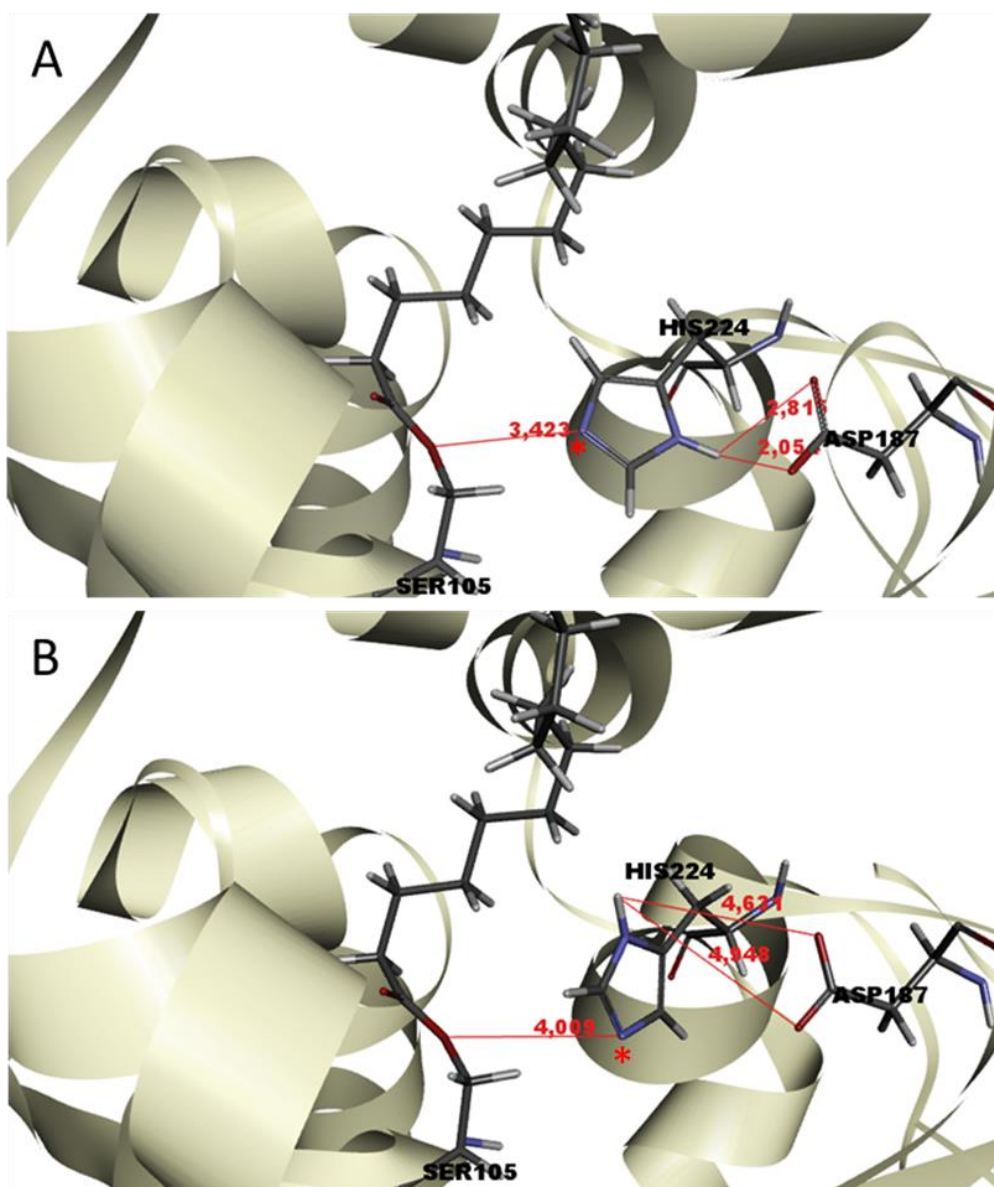


Figure 3.6: Main conformations of the catalytic cavity observed among the acyl-enzyme complexes issued from docking. A: one example of complex showing a correct conformation of the catalytic machinery. B: one example of complex showing an unfavorable orientation of the His224 lateral chain. Distances theoretically involved in hydrogen atom transfers are indicated (in Å). For more clarity, the lysine is not shown.

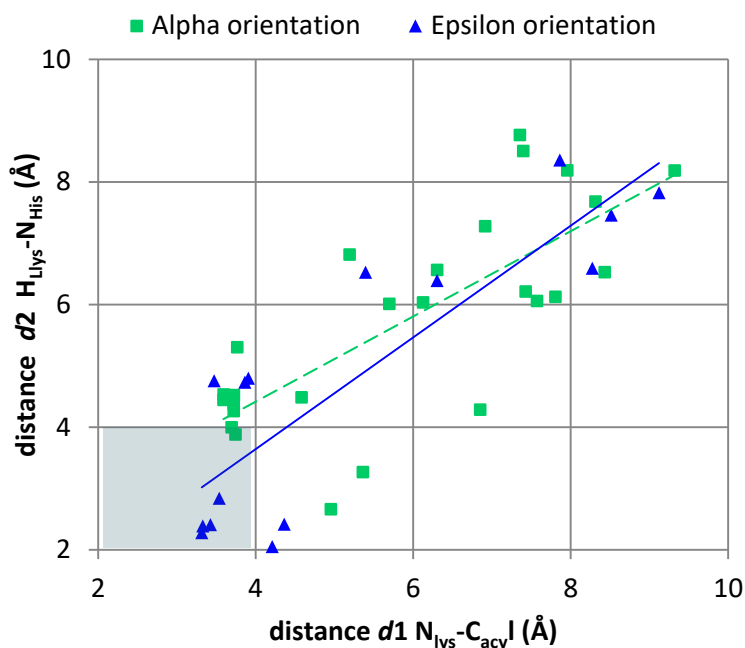


Figure 3.7: Distances d_1 and d_2 for each pose issued from docking, depending on lysine orientation. \blacktriangle (-): poses in the orientation ε ; \blacksquare (-): poses in the orientation α .

3.4.1.2. Experimental validation

The synthesis of lauroyl-lysine catalysed by CALB was carried out and the formation of products was monitored through HPLC-MS² analyses. Acylation reactions were performed at 55°C during 72 h, in 2-methyl-2-butanol as solvent, in the presence of tri-ethylamine (TEA) to control the ionization state of the substrate amino groups (Reyes-Duarte et al., 2002). Lauric acid:lysine molar ratio was 2:1. Mono-lauroyl-lysine products and di-lauroyl-lysine have a molecular mass of 328 ($[M+H]^+$) and 510, respectively. On the basis of mass analysis, the presence of one major mono-acylated product was observed. In order to discriminate between α - and ε -lauroyl-lysine, the corresponding standards were analyzed and their Mass Spectrometry (MS)² profiles were generated by fragmentation of the parent ions (Figure 3.8). Fragmentation of α -lauroyl-lysine led to one major daughter ion ($m/z = 293$) corresponding to $[(\text{Lauroyl-K}) - 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$, and two minor daughter ions ($m/z = 147$ and $m/z = 266$) corresponding to $[(\text{K}) + \text{H}]^+$ and $[(\text{lauroyl-K}) - \text{H}_2\text{O} - \text{COOH} + \text{H}]^+$, respectively. Fragmentation of ε -lauroyl-lysine led to one major daughter ion ($m/z = 266$) corresponding to $(\text{lauroyl-K}) - \text{H}_2\text{O} - \text{COOH} + \text{H}]^+$, and one minor daughter ion ($m/z = 147$) corresponding to $[(\text{K}) + \text{H}]^+$. According to these indications, experimental evidence supported that the major

product formed during the reaction was ϵ -lauroyl-lysine. These results are consistent with a previous study about the acylation of various lysine-based peptides catalysed by CALB with oleic acid, showing that the selective acylation of the lysine ϵ -amino group occurred (Ferrari et al., 2014; Soo et al., 2004). In rare cases, traces of α -lauroyl-lysine were detected at the beginning of some reactions. Theoretical experiments left a doubt about the selectivity of the reaction although structural elements strongly suggested the preferential acylation of the lysine ϵ -amino group. It seems that distance criteria required for the catalytic mechanism are more easily met for the ϵ orientation than for the α orientation but this criterion would not constitute a sufficient basis for bringing theoretical evidence for the selectivity of the reaction. Therefore, energetic criteria were also explored aiming to enhance the robustness of our models and their predictive capacity, while at the same time trying to limit simulation costs.

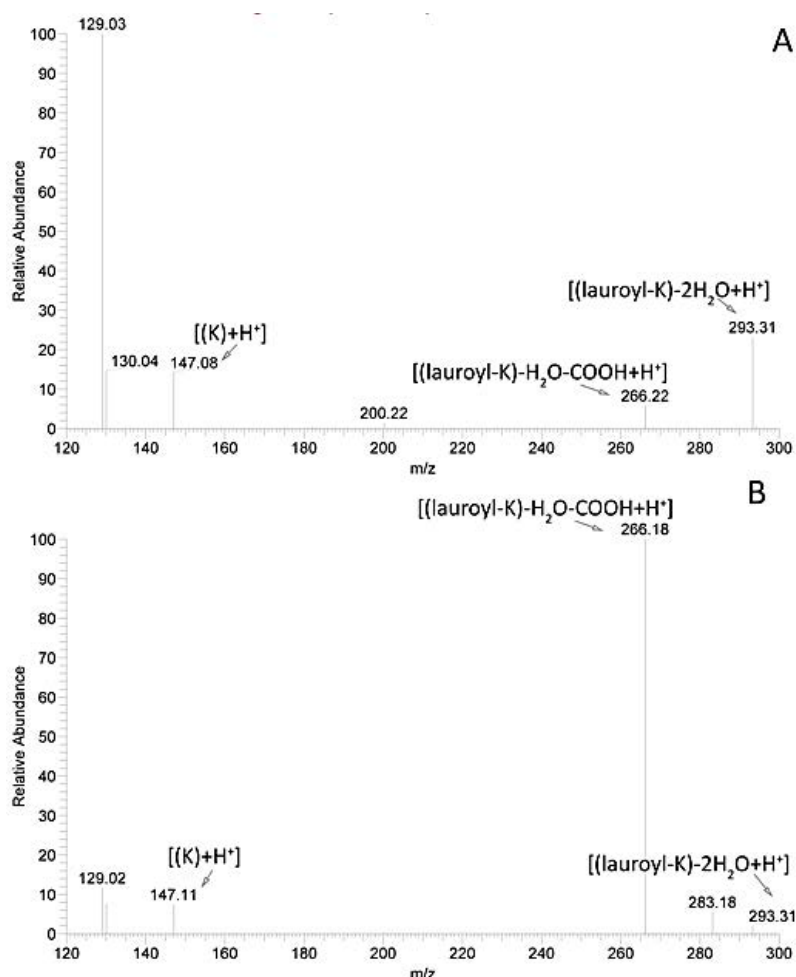


Figure 3.8: Mass analyses of α -lauroyl-lysine (A) and ϵ -lauroyl-lysine (B) standards (m/z=329). MS² spectrum after fragmentation of the parent ion.

3.4.2. Energetical analysis of poses

3.4.2.1. C-DOCKER interaction energy

In order to discriminate poses obtained from the Flexible Docking workflow, the C-DOCKER interaction energy was used (Koska et al., 2008). A correlation research was performed aiming to determine if there was a significant relationship between the distance criteria and the CDOCKER energy. Then, the relevance of these combined parameters to justify the regioselectivity of lysine acylation was evaluated. As shown in Table 3.1, no significant correlation was found between the CDOCKER energy and the respect of distance criteria. A low 0.33 correlation was found between lysine orientation and the CDOCKER energy, the orientation ε leading to a stronger interaction energy compared with the orientation α . However there was no clear and strong evidence of the selective acylation of the lysine ε -amino group. Overall, it would seem that ranking and post-docking tools, considered separately or combined with distance criteria, were not sufficient to match perfectly with experimental results. Many studies reported that the prediction of binding affinities turns out to be really difficult and require extensive computational time (Irwin and Shoichet, 2016; Leach et al., 2006). Consequently, ranking of poses is identified as a difficult challenge that cannot be ignored when evaluating docking accuracy (Erickson et al., 2004). This question appears increasingly difficult to address when applied to highly flexible ligands or in the case of important conformational changes in the protein structure upon ligand binding.

Table 3.1: Correlation coefficients between the CDOCKER energy and respect of distance criteria or lysine orientation. MoPro E_{elec} is the sum of electrostatic energies between lysine and the active site residues marked in Fig. 3.4 or between lysine and the residues Ser105 and His224.

correlation	C-DOCKER Interaction energy	MoPro E_{elec} Electrostatic energy	MoPro E_{elec} E(Ser105)+E(His224)
Energy / respect of distance criteria	0.11	0.57	0.78
Energy / lysine orientation	0.33	0.13	0.36

3.4.2.2. Electrostatic interaction energy

More detailed research was carried out into the way lysine interacts with CALB catalytic pocket, while maintaining the objectives of discriminating between the two groups of poses (α or ε orientation) and limiting simulation costs. Electrostatic interaction energies using a

multipolar atom model were calculated between lysine and the catalytic residues; Figure 3.10 focuses more specifically on Ser105 and His224.

Figure 3.10 shows electrostatic interaction energies of poses depending on lysine orientation; poses were also grouped depending on their proximity to the catalytic triad. Whatever the lysine orientation, almost all of the poses not respecting the distance criteria led to positive (repulsive) electrostatic interaction energies towards either Ser105 or His224, or more often towards both residues (Figure 3.10.A and B). This trend seemed quite understandable as poses not respecting the distance criteria were unlikely to interact in a favorable way with the catalytic residues.

The H-N-H...N ϵ_2 interaction between one of the lysine NH₂ groups and His224 is potentially a hydrogen bond and is electrostatically favorable. For instance, in the ζ pose L15 complex with strongest $E_{elec}(Lys, His224) = -50$ kJ/mol, the hydrogen bond contribution $E_{elec}(H\zeta...N\epsilon_2)$ reaches -32 kJ/mol. On the other hand, the $E_{elec}(Lys, Ser105Lauroyl) = -62$ kJ/mol attractive interaction in complex L15 is mainly due to the hydrogen bond between the lysine N ζ H₂ group and the oxygen O=C of the ester group in the acylated Ser105 as $E_{elec}(H...O) = -50$ kJ/mol. A few poses not respecting the distance criteria led to negative electrostatic interaction energies towards Ser105 and His224 (L22, L40, L06 and L19), presumably due to attractive interactions between other atoms that were not concerned by the distance measurements.

The two poses in the orientation α respecting the distance criteria led to attractive electrostatic interaction energies towards Ser105 but not towards His224 (Figure 3.10.A).

Inspection of complex L29 shows indeed a relatively long distance $d_2 = 3.9$ Å between the NH₂ group and His224. Moreover, the E_{elec} value between lysine and His224 in both productive α complexes is rendered non favorable (Figure 3.10) due to the proximity of the electronegative lysine carboxylic oxygen atoms with His224: $d(O...N\epsilon_2) = 4.3$ Å in L29 and 3.3 Å in L37 (Figure 3.9). Interaction diagrams brought out hydrogen bond and van der Waals interactions between the lysine and the residues Ser153, Thr40, Gln157 and Thr40, stabilizing the lysine α -amino-group close to the catalytic serine but far from the catalytic histidine. Poses in the ϵ orientation respecting the distance criteria gave negative electrostatic interaction energies towards both catalytic residues Ser105 and His224 (Figure 3.10.B: L15, L25, L26). Thus,

these poses could be qualified as productive as these were geometrically and energetically favorable to the formation of the tetrahedral intermediate of the resulting reaction product.

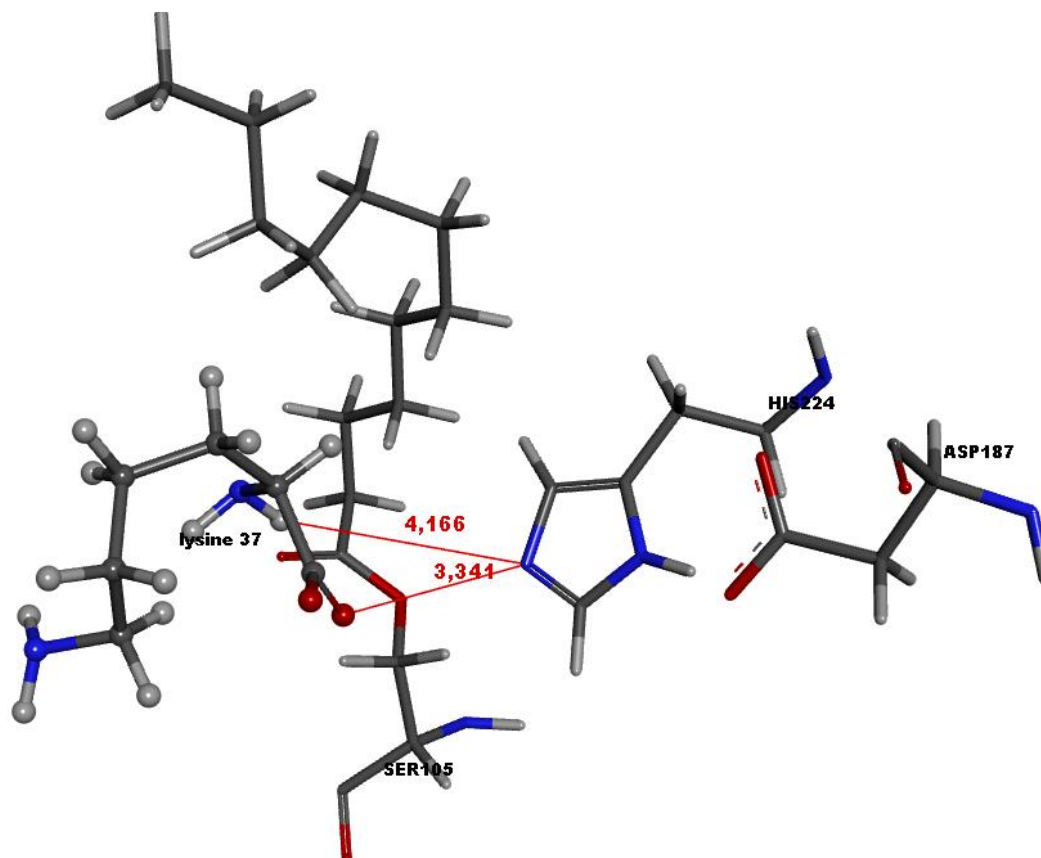


Figure 3.9: α -Conformation L37 of the catalytic cavity observed among the acyl-enzyme complexes issued from docking.

These results confirmed that lysine in the ϵ orientation could successfully approach the catalytic triad and interact with it, contrarily to lysine in the α orientation that came hardly close to the catalytic His224. At this stage, the respect of distance criteria combined with favorable electrostatic interactions with the catalytic residues Ser105 and His224 strongly suggested a trend that perfectly met experimental data, leading to the preferential acylation of the lysine ϵ - amino group.

The E_{elec} values of lysine with Ser105 and His224 correlate well with the two distance criteria being respected ($c=78\%$) which involved these same two residues. The E_{elec} values summed over all the selected active site residues show a correlation of 57% with d_1+d_2 criteria. This

suggests that ligand poses which are not in catalytic position generally have not recovered electrostatic attractions equivalent to the hydrogen bonds formed with Ser105 and His224.



Figure 3.10: Electrostatic interaction energies between the catalytic residues Ser105 and His224 and lysine in the orientation α (A) or ϵ (B). Poses were grouped according to the proximity of lysine to the catalytic triad. Poses respecting the distance criteria are given on the right.

3.4.3. Molecular rules for selectivity

In order to deepen scientific knowledge of the causes that govern the selectivity in lysine acylation reaction, electrostatic interaction energies between lysine and the residues constituting the catalytic cavity were calculated. Location of these residues is shown on Figure 3.4. The average E_{elec} energies are presented on Figure 3.11. Poses were grouped according to their orientation and their proximity to the catalytic triad.

Figure 3.11 A and B allowed studying the effect of lysine position on electrostatic interaction energies, for one given orientation of the ligand. When lysine adopted the ϵ orientation close to the cavity bottom, the main interactions were observed with residues of the catalytic triad and the polar Asp134. Interactions with the catalytic Ser105 and His224 logically disappeared

in poses not respecting the distance criteria. Thus, the catalytic residues appeared as crucial interaction spots stabilizing lysine in a correct orientation within the cavity. The contribution of these residues to a hydrogen bond network imposing electrostatic interaction restrictions to the substrates was firstly mentioned by researchers who elucidated CALB structure (Uppenberg et al., 1994).

The role of Asp134 in positioning of acyl acceptor substrates was confirmed in a study relative to CALB-catalyzed acylation of flavonoids (Bidouil et al., 2011). In the present study, this residue and lysine substrate are not charged, but have the potential to form strong hydrogen bonds. Indeed the interaction E_{elec} value of lysine with Asp134 was found to be attractive in the ε poses respecting distance criteria in the range -22 to -60 kJ/mol. In the two α poses, the energy was -10 and +5 kJ/mol).

Poses in the orientation α close to the cavity bottom led to interactions with Ser105, Asp187 and other polar residues facing away from the catalytic triad like Gln157, Ser153 and Asp145. The absence of attractive interaction with His224 was coherent with observations relative to distance criteria being generally not fulfilled. Repulsion from the oxyanion hole residues is also suggested. Poses distant from the cavity bottom lost interaction with Ser105 while gaining interaction with Glu188 and Asp187. Whatever the proximity of lysine to the cavity bottom, a lack of interaction with Asp134 was noticed. These results suggested lysine in the α orientation could be stabilized within the cavity but in a wrong configuration that was unlikely to be productive.

Figure 3.11 C and D compared interactions aiming to determine the driving forces leading to productive or not productive orientation of lysine. In the case of poses far from the catalytic triad, lysine interacted with Asp187, regardless of its orientation. Orientation α led to interaction with Asp145 instead of Asp134 observed for orientation ε . As a reminder, Asp145 is positioned in the active site opposite to the catalytic triad. In the case of poses close to the catalytic triad, differences were observed depending on the orientation of lysine. The orientation ε led to strengthened interactions with the catalytic triad and Asp134. In orientation α , lysine gained interaction with residues facing away from the catalytic triad such as Asp145, Ser153, and Gln157.

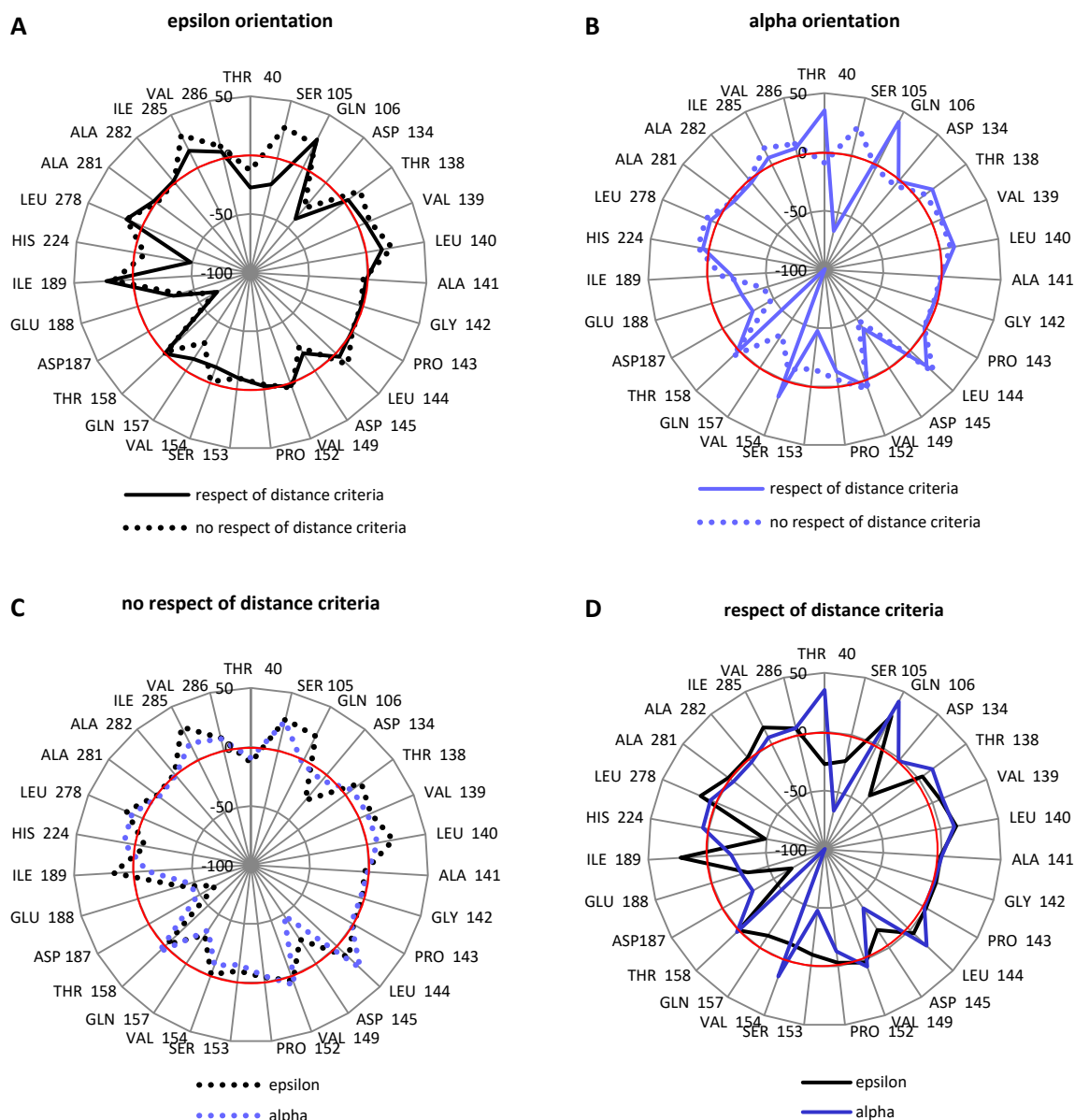


Figure 3.11: Average electrostatic interaction energies within lysine/acyl-CALB complexes. Poses were grouped according to the orientation of lysine (α in blue or ϵ in black), and its proximity to the catalytic triad.

3.5. Conclusion

A methodology combining docking simulations and interaction energy calculations was proposed to examine the regioselectivity of lysine acylation catalyzed by *C. antarctica* lipase B at a molecular level. Experiments showed the near-exclusive acylation of lysine ϵ -amino group; this trend was also suggested by docking simulations. Indeed, the best poses according

to the CDOCKER energy revealed two main orientations of the lysine within the catalytic cavity, depending on whether the ϵ - or the α -amino group of lysine pointed towards the catalytic triad (orientations ϵ or α , respectively).

However, more detailed analysis of the complexes suggested that the α orientation led to poses where the lysine amino group lies broadly far from the catalytic His224 or where the electrostatic interaction energy between the lysine substrate and His224 is not attractive. Visual inspection of the docked poses shows that in the α orientation, the lysine carboxylate group, which is close to the α -amino group moiety, leads to an electrostatically unfavorable position and may hinder the ligand anchoring. Moreover, the presence of the bulky COOH group near the NH₂ group in α position may cause some steric hindrance while the ϵ position is more accessible and shows more stereochemical/conformational flexibility.

Instead, lysine would seem attracted by other polar residues facing away from the catalytic triad. Binding in the orientation ϵ appeared quite different, as criteria relative to the proximity of lysine to the catalytic machinery seemed easier to meet compared with the orientation α . Furthermore, favorable interactions were observed between lysine and residues constituting a small polar area covering the catalytic triad and some neighboring residues, namely Asp134.

Calculation of the accurate electrostatic interaction energy using a multipolar atom model appeared as a pertinent method to characterize the interaction network within enzyme/substrates complexes and to discriminate between the models issued from docking. In the present case study, modelling results helped determine the molecular rules for selectivity in lysine acylation. Favorable electrostatic interactions with the catalytic residues His224, Ser105, Asp187 and Asp134 appeared as good indicators of the reaction feasibility. More broadly, global evaluation of electrostatic interactions helped determining the driving forces responsible for the reaction selectivity.

3.6. Contribution de l'article

Cette étude a permis la mise au point d'une méthodologie destinée à prédire la régiosélectivité de CALB lors de l'acylation de la lysine et à améliorer la compréhension du mécanisme responsable de cette sélectivité. Les résultats obtenus ont donc permis d'apporter des éléments de réponse aux différentes questions scientifiques posées précédemment.

Pour la mise au point de cette méthodologie la première étape a consisté à générer des complexes acyl-enzyme/substrat en utilisant un protocole de docking dans lequel une flexibilité a été autorisée sur un ensemble de résidus constituant la cavité catalytique (Koska et al., 2008). La flexibilité des résidus du site actif a été évaluée par des calculs de RMSD par rapport à l'acyl-enzyme de départ. Il a été observé que les résidus : Ile189, Asp187, His224, Asp134, Gln106 et Gln157 possèdent les RMSD les plus importants, avec un maximum pour Gln157. Ces résultats ont permis d'observer que globalement l'orientation n'avait que peu d'impact sur les mouvements des chaînes latérales. Cependant, un phénomène de retournement de l'His224 a été observé. Celui-ci provoquerait un éloignement entre les atomes du cycle imidazole impliqué dans un transfert de proton faisant parti du mécanisme catalytique et les deux autres résidus catalytiques qui l'entourent (Ser105 et Asp187). En observant ce phénomène en fonction de l'orientation de la lysine, il est apparu que ce positionnement défavorable de l'His224 se produit le plus souvent avec l'orientation α .

Puis la mesure des distances évoquées par De Oliveira (2009) a été prise en compte afin de réaliser un tri des complexes issus du docking. Les résultats ont suggéré une acylation préférentielle de la fonction amine ϵ de la lysine sans pour autant écarter la possibilité d'une acylation au niveau de la fonction amine α . Or expérimentalement, un produit mono-acylé est observé, correspondant à l'acylation de la fonction amine ϵ de la lysine. Il semble donc que ces critères de distance soient nécessaires mais non suffisants pour discriminer les complexes « productifs » et les complexes « non-productifs ». Dans le but de renforcer la robustesse des modèles, des calculs de l'énergie d'interaction électrostatique au sein des complexes ont été menés (Domagała et al., 2011) et ont permis de montrer le caractère non-productif des complexes correspondant à une orientation α de la lysine. Ces travaux montrent l'intérêt de coupler différents outils de modélisation afin d'éviter les faux-positifs. En effet, le docking seul n'écarte pas la possibilité d'une acylation de la fonction amine α de la lysine. En revanche, une méthodologie associant le docking et des calculs d'énergie d'interaction

électrostatique conduit à des résultats parfaitement cohérents avec les résultats expérimentaux et semble prometteuse pour prédire la régiosélectivité de l'acylation d'acides aminés.

Dans une seconde partie l'étude s'est penchée sur l'identification de résidus, interactions, pouvant être à l'origine de la régiosélectivité observée expérimentalement. Pour cela, des calculs d'énergie d'interaction électrostatique ont été réalisés sur un certain nombre de résidus constituant la cavité catalytique. Les résultats obtenus ont mis en évidence l'implication de certains résidus dans le positionnement de la lysine par rapport aux résidus catalytiques. Par ailleurs, l'Asp134 est apparu comme un résidu clé permettant d'attirer le ligand vers le fond de la cavité. Une interaction favorable avec celui-ci accompagnée d'interactions favorables avec les résidus catalytiques (notamment His224 et Ser105) semble être un bon indicateur de la faisabilité de la réaction.

Dans la suite de ce chapitre des résultats complémentaires portant sur l'impact de la structure du substrat donneur d'acyle sur l'acylation catalysée par CALB sont présentés.

4. Résultats complémentaires

L'effet de la longueur de chaîne carbonée du donneur d'acyle sur l'efficacité des réactions catalysées par CALB est un paramètre qui peut influencer sur la réaction. Il a déjà été abordé dans plusieurs études expérimentales. Certaines ont conclu que lors de l'acylation de flavonoïde par CALB le taux de conversion total dépendait de la longueur de la chaîne du donneur d'acyle et que le taux de conversion le plus élevé était obtenu avec la chaîne la plus courte (Katsoura et al., 2006; Salem et al., 2010). Dans un autre travail portant sur l'acylation de flavonoïde il a été observé qu'au-delà de 12 carbones la longueur de la chaîne acyle n'a aucun effet (Melika Ardhaoui et al., 2004).

Il semble donc intéressant d'étudier si la longueur de la chaîne influence également la réaction d'acylation d'acides aminés. Pour cela des simulations de modélisation moléculaire ont été menées pour étudier l'impact de la longueur de la chaîne acyle sur la faisabilité et la sélectivité de l'acylation de la lysine catalysée par CALB. Des simulations de docking flexible ont été réalisées avec différents systèmes acyl-enzyme : capryloyl-, lauroyl-, palmitoyl- et oleoyl-CALB, possédant respectivement 8, 12, 16 et 18 carbones. Tous les acides gras étudiés sont saturés à l'exception de l'acide oléique qui présente une insaturation sur le carbone n°9.

Quelles sont les questions scientifiques associées à cette étude ?

- La nature de la chaîne acyle a-t-elle un effet sur la conformation de la cavité catalytique ?
- La nature de la chaîne acyle a-t-elle un effet sur les modes d'interaction de la lysine avec la cavité ?
- Les réponses à ces différentes questions peuvent-elles apporter des indications quant à la faisabilité, l'efficacité et la sélectivité réactionnelle ?

Effet de la chaîne acyle sur l'orientation de la lysine :

Les simulations ont permis d'obtenir respectivement 34, 41, 38 et 36 poses avec le caproyl-, lauroyl-, palmitoyl- et oléoyl-CALB. Quelle que soit la longueur de la chaîne acyle, 2 orientations de la lysine sont observées, la fonction α -NH₂ ou la fonction ϵ -NH₂ pointant vers

le fond de la cavité catalytique. Sur l'ensemble des complexes obtenus, la lysine est majoritairement orientée avec le groupement amine N-terminal vers le fond de la cavité.

Effet de la chaîne acyle sur la conformation de la cavité catalytique :

Le RMSD moyen a été déterminé pour l'ensemble des résidus flexibles par comparaison avec leur positionnement initial dans l'acyl-enzyme. Le RMSD total sur les résidus flexibles est de $0,66 \pm 0,02$ avec la chaîne capryloyle, $0,99 \pm 0,02$ avec les chaînes lauroyle et palmitoyle et $0,94 \pm 0,01$ avec la chaîne oleoyle. Ces résultats indiquent que globalement, quelle que soit la longueur de la chaîne acyle, le docking de la lysine dans la cavité désorganise peu la structure protéique. Ceci est particulièrement observé avec la chaîne acyle la plus courte (C8), conduisant au RMSD le plus faible. La Figure 3.12 indique les valeurs moyennes de RMSD obtenues pour chaque résidu étudié. Ces résultats indiquent que, quelle que soit la longueur de la chaîne acyle, le résidu présentant la plus grande flexibilité est la Gln157, tandis que les résidus les moins mobiles sont Thr40, Val154, Ile285, Val286 et Ile189. La longueur de la chaîne acyle ne modifie pas significativement la mobilité des résidus, sauf dans le cas de la chaîne palmitoyle au niveau des résidus Asp187, His224, Asp134, Gln106 et Gln157. On constate que ces résidus concernés sont tous impliqués dans le mécanisme catalytique excepté la Gln157. On observe également que l'His224 est significativement plus mobile en présence des chaînes acyles les plus courtes (≤ 12 carbones).

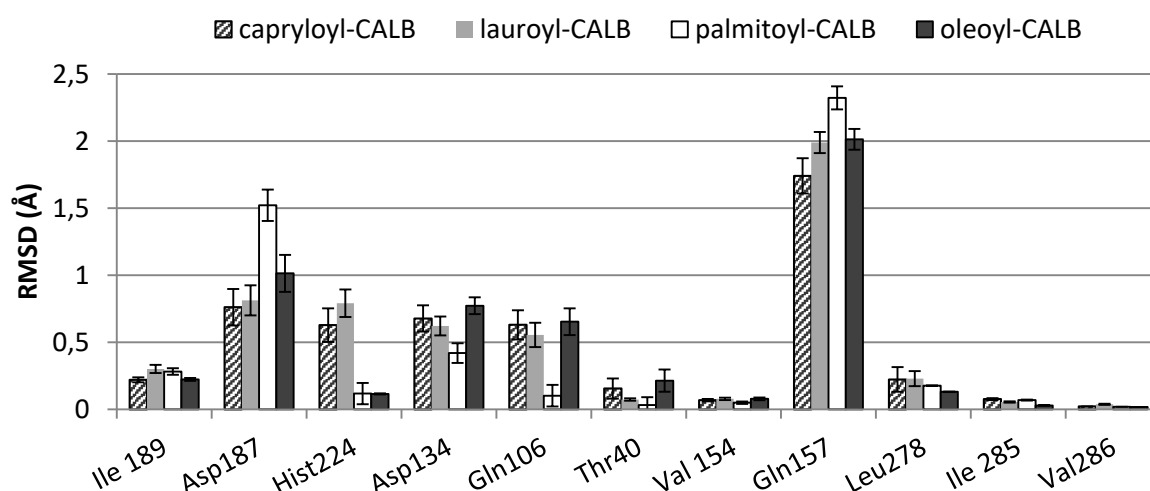


Figure 3.12: Valeurs moyennes des RMSD calculées par résidu pour chaque acyl-enzyme étudiés.

Lorsque l'on prend en compte l'orientation de la lysine dans la cavité catalytique, aucune différence significative n'est observée dans le cas du capryloyl-CALB et de l'oléoyl-CALB (Figure 3.13.A et D). Avec les chaînes lauroyle et palmitoyle, l'orientation α conduit à un RMSD plus élevé que l'orientation ϵ au niveau de l'His224 (Figure 3.13.B et C).

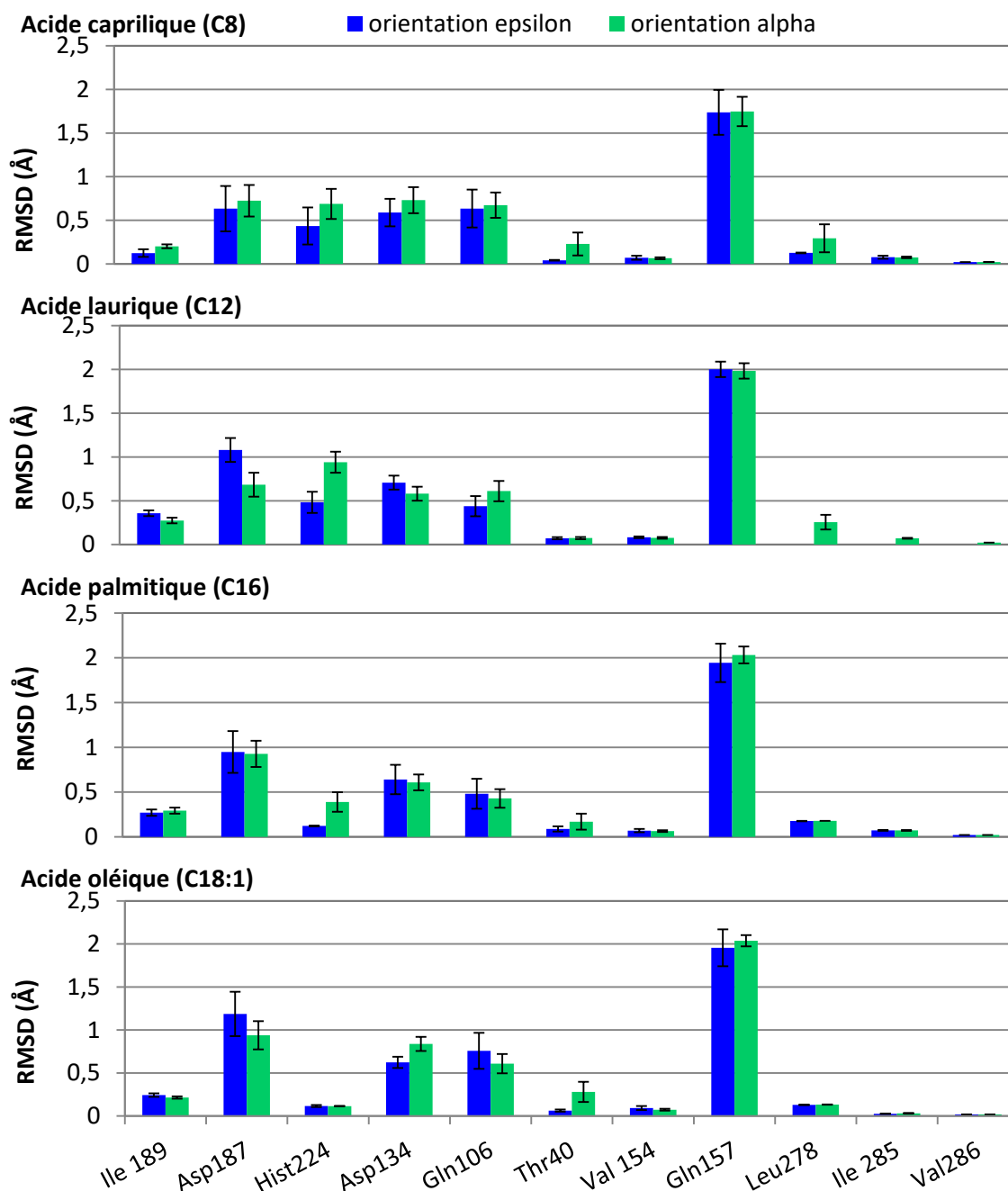


Figure 3.13: Valeurs moyennes des RMSD par résidu pour chaque acyl-enzyme étudié en fonction des deux orientations de la lysine dans la cavité. Orientation α (vert) : le groupement α -NH₂ de la lysine est dirigé vers le fond de la cavité ; orientation ϵ (bleu) : le groupement ϵ de la lysine est dirigé vers le fond de la cavité.

Comme montré précédemment sur la Figure 3.6, la chaîne latérale de l'His224 a tendance à effectuer une rotation en présence de la lysine dans l'orientation α . La Figure 3.14 représente la superposition des différentes conformations du résidu His224 au sein des complexes obtenus, en fonction de la chaîne acyle. Cette représentation permet de visualiser que, dans le cas de la chaîne capryloyle (C8), la chaîne latérale de l'His224 est très mobile quelle que soit l'orientation α ou ϵ de la lysine. En revanche, pour les chaînes lauroyle (C12) et palmitoyle (C16), un retournement de la chaîne latérale de l'His224 est observé majoritairement pour l'orientation α de la lysine, conduisant à une augmentation des distances entre les atomes des résidus catalytiques. En ce qui concerne l'acylation par l'acide oléique (C18:1), l'His224 est correctement positionnée, quelle que soit l'orientation α ou ϵ de la lysine. Ces résultats suggèrent i) une acylation peu efficace avec la chaîne acyle capryloyle quelle que soit l'orientation de la lysine, en raison d'une grande mobilité de l'His224 ; ii) une acylation préférentielle de la fonction amine ϵ de la lysine avec les chaînes lauroyle et palmitoyle ; iii) une absence de sélectivité mais une bonne efficacité réactionnelle avec la chaîne oléoyloyle.

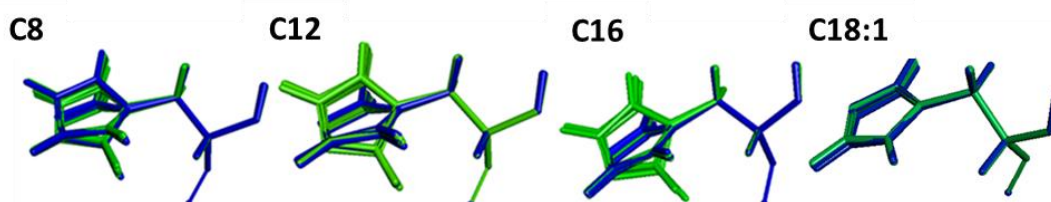


Figure 3.14: Superposition des conformations adoptées par l'His224 au sein des complexes issus des simulations de docking flexible, selon l'orientation α (vert) ou ϵ (bleu) de la lysine.

Effet de la longueur de la chaîne acyle sur la conformation des complexes E/S :

Les distances interatomiques moyennes impliquant les résidus catalytiques (Ser105 et His224) sont indiquées dans le Tableau 3.2. Ces distances renseignent sur la faisabilité du transfert d'électrons et de protons impliqués dans le mécanisme catalytique. Dans ce tableau figurent également les distances entre les résidus du trou oxyanionique et le carbonyle lié à la serine impliqués dans des liaisons hydrogène stabilisant la chaîne acyle.

Pour chaque acyl-enzyme, deux liaisons hydrogène entre le carbonyle et les groupements amines de la Thr40 et de la Gln106 ont été observées. Ces liaisons permettent de stabiliser l'acyl-enzyme et facilitent l'attaque nucléophile du substrat accepteur d'acyle.

Lorsque l'on compare les distances moyennes mesurées entre les résidus de la triade catalytique, il apparaît que les distance entre les résidus Asp187 et His224 sont globalement plus importantes lorsque la lysine est orienté en α , comparativement à l'orientation ϵ , ce qui n'est pas favorable au mécanisme catalytique. De plus, ces distances diminuent lorsque la longueur de la chaîne acyle augmente, ce qui semble cohérent avec les observations faites précédemment sur la mobilité de la chaîne latérale de l'His224 (Tableau 3.2.A).

Le Tableau 3.2.B représente les moyennes des deux critères de distance impliquant la lysine et les résidus de la triade catalytique, en fonction de l'orientation de la lysine. Pour la distance : $HN_{1-lys} - N_{\epsilon 2-His224}$, les résultats indiquent que le ligand est toujours plus proche de l'His224 lorsqu'il est orienté en ϵ , et ce, quelle que soit la longueur de la chaîne acyle. Pour les mesures de la distance $N_{1-lys}-C_{1acyl}$, les résultats sont significativement différents uniquement pour les chaînes palmitoyle et oléoyle, les distances les plus courtes étant obtenues avec l'orientation ϵ de la lysine.

La Figure 3.15 représente la distance $N_{1-lys}-C_{1acyl}$ en fonction de la distance $H_{1-Lys}-N_{\epsilon 2-His}$ pour chaque acyl-enzyme et chacune des orientations de la lysine. Les zones grisées matérialisent le respect des critères de distance. Pour la chaîne capryloyle des poses dans les deux orientations respectent les critères de distance, suggérant une absence de sélectivité de la réaction. Pour les chaînes acyle plus longues, les courbes de tendance suggèrent une sélectivité en faveur de la fonction amine ϵ de la lysine, la sélectivité étant d'autant plus marquée que la chaîne acyle est longue. Ainsi, les modèles suggèrent une acylation strictement sélective de la lysine par l'acide oléique.

Tableau 3.2: Distances moyennes interatomiques en fonction de la nature de la chaîne acyle et de l'orientation alpha ou epsilon de la lysine. A : distances entre les résidus catalytiques et les résidus du trou oxyanionique ; B : distances entre les résidus catalytiques et la lysine.

A

Orientation alpha					
	Distances interatomiques (Å)	C8	C12	C16	C18 :1
Triade catalytique	O _γ -Ser105 - N _{ε2} -His224	3,59±0,23	3,73±0,06	3,44±0,06	3,13±0,00
	HN _{δ1} -His224 - O _{δ1} -Asp187	3,28±0,35	3,91±0,21	2,96±0,23	2,39±0,09
	HN _{δ1} -His224 - O _{δ2} -Asp187	3,45±0,38	3,78±0,26	3,02±0,21	2,60±0,10
Trou oxyanionique	HNGln106 - O _{O=C} acyl-enzyme	2,37±0,14	2,47±0,00	2,41±0,00	1,92±0,00
	HNThr40 - O _{O=C} acyl-enzyme	2,31±0,14	2,35±0,02	2,28±0,02	2,12±0,01
Orientation epsilon					
	Distances interatomiques (Å)	C8	C12	C16	C18 :1
Triade catalytique	O _γ -Ser105 - N _{ε2} -His224	3,58±0,09	3,57±0,08	3,31±0,01	3,13±0,00
	HN _{δ1} -His224 - O _{δ1} -Asp187	3,07±0,33	3,15±0,35	2,42±0,14	2,45±0,19
	HN _{δ1} -His224 - O _{δ2} -Asp187	3,28±0,37	3,10±0,30	2,59±0,14	2,34±0,14
Trou oxyanionique	HNGln106 - O _{O=C} acyl-enzyme	2,39±0,00	2,48±0,00	2,36±0,03	1,19±0,00
	HNThr40 - O _{O=C} acyl-enzyme	2,26±0,03	2,32±0,02	2,31±0,03	2,6±0,02

B

Distances interatomiques (Å)	orientation	C8	C12	C16	C18 :1
HN ₁ lysine - N _{ε2} -His224	α	5,38±0,46	5,73±0,33	5,55±0,35	5,78±0,01
	ε	4,25±0,61	4,79±0,59	3,53±0,46	4,07±0,02
N ₁ lysine - C ₁ acyl	α	5,73±0,47	5,89±0,36	5,77±0,40	5,88±0,00
	ε	4,92±0,53	5,26±0,56	4,43±0,53	4,00±0,00

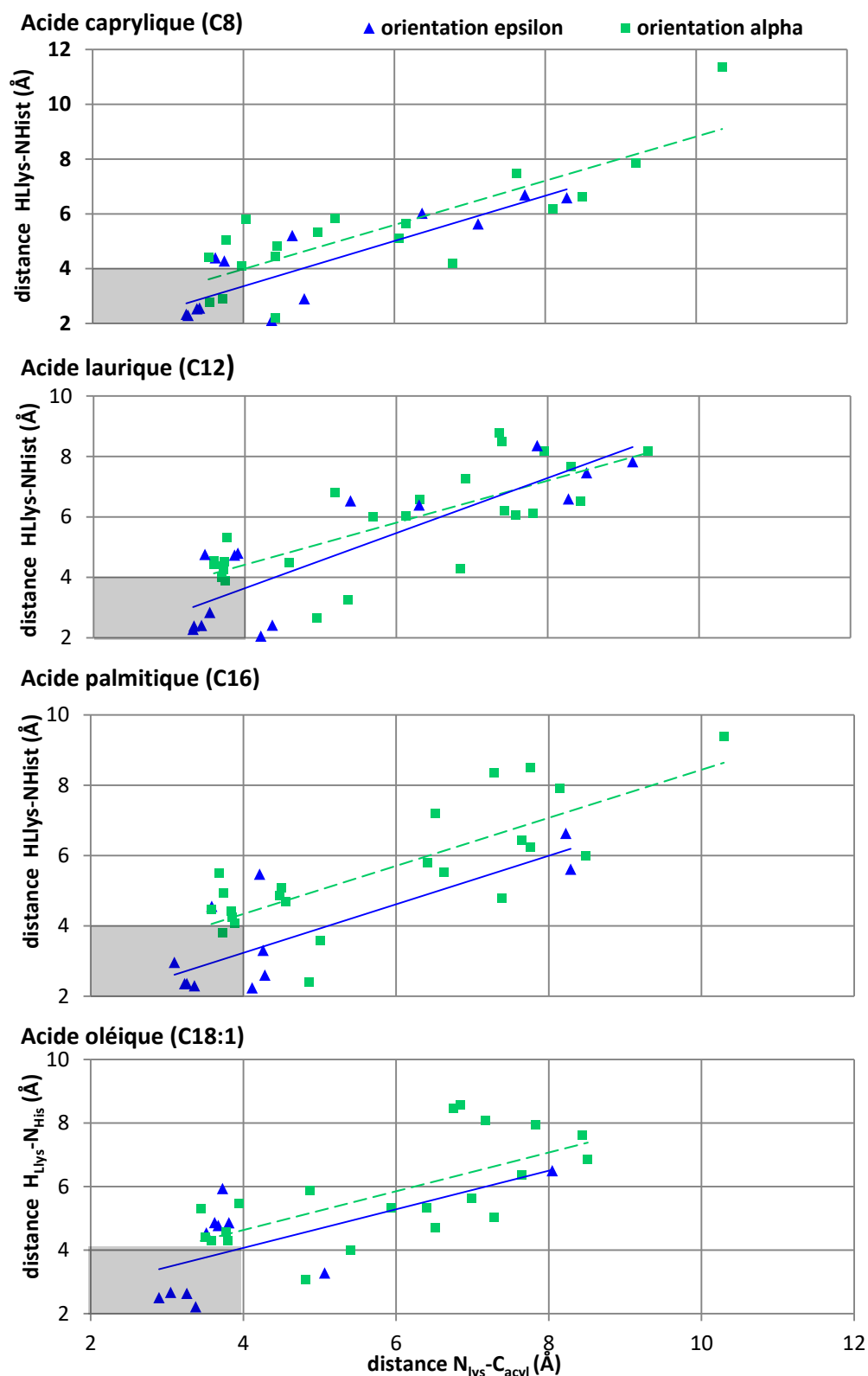


Figure 3.15: Distance $N_{Lys}-C_{acyl}$ en fonction de la distance $H_{Lys}-N_{His}$ pour chaque complexes des deux orientations α (■) et ϵ (▲) : A: capryloyl-CALB ; B: lauroyl-CALB ; C: palmitoyl-CALB ; D : oleoyl-CALB

Pour conclure sur cette étude de l'impact de la chaîne acyle sur la réaction d'acylation de la lysine, les informations recueillies au niveau des modèles suggèrent que, quelle que soit la chaîne acyle, l'orientation de la lysine a un faible impact sur la conformation du site actif, excepté au niveau du résidu His224. En effet, lorsque la lysine est orientée en α , la chaîne latérale de l'His224 a tendance à effectuer une rotation, l'éloignant de sa conformation initiale. Ce phénomène est particulièrement marqué dans le cas des chaînes acyles courtes. Les modèles suggèrent une sélectivité favorisant l'acylation de la fonction amine ϵ de la lysine ainsi qu'une efficacité réactionnelle supérieure dans le cas des chaînes acyle longues.

Les résultats expérimentaux relatifs à cette étude sont présentés dans le chapitre suivant.

5. Conclusions du chapitre

Cette étude de l'acylation de la lysine à l'échelle moléculaire a permis de développer une méthodologie destinée à améliorer notre compréhension des causes de l'efficacité et de la sélectivité réactionnelle. Cette approche est prometteuse pour prédire les performances d'une réaction et guider le choix de substrats d'intérêt. Cette méthodologie est constituée dans un premier temps de simulations de docking flexible (Koska et al., 2008), permettant d'explorer l'espace conformationnel du ligand et des chaînes latérales de résidus appartenant à la cavité catalytique. Le respect de distances impliquées dans le mécanisme catalytique est apparu comme un critère nécessaire mais insuffisant pour conclure sur la faisabilité et la sélectivité de la réaction. La robustesse des modèles a pu être améliorée en intégrant des calculs d'énergie d'interaction électrostatique. Notamment, les énergies d'interaction électrostatique au niveau des résidus catalytiques Ser105 et His224 ont permis de discriminer les complexes enzyme/substrats « productifs » et les complexes « non productifs » et de conclure à la fois sur la faisabilité de l'acylation et sur la sélectivité de la réaction. L'application de cette méthodologie à l'acylation de la lysine par l'acide laurique a suggéré l'acylation sélective de la fonction amine ϵ de la lysine, ce qui a pu être vérifié expérimentalement..

Dans un second temps, les causes de cette sélectivité ont été recherchées. Pour cela, les modèles ont été analysés selon différents critères comme le maintien de la conformation de la triade catalytique en présence du ligand ou encore la mobilité des résidus de la cavité catalytique. Une observation importante concerne le résidu catalytique His224 dont la chaîne latérale effectue un mouvement de rotation l'éloignant de sa position initiale. Ce phénomène est observé le plus souvent lorsque la lysine adopte l'orientation α ; il semble s'atténuer à mesure que la chaîne acyle s'allonge. En outre, le calcul de l'énergie d'interaction électrostatique au sein des complexes a permis de mettre en évidence l'implication de certains résidus dans le positionnement de la lysine vis-à-vis du site catalytique. Ainsi l'Asp134 a été identifié comme un résidu important pour le bon positionnement du substrat accepteur d'acyle tandis que les résidus Gln157, Ser153 et Asp145 situés à l'opposé de la triade catalytique semblent détourner la lysine.

En complément de cette étude, l'impact de la nature du donneur d'acyle sur l'acylation de la lysine a été étudié. Ce travail a confirmé la mobilité de la chaîne latérale de l'His224, phénomène particulièrement marqué dans le cas de l'orientation α de la lysine. L'analyse des distances d'intérêt au sein des complexes a permis de suggérer une sélectivité favorisant

l'acylation de la fonction amine ϵ de la lysine ainsi qu'une efficacité réactionnelle plus importante avec l'acide oléique, comparativement aux autres donneurs d'acyle.

Chapitre 4 : Étude de l'acylation à l'échelle réactionnelle

1. Introduction

Lors des réactions d'acylation enzymatique de nombreux paramètres sont mis en jeu : la nature du substrat, du milieu réactionnel, du biocatalyseur ou encore les conditions opératoires telles que la température, le pH. Ce chapitre va donc concerner l'étude de l'acylation de biomolécules par voie enzymatique à l'échelle réactionnelle.

Une première étude présentée sous la forme d'une publication soumise au journal « Engineering in Life Sciences » porte sur la recherche de nouveaux biocatalyseurs de type aminoacylases. Les biocatalyseurs ont par la suite été comparés à CALB qui est le biocatalyseur commercial le plus utilisé pour la catalyse de la réaction d'acylation. Il s'agit donc ici d'étudier des couples enzyme-milieu choisis, afin de comparer leurs performances, leurs sélectivités... Puis, dans une seconde partie, nous étudierons l'impact de la nature des substrats donneurs et accepteurs d'acyle sur la sélectivité et les performances réactionnelles.

2. Recherche de biocatalyseurs originaux pour l'acylation d'acides aminés et de peptides

Les enzymes hydrolytiques, et principalement les lipases, sont les plus largement utilisées pour catalyser ces réactions d'acylation. Néanmoins, leur mise en œuvre implique l'utilisation de milieux non aqueux comme milieu réactionnel. Cela limite l'acylation de molécules polaires telles que les acides aminés ou les peptides. Une alternative aux lipases est l'utilisation d'acylases. Ces enzymes ont été décrites comme capables de catalyser l'acylation d'acides aminés ou de peptides avec des acides gras en milieu aqueux. Ces enzymes sont produites par divers micro-organismes, y compris par les bactéries filamenteuses du genre *Streptomyces*. En effet, la présence de plusieurs aminoacylases a déjà été mise en évidence dans des surnageants de culture de *Streptomyces mobaraensis* (Koreishi et al., 2005 (a), 2005 (b), 2006, 2007, 2009 (a), 2009 (b); Zhang et al., 2007). En dehors de ces études, la N-acylation enzymatique d'acides aminés ou de peptides en milieu aqueux est absente de la littérature.

Le présent travail a donc consisté à identifier et caractériser des activités aminoacylases dans un extrait brut de *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877 ainsi qu'une comparaison de

séquences génétiques afin d'identifier dans le génome de *S. ambofaciens* les gènes susceptibles de coder pour ces aminoacylases. Une étude comparative de la régiosélectivité de l'extrait brut de *S. ambofaciens* ATCC23877 et de la lipase B de *Candida antarctica* (CALB) a également été réalisée dans le cas de l'acylation de la lysine et de différents peptides contenant de la lysine.

Les résultats de cette étude sont présentés sous la forme d'une publication soumise au journal *Engineering in Life Sciences*.

Acylation of lysine on α -position and peptides on N-terminal position by aminoacylase activities from *Streptomyces ambofaciens*

Léna Dettori ¹, Florent Ferrari ¹, Xavier Framboisier ¹, Cédric Paris ³, Yann Guiavarc'h ¹, Laurence Hôtel ², Arnaud Aymes ¹, Pierre Leblond ², Catherine Humeau ¹, Romain Kapel ¹, Isabelle Chevalot ¹, Bertrand Aigle ², Stéphane Delaunay ^{1,*}

¹ Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, CNRS UMR-7274, Université de Lorraine, 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602, 54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France,

² Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne, UMR UL-INRA 1128, Université de Lorraine, Campus Aiguillettes, BP239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France,

³ Plateau d'Analyse Structurale et Métabolomique, 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

Correspondence:

Prof. Stéphane DELAUNAY (stephane.delaunay@univ-lorraine.fr) Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, CNRS, Université de Lorraine, Box: 54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France, phone number: 33 3 72 74 39 63.

Prof. Bertrand AIGLE (bertrand.aigle@univ-lorraine.fr) Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne, Université de Lorraine, Box: 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, phone number: 33 3 72 74 51 41.

Keywords : acylation; aminoacylase; enzymatic synthesis; N- α -oleoyl-lysine; *Streptomyces ambofaciens*

2.1. Practical application

The potential of aminoacylase activities from *Streptomyces ambofaciens*, for the acylation of amino acids and peptides, was investigated. At least one enzyme of a crude extract from *S. ambofaciens* (probably the product of *SAM23877_1734* gene) was able to catalyze the acylation of lysine on the amine group of the ϵ -carbon but also of the α -carbon in a buffered medium. Interestingly, the crude extract from *S. ambofaciens* also catalyzed the acylation of two peptides on their N-terminal position. Such an original and interesting enzyme activity could constitute an alternative to chemical acylation of amino-acids and peptides. It could allow the development of enzymatic processes for the acylation of a wide variety of amino-acids (in α position) and peptides (in N-terminal position) in an environmentally friendly medium.

2.2. Abstract

The presence of aminoacylase activities was investigated in a crude extract of *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877. First activities catalyzing the hydrolysis of N- α or ϵ -acetyl-L-lysine were identified. Furthermore, the acylation of lysine and different peptides was studied and compared with results obtained with lipase B of *Candida antarctica* (CALB). Different regioselectivities were demonstrated for the two classes of enzymes. CALB was able to catalyze acylation only on the ϵ -position whereas the crude extract from *S. ambofaciens* possessed the rare ability to catalyze the N-acylation on the α -position of the lysine or of the amino-acid in N-terminal position of peptides. Two genes, *SAM23877_1485* and *SAM23877_1734*, were identified in the genome of *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 by comparison with the previously identified sequences of aminoacylases from *Streptomyces mobaraensis*. The products of these two genes were responsible for major aminoacylase hydrolytic activity. Furthermore, it was demonstrated that the hydrolysis of N- α -acetyl-L-lysine could be attributed to the product of *SAM23877_1734* gene.

2.3. Introduction

Through their emulsifying, antimicrobial or surfactant activities, N-(long/short)-chain-fatty-acyl-L-amino acids or peptides are of great interest and are suitable for cosmetic, pharmaceuticals or food industries (Koreishi et al., 2005b; Wada et al., 2002). N-acylated

amino acids or peptides are currently chemically produced using mainly fatty acid chlorides as acyl donors. This chemical pathway called Schotten Baumann has been already described for the acylation of amino acids and protein hydrolysates (George et al., 1998; Rondel et al., 2009). Unfortunately, this chemical process has the disadvantage of producing by-products like salt, which has to be removed in order to obtain valuable final products (Wada et al., 2002). This process could be advantageously replaced by an enzymatic process. Lipases are the most currently used enzymes to synthesize bioactive molecules, but their use involves the utilization of organic solvent as reaction medium. This limits the acylation of polar molecules such as amino acids or peptides (Soo et al., 2004). Studies reported the use of neoteric media such as ionic liquids, allowing the improvement of the solubility of peptides such as Lys-Ser in [Bmim]⁺[PF6]⁻ in comparison with 2-methyl-2-butanol and of the reaction performances (Husson et al., 2009). However, depending on the peptide, the solubility can be still low and the viscosity of ionic liquids can lead to mass transfer limitations husson (Husson et al., 2011). An alternative to lipases is the use of acylases. These enzymes are able to catalyze the acylation of amino acids or peptides with fatty acids in aqueous media (Koreishi et al., 2009a, 2009b, 2007, 2006, 2005a, 2005b). These enzymes are produced by various microorganisms including the filamentous bacteria from *Streptomyces* genus. Four acylases able to catalyze the N-acylation of amino acids have been previously identified from *Streptomyces mobaraensis*. The first one is Sm-AA, a monomer of 55 kDa belonging to the peptidase M20 family. This enzyme has an optimal pH from 7 to 8 and an optimal temperature of 50°C. Sm-AA has the ability to hydrolyze amino acids acylated with long or short fatty chains (C₂ to C₁₆) (Koreishi et al., 2009b). The second enzyme is Sm-eLA (55 kDa monomer) which has been identified as a ε-lysine-acylase (Nε-acyl-L-lysine amidohydrolase). Sm-eLA presents an optimal pH at 8 and is stable at temperatures up to 50°C for 1h at pH 8. This enzyme efficiently catalyzes the N-acylation of the lysine side chain with fatty acids or aromatic compounds as acyl donors in an aqueous buffer. The reaction yield can reach 90% or even higher values using 10 mM of fatty acid and 0.5 M of L-lysine (Koreishi et al., 2005b). The third acylase is Sm-PVA (61kDa, 19kDa dimer) which belongs to the penicillin V acylase family. It has an optimal pH of 8 and is stable at temperatures up to 55°C. It efficiently catalyzes the synthesis of β-lactam antibiotics, capsaicin derivatives; N-lauroyl-acyl-amino acid and N-fatty-acyl-peptide derivatives. This enzyme was also shown to catalyze the acylation of lysine-containing dipeptides, only on the side chain of lysine, with lauric acid as acyl donor (Koreishi et al., 2006). The last enzyme (short-chain-acyl aminoacylase) is a metallo-enzyme (100 kDa monomer) which is stable at temperatures up to 60°C for 1h at pH 7.2. It

catalyzes the hydrolysis of the amide bonds in various N- α -acylated-L-amino acids except the N-acetyl-L-proline. This acylase also catalyzes the deacylation of 7-aminocephalosporanic acid and cephalosporin C (Koreishi et al., 2005a). Contrary to the three previous enzymes, the gene encoding this aminoacylase has not been identified in *S. mobaraensis* genome. Another acylase, FR901379 acylase which is able to deacylate a precursor of micafungin, used in the treatment of *candida emia*, has also been found in the culture broth of *Streptomyces* sp. no. 6907 (FERM BP-5809) (Ueda et al., 2011).

These studies suggested that the *Streptomyces* genus might be an interesting bacterial source of original aminoacylases. For this reason, the presence of such enzymes in another species of *Streptomyces*, *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877 whose genome sequence is available (Thibessard et al., 2015), has been investigated.

Both hydrolytic and synthetic activities of these enzymes were studied. More particularly, abilities of *S. ambofaciens* extracts to catalyse the acylation of aminoacids and peptides was compared to that of lipase B from *Candida antarctica* (CALB).

2.4. Materials and methods

2.4.1. Bacterial strains and plasmids

Bacterial strains, plasmids and Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) used in this study were listed in Table 4.1. *Streptomyces* strains were manipulated as previously described (Bunet et al., 2014; kieser et al., 2000). *Escherichia coli* strains were cultivated in LB medium (Sambrook et al., 1989). Antibiotics were added to the cultures when appropriate.

2.4.2. DNA manipulation

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

Table 4.1: List of strains, plasmids and BACs used in this work.

Strains, BACs or plasmids	Principal characteristics ^a	Source or Reference
<i>S. ambofaciens</i> ATCC23877	Wild-type (WT)	(Pinnert-Sindico, 1954)
<i>S. ambofaciens</i> Δ SAM23877_1734:: <i>scar</i>	The <i>SAM23877_1734</i> gene in-frame-deleted	This work
<i>S. ambofaciens</i> Δ SAM23877_1734:: <i>scar</i>	The <i>SAM23877_1734</i> gene in-frame-deleted	This work
<i>S. ambofaciens</i> Δ SAM23877_1485:: <i>scarΔSAM23877_1734::<i>scar</i></i>	The <i>SAM23877_1485</i> and <i>SAM23877_11734</i> genes in-frame-deleted	This work
<i>S. ambofaciens</i> Δ SAM23877_1485:: <i>scarΔSAM23877_1734::<i>scarΔSAM23877_0977::<i>scarΔSAM23877_6191::<i>scar</i></i></i></i>	The four acylase encoding genes of <i>S. ambofaciens</i> are in-frame-deleted	This work
<i>E. coli</i> DH5 α	General cloning strain and strain used in bioassays	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	Non-methylating strain with mobilization plasmid for conjugation with <i>Streptomyces</i>	(Macneil et al., 1992), 2000)
<i>E. coli</i> BW25113/pKD20	Strain used for the PCR-targeting mutagenesis (<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> , <i>bla</i>)	(Datsenko and Wanner)
BAB8ZA11, BAA10ZD3, BAA12ZH2, BAB3ZC8	BACs from the genomic library of <i>S. ambofaciens</i> (<i>cat</i>) carrying acylase gene	(Choulet et al., 2006)
BAB8ZA11:: <i>neo</i> / Δ SAM23877_1485:: <i>aac(3)IV</i> + <i>oriT</i>	<i>SAM23877_1485</i> replaced by an apramycin cassette and the <i>cat</i> gene by the <i>neo</i> gene	This work
BAA10ZD3:: <i>neo</i> / Δ SAM23877_1734:: <i>aac(3)IV</i> + <i>oriT</i>	<i>SAM23877_1734</i> replaced by an apramycin cassette and the <i>cat</i> gene by the <i>neo</i> gene	This work
BAB3ZC8:: <i>neo</i> / Δ SAM23877_0977:: <i>aac(3)IV</i> + <i>oriT</i>	<i>SAM23877_0977</i> replaced by an apramycin cassette and the <i>cat</i> gene by the <i>neo</i> gene	This work
BAA12ZH2:: <i>neo</i> / Δ SAM23877_6191:: <i>aac(3)IV</i> + <i>oriT</i>	<i>SAM23877_6191</i> replaced by an apramycin cassette and the <i>cat</i> gene by the <i>neo</i> gene	This work
pIJ773	<i>oriT</i> , <i>aac(3)IV</i>	(Gust et al., 2003)
pPSM88T	pOSV503 derivative containing <i>oriT</i>	(Raynal et al., 2006) ; A. Thibessard, pers. com.
pOSK1111	Conjugative plasmid with the <i>xis</i> and <i>int</i> genes of pSAM2	(Raynal et al., 2006)
pUWLFLP	Conjugative plasmid with the synthetic <i>flp(a)</i> gene	(Fedoryshyn et al., 2008)

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

2.4.3. In-frame deletion of genes encoding acylase in *S. ambofaciens*

The REDIRECT system (Gust et al., 2003) was used to make an in-frame deletion of the four genes encoding acylase in *S. ambofaciens* ATCC 23877, SAM23877_1485, SAM23877_0977, SAM23877_1734 and SAM23877_6191, as described in previous works for other genes (Bunet et al., 2008; Pang et al., 2004). The aac(3)-IV-oriT mutagenesis cassette used for gene replacement was synthesized by PCR using pSPM88T (for the three first genes; A. Thibessard, personal communication; (Raynal et al., 2006)) or pIJ773 (for SAM23877_6191; (Gust et al., 2003)) as templates and the primer pairs described in **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** *E. coli* BW251113/pKD20 (Datsenko and Wanner, 2000)) was first transformed with the BAC containing the acylase gene of interest, and then with the PCR product (aac(3)-IV-oriT mutagenesis cassette) to replace the targeted gene by homologous recombination. The chloramphenicol resistance gene of the vector pBelo-BAC11 was replaced by a kanamycin resistance gene, using the same strategy. *E. coli* ET12567/pUZ8002 was transformed with the mutated BACs for conjugation with *S. ambofaciens* ATCC23877. Gene replacements were confirmed by PCR analysis using primer sets flanking the targeted genes and/or Southern blot analyses. To get in frame deleted mutants, the cassette was removed using the excisionase and integrase of pSAM2 as described in (Raynal et al., 2006), except for SAM23877_6191, for which the cassette was removed using the synthetic gene encoding the Flp recombinase optimized for expression in high-GC bacteria (Raynal et al., 2006). Only the start and stop codons of the genes remained after deletion. All primers used to confirm the gene deletion are described in Table 4.2. Single mutants were obtained for SAM23877_1485 and SAM23877_1734. A double mutant strain for these genes was obtained from the single mutant strain *S. ambofaciens* Δ SAM23877_1485::scar (Table 4.1) in which the SAM23877_1734 gene was replaced by the aac(3)-IV-oriT mutagenesis cassette. The cassette was then removed as described above. A quadruple mutant in which the four genes encoding acylase identified in the genome of *S. ambofaciens* was also constructed in this way (Table 4.1).

2.4.4. Media and culture conditions for aminoacylase production

All *S. ambofaciens* strains were stored as spore suspensions (10^7 to 10^8 Units Forming Colony.mL⁻¹) at -80°C. The first step of the culture protocol was a culture in the ICS medium. This medium consisted of sucrose 15 g.L⁻¹, corn steep 5 g.L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 10 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 1

g.L^{-1} , NaCl 3 g.L^{-1} , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g.L^{-1} and CaCO_3 0.2 g.L^{-1} . Medium pH was adjusted at 6.8 prior to sterilization at 121°C for 20 min. Fourty mL of this medium were inoculated with $100 \mu\text{L}$ of spore suspension. After 48 h culture, 2.5 mL of ICS medium were transferred in 25 mL of culture medium for the pre-culture step. The composition of this culture medium was: meat extract 40 g.L^{-1} , soluble starch 40 g.L^{-1} , casein hydrolysate 20 g.L^{-1} , MgSO_4 20 g.L^{-1} , and K_2HPO_4 2 g.L^{-1} (Koreishi et al., 2005b). The pH of the culture medium was set at 7 before sterilization at 121°C for 20 min. The preculture was performed for 48 h and then, 5 ml of this preculture were used to inoculate 95 ml of the same fresh culture medium for the main culture step. This last culture was maintained for 7 days as a maximum production of enzymes was identified at this time. All the cultures were carried out in baffled flasks, except the main one, at 250 rpm and 28°C . All the components of the culture media were purchased from Sigma-Aldrich, except sucrose and yeast extract, from Fluka, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (99%), NaCl , CaCO_3 and acetonitrile, from Carlo Erba.

Table 4.2: Oligonucleotide primers used in this work.

Primers	Nucleotide sequence (5'→3')
Gene replacement	
disrupt_sam1485_F	TGCCGGCCGGTCCGGCGAGGGCGAGACTGGTCCATGATCGCCGCCGCTTCGTTCCGGACCGAA
disrupt_sam1485_R	CCCGGGAGAAGATCATCGCCCGTGGCCGCCGAGATCAATCTGCCTCTTCGTCCCGAAGCAACT
disrupt_sam1734_F	AGCAGGGACACCAAGAGTACAGCGGGAGGAACCAACGATGATCGCCGCCGCTTCGTTCCGGACCGA
disrupt_sam1734_R	CTCGGGCGGTTCAAGGACCGCTGAATCTCGGGCGGTTCAATCTGCCTCTTCGTCCCGAAGCAACT
disrupt_sam0977_F	TCAGCCGCCCTTCCCAAAGACCGTCGGGAGGCAACGATGATCGCCGCCGCTTCGTTCCGGACCGAA
disrupt_sam0977_R	GCTCGGGCCGGGGTCCGGGACGGGGCCGGTCTCAATCTGCCTCTTCGTCCCGAAGCAACT
disrupt_sam6191_F	TCACCACGATCGCCTCCGCCCGCTGGAGGAGCAGTATGATCCGGGGATCCGTCGACC
disrupt_sam6191_R	TCGTTTCTGGGCCGTCCGCTCCGGGACCGTCCGCTATGTAAGCTGGAGCTGCTTC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGTCACCGCCCTAC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGTCACCGCCCTAC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGTCACCGCCCTAC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGTCACCGCCCTAC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGTCACCGCCCTAC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGTCACCGCCCTAC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGTCACCGCCCTAC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGTCACCGCCCTAC
verif_sam1485_F	TGGTGCTGTCACCGCCCTAC

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

2.4.5. Preparation of enzyme solution

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

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

Each collected fraction was concentrated using Amicon® ultra-15 centrifugal filter devices (molecular weight cutoff: 10K, Millipore). Fifteen mL of the protein solution were transferred into the device and centrifuged for 30 min at 5000 x g at room temperature. Protein concentrations were assayed according to the Bradford method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

2.4.6. Enzyme assays

The hydrolytic activity of aminoacylases was determined in each sample using N- α -acetyl-L-lysine or N- ϵ -acetyl-L-lysine as substrate. The enzymatic hydrolysis of N- α/ϵ -acetyl-L-lysine was carried out in test tubes. In a typical reaction, 0.2 mL of the substrate (40 mM) and 0.3 mL of enzymatic sample were added in 1.5 mL of Tris-HCl (25mM) NaCl (50 mM) at pH 8. The hydrolysis reaction was started by the addition of the enzyme sample. Reaction media were kept at 37°C and stirred at 250 rpm. Samples of 50 μ L were withdrawn for analyses. The

reaction was stopped after 24h by soaking in cold water and stored at -18°C before HPLC analysis. Each reaction was performed in triplicate.

The enzymatic acylation of lysine, Ser-Tyr-Lys (SYK) and Leu-Gln-Lys-Trp (LQKW) were carried out in test tubes. With *S. ambofaciens* crude extract as biocatalyst, the reaction medium consisted of the acyl-acceptor (0.12 M) and acyl-donor (0.24 M) in 2 mL of Tris-HCl (25 mM), NaCl (50 mM) at pH 8. Reaction media were stirred at 250 rpm and kept at 45°C . With CALB-catalyzed reactions, substrates were added in 2 mL of M_2B_2 previously dehydrated on 4 Å molecular sieves. The initial water activity of the medium was decreased below 0.1 to limit the hydrolytic activity of CALB. Triethylamine was added to the reaction media in a large excess (2.4 mol.L^{-1}) to favor the neutral form of amino groups. After solubilization of the substrates for 12 h at 55°C , the acylation was started by the addition of 10 g.L^{-1} of CALB. Reaction media were stirred at 250 rpm and kept at 55°C for CALB-catalyzed reactions. 50 μL samples were withdrawn over time for analyses. These samples were diluted with methanol/water (80/20, v/v) and stored at -18°C before LC-MS analysis. Each reaction was repeated at least twice. Novozym 435[®] (lipase B from *C. antarctica* immobilized on an acrylic resin) with propyl laurate synthesis activity of 7000 PLU g^{-1} and protein grade of 1–10% was from Novo Nordisk A/S. Lysine and oleic acid were purchased from Sigma-Aldrich, K, SYK and LQKW with 99% of purity were acquired from Bachem.

2.4.7. Analysis of the reaction media

Quantitative analysis of the lysine, produced in hydrolysis reaction, was performed by high-pressure liquid chromatography (HPLC). The separation of sample constituents was carried out according to the Shimadzu method[®] by derivatization of amino acids with the ortho-phthaldehyde (OPA) which, once excited with a wavelength of 350 nm, emits fluorescence to 460 nm. In hydrolytic reactions, the production of lysine of each reaction was monitored using HPLC (LC 20 AD – VP, Shimadzu, France) equipped with a fluorescence detector (RF-10A): excitation wavelength: 350 nm, emission wavelength: 460 nm. The column used was a C18 ($150 \times 4.6 \text{ mm} - 5 \mu\text{m}$, Apollo, France) maintained at 45°C . The elution was performed using a gradient fed at a constant flow rate of 1.0 mL.min^{-1} as following: 95 % reagent A and 5 % reagent B for 1 min., 95-0 % reagent A and 5-100 % reagent B for 9 min., 100 % buffer B for 5 min., 100-0 % reagent B for 1 min. The column was then washed with acetonitrile (80

%) for 5 min. The column temperature was controlled at 45°C. Mobile phases consisted of NaH₂PO₄ 0,78 g.L⁻¹, Na₂HPO₄ 1.79 g.L⁻¹ for A phase and 600 mL of A phase added at 300 mL of acetonitrile for B phase.

Qualitative and semi quantitative analysis of aminoacid and peptide acylated derivatives were carried out on a HPLC–MS system (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) consisting in a binary delivery pump connected to a photodiode array detector (PDA) and a LTQ ion trap as mass analyzer (Linear Trap Quadrupole) equipped with an atmospheric pressure ionization interface operating in positive electrospray mode (ESI⁺). Chromatographic separation was performed on a C18 amide column (150 mm × 2.1 mm, 5 µm porosity – Grace/Alltech, Darmstadt, Germany) equipped with a C18 amide pre-column (7.5 mm × 2.1 mm, 5 µm porosity – Grace/Alltech Darmstadt, Germany) at 25°C. Mobile phases consisted of methanol/water/TFA (80:20:0.1, v/v/v) for A and methanol/TFA (100:0.1, v/v) for B. Acylated peptides were eluted using a linear gradient from 0% to 100% of B for 5 min and then an isocratic step at 100% of B for 10 min, at a flow rate of 0.2 mL min⁻¹. Mass spectrometric conditions were as follows: spray voltage was set at +4.5kV; source gases were set for sheath gas, auxiliary gas and sweep gas at 30, 10 and 10, respectively (in arbitrary units min⁻¹); capillary temperature was set at 250°C; capillary voltage was set at 48 V; tube lens, split lens and front lens voltages were set at 120 V, -34 V and -4.25 V, respectively. Ion optic parameters were optimized by automatic tuning using a standard solution of oleoyl SYK at 0.1 g.L⁻¹ infused in mobile phase (A/B, 50:50) at a flow rate of 5 µL.min⁻¹. Full scan MS spectra were performed from 100 to 1000 m/z and additional MS² scans were realized in order to get structural information based on daughter ions elucidation. Raw data were processed using Xcalibur software (version 2.1 Thermo Scientific).

2.5. Results and discussion

2.5.1. Research for an aminoacylase activity in a crude extract of *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877

Aminoacylase activities and regio-selectivity were studied according to the Koreishi method (Koreishi et al., 2005b, 2005a, 2009a) performing hydrolytic reactions using both N- α - and N- ϵ -acetyl-L-lysine as substrates. Hydrolytic reactions were followed by the analysis of the lysine release. After 7 days of culture, the crude extract from the culture of *S. ambofaciens*

ATCC23877 presented an aminoacylase activity which catalyzed the hydrolysis of amide bond in both N- α and N- ϵ -acetyl-L-lysine. A specific hydrolytic activity of 0.13 mmol_{lys}.h⁻¹.g protein⁻¹ was observed with N- α -acetyl-L-lysine, and 0.11 mmol_{lys}.h⁻¹.g protein⁻¹ with N- ϵ -acetyl-L-lysine. Similar hydrolytic activities were previously identified in *S. mobaraensis* crude extract (Koreishi et al., 2005a). The hydrolysis of the amide bond of N- α -acetyl-L-lysine was assigned to both a short-chain-acyl aminoacylase (Koreishi et al., 2005a) and ϵ -lysine acylase (Sm-eLA) (Koreishi et al., 2009a) whereas the hydrolysis of the amide bond of N- ϵ -acetyl-L-lysine was only catalyzed by Sm-eLA (Koreishi et al., 2009a).

Aminoacylase synthetic activities of *S. ambofaciens* crude extract regarding the acylation of lysine by oleic acid was investigated. The regio-selectivity of the reaction catalyzed by *S. ambofaciens* crude extract was compared to that obtained with the commonly used CALB (Husson et al., 2009, 2011; Izumi et al., 1997). A mass spectrometry based method has previously been developed and validated to determine enzyme regio-selectivity from fragments provided by LC-MS-MS (Ferrari et al., 2014; Husson et al., 2009). The acylation of lysine by oleic acid catalyzed by the *S. ambofaciens* crude extract led to the formation of one mono-acylated product with a molecular mass of 410 which was detected at a retention time of 7,84 min. The fragmentation of this pseudo molecular [M+H]⁺ parent ion (m/z = 411) led to one major daughter ion (m/z = 375) corresponding to [(Oleoyl-K) - 2H₂O + H]⁺, and two minor daughter ions (m/z = 147 and m/z = 348) corresponding to [(Oleoyl-K) + H]⁺ and [(Oleoyl-K) - H₂O - COOH + H]⁺, respectively (Figure 4.1.B). With CALB, a different mono-acylated product was detected at a retention time of 8,18mn. The same molecular mass was measured (MM = 410) but the MS² profile is different, presenting only one daughter ion (m/z = 348), corresponding to [(Oleoyl-K) - H₂O - COOH + H]⁺ (Figure 4.1.D). The comparison of this fragmentation profile with that of both standard molecules of α -oleoyl-lysine and ϵ -oleoyl-lysine confirmed that CALB preferentially catalyzes acylation on the ϵ amino group of lysine whereas *S. ambofaciens* crude extracts catalyze acylation on α position (Figure 4.1.A and C).

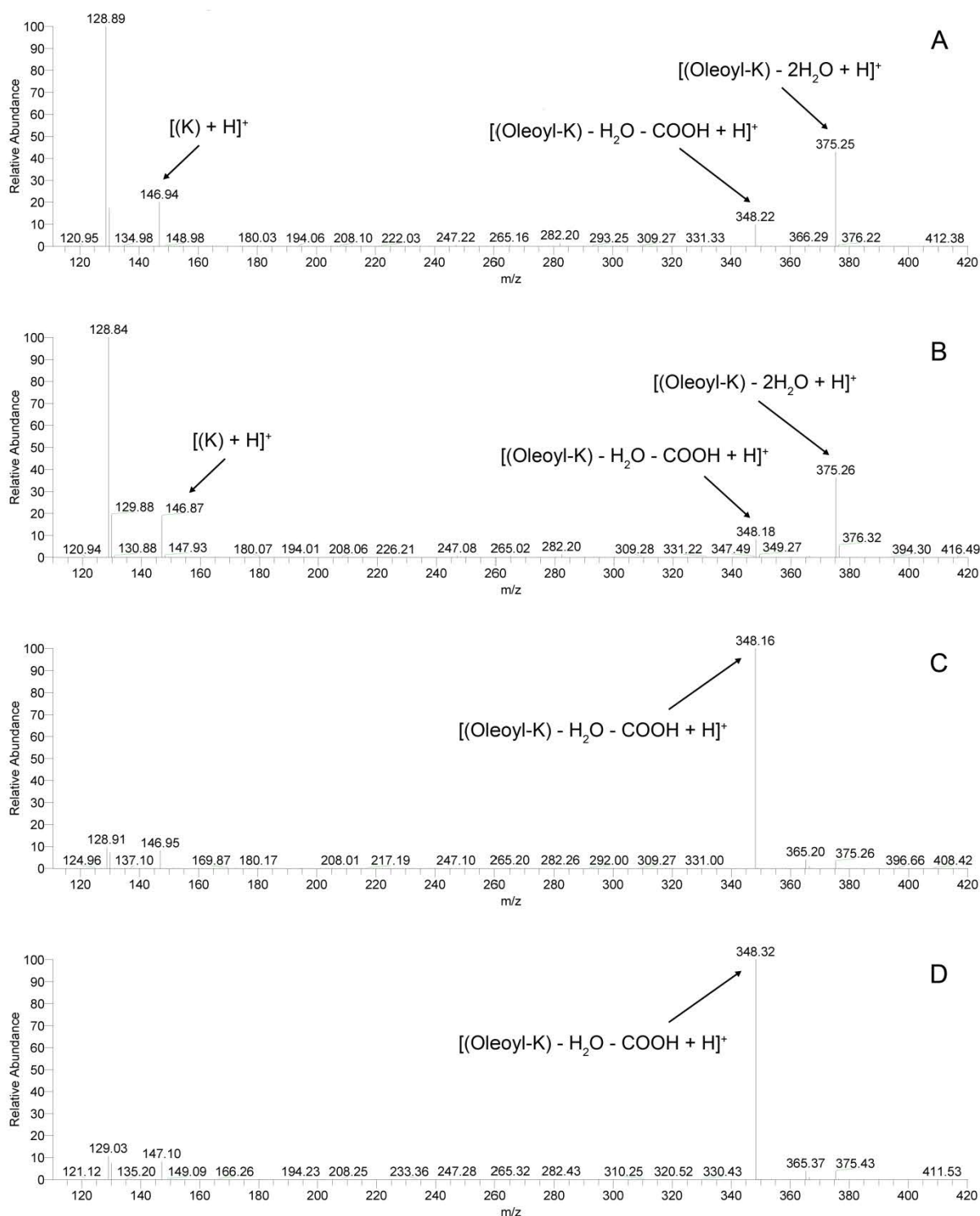


Figure 4.1: Mass analysis of oleoyl-lysine synthesized using either the crude extract of *S. ambofaciens* ATCC23877 (B) or CALB (D) and standards (A and C). A and C: MS² spectra obtained after fragmentation of ion parent (m/z=410) relative to the standards α -oleoyl-lysine and ϵ -oleoyl-lysine, respectively; B and D: MS² spectra of the products obtained after acylation reaction catalyzed by *S. ambofaciens* crude extract and CALB, respectively (ion parents m/z=410).

To confirm these enzymatic specificities, reactions were performed with two peptides including a lysine residue in their sequence, *i.e.* SYK and LQKW. SYK acylation with oleic acid catalyzed by *S. ambofaciens* crude extract led to the formation of one mono-acylated product characterized by a molecular mass of 660 and a retention time of 5.39 min. This was identified as a product acylated on the serine residue. Indeed, the MS² profile showed the presence of an oleoyl-serine fragment [(Oleoyl-SY)-H₂O+H⁺] (m/z = 515.10) and of YK peptidic fragments [(YK) – H₂O + H⁺] (m/z = 291,91) and [(YK) + H⁺] (m/z = 309.94). The same MS² profile was obtained by fragmenting the standard molecule N- α -oleoyl-SYK (Figure 4.2). In previous study, CALB was shown to catalyze SYK acylation mainly on the lysine side chain (Ferrari et al., 2014). These results suggested the selective N-acylation on α position for aminoacylases.

This trend was confirmed with the tetrapeptide LQKW which was acylated on the α -amino group of leucine by the crude extract of *S. ambofaciens* (Figure 4.3). Indeed, analyses of the product highlighted the formation of one mono-acylated molecule and the MS² profile showed the presence of the fragments [(KW) + H⁺] (m/z = 332.93), [(QKW) + H⁺] (m/z = 460.93), [(Oleoyl-LQ) + H⁺] (m/z = 505.86), and [(Oleoyl-LQK) + H⁺] (m/z = 633.97).

This specificity differs from the one of CALB as a previous study showed that CALB catalyzed LQKW acylation mainly on the lysine side chain (Ferrari et al., 2014). It has also to be noticed that no acylation of peptides on N-terminal position occurred with Sm-PVA from *S. mobaraensis*. This enzyme was shown to catalyze only the acylation of the lysine side chain whatever the position of this amino acid in a dipeptide (Koreishi et al., 2006).

Thus, the present study showed that the enzymes of the crude extract of *S. ambofaciens* ATCC23877 catalyzed the acylation of the amino group located in α position of lysine or of the amino-acid in the N-terminal position of a peptide such as SYK and LQKW whereas CALB and Sm-PVA led to the selective acylation of lysine in ϵ position whatever the peptidic sequence. This regio-selectivity is of great interest because aminoacylases from *S. ambofaciens* appear to be susceptible to catalyze the acylation of any peptides or amino acids, on their α -amino group, preserving the functional side chains that may be responsible for biological activities.

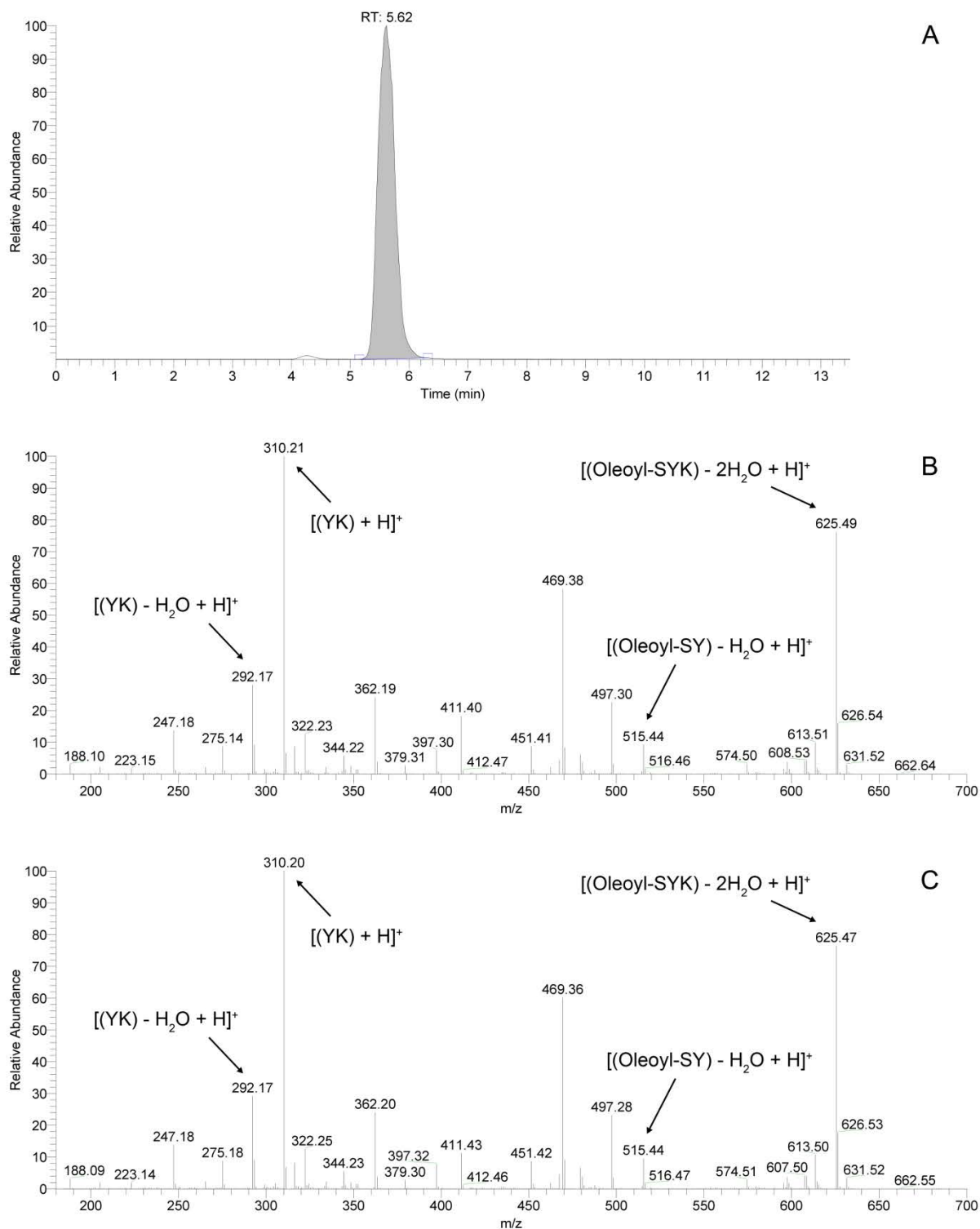


Figure 4.2: Mass analysis of oleoyl-SYK synthesized using the crude extract of *S. ambofaciens* ATCC23877. A: single ion chromatogram of the acylated product $[M+H]^+$ parent ion ($m/z=661$); B: MS^2 spectrum after fragmentation of the ion parent; C: MS^2 spectrum after fragmentation of the standard N- α -oleoyl-SYK.

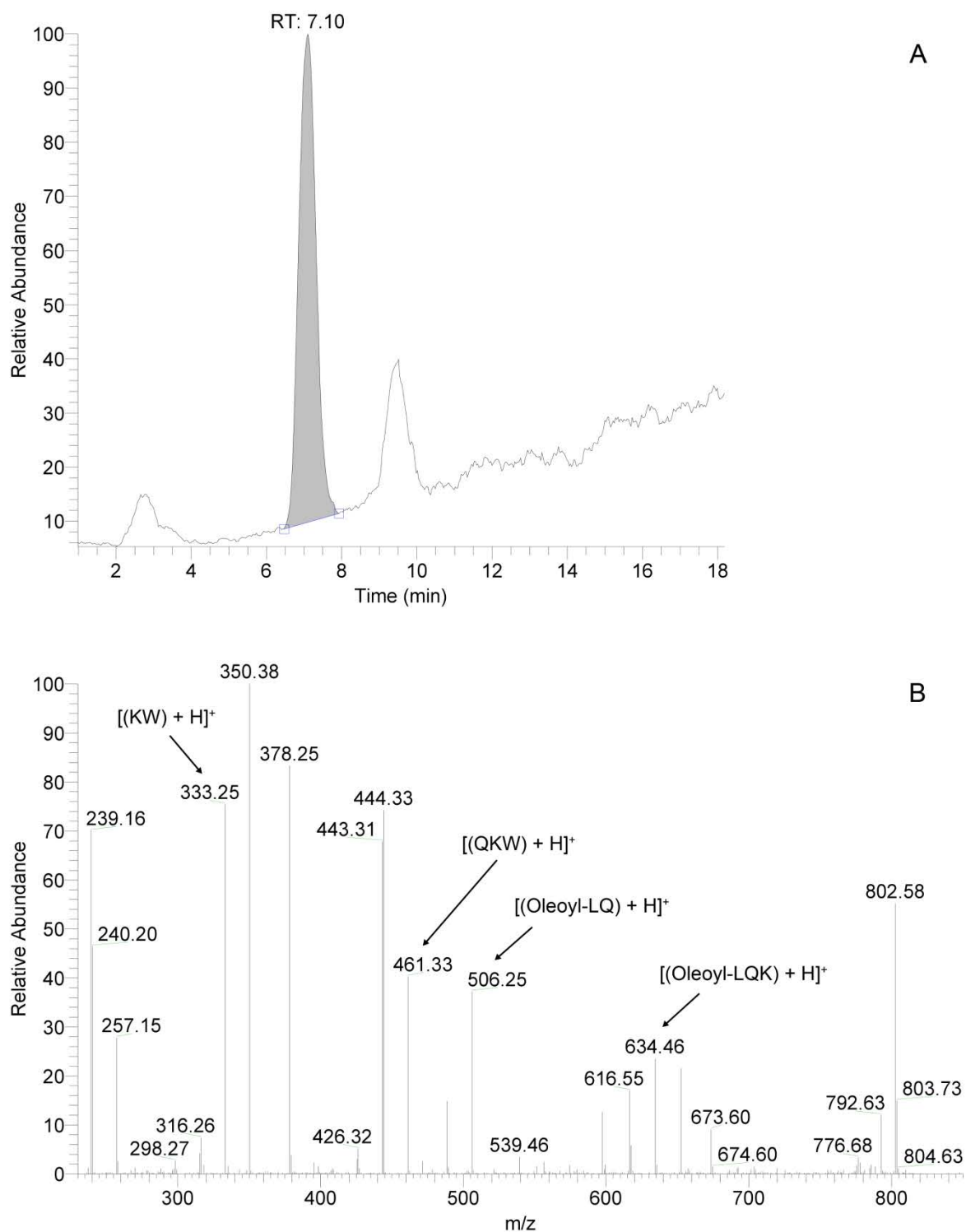


Figure 4.3: Mass analysis of oleoyl-LQKW synthesized using the crude extract of *S. ambofaciens* ATCC23877. A: single ion chromatogram [M+H]⁺ parent ion (m/z=703); B: MS² spectrum after fragmentation of the ion parent.

2.5.2. Partial purification of amino acylases from *S. ambofaciens* ATCC23877

Four different aminoacylases were identified or detected in *S. mobaraensis* extracts (Koreishi et al., 2005b, 2006, 2009b). To check the presence of several enzymes in *S. ambofaciens* ATCC23877, proteins from *S. ambofaciens* crude extracts were fractionated by ionic low pressure chromatography on a Q Sepharose column. The determination of aminoacylase activity in each fraction showed that α -aminoacylase activity could be separated from ϵ -aminoacylase activity (Table 4.3). The α -aminoacylase activity was mainly measured in fractions 5 and 6 (respectively 2.9 and 1.8 mmol_{lys}.h⁻¹.g protein⁻¹) whereas the ϵ -aminoacylase activity was found in the fractions 3 and 4 (respectively 0.49 and 0.45 mmol_{lys}.h⁻¹.g protein⁻¹). This result suggested that several aminoacylases might be synthesized by *S. ambofaciens* ATCC23877.

Two aminoacylases from *S. mobaraensis* are known to catalyze the hydrolysis of N- α/ϵ -acetyl-L-lysine. The *S. mobaraensis* short-chain-acyl aminoacylase catalyzes mainly the hydrolysis of N- α -acetyl-L-lysine with a specific activity of 41 units.mg⁻¹ and Sm-eLA is characterized by a specific activity of 3370 units.mg⁻¹ for the hydrolysis of N- ϵ -acetyl-L-lysine (1 units = the amount of enzyme required to hydrolyze 1 μ mol of substrate in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 in 1h at 37°C). Sm-eLA has been biochemically and genetically characterized. To date, the gene coding the short-chain-acyl aminoacylase has not been identified. However, two other acylases, the N-(short/long)-chain-fatty-acyl-L-amino acids acylase (Sm-AA) and the penicillin V acylase (Sm-PVA), have been described in *S. mobaraensis* and their respective genes have been identified.

Table 4.3: Hydrolytic activity towards N- α / ϵ -acetyl-L-lysine in each collected fraction during low-pressure ion exchange liquid chromatography .

Fraction number	Specific activity (mmol _{lys} .h ⁻¹ .g _{protein} ⁻¹)	
	N- α -acetyl-L-lysine	N- ϵ -acetyl-L-lysine
0	0.1	0.27
1	0.07	0.04
2	0.03	+
3	0.05	0.49
4	0.06	0.45
5	2.9	0.13
6	1.8	0.09
7	0.9	0.1
8	0.3	0.18
9	0.09	+

+: presence of an enzyme activity, which was not quantifiable

2.5.3. Analysis of the *S. ambofaciens* ATCC23877 genes encoding acylase

The genome of *S. ambofaciens* ATCC23877 has been sequenced (Thibessard et al., 2015). Therefore, the genes potentially encoding acylases have been searched using tblastn and the products of the *S. mobaraensis* genes as "baits". As mentioned above, three acylases have been identified and characterized in *S. mobaraensis*, Sm-PVA, Sm-AA and Sm-eLA (accession numbers: BAF51977, BAI44523.1 and BAH59036, respectively).

The tblastn analysis revealed that the genome of *S. ambofaciens* ATCC23877 contains three genes encoding acylases which share high level of identity and similarity with the *S. mobaraensis* enzymes (Supplemental Figure 1). Thus, the product of SAM23877_1734 showed 86% identity (93% similarity) with Sm-AA while the protein SAM23877_1485

shared 80% identity (85% similarity) with Sm-eLA. The third identified acylase, SAM23877_0977, was homologous to Sm-PVA (69% identity / 77% similarity). Interestingly, another gene product of *S. ambofaciens* ATCC23877 (SAM23877_6191) has also homology with Sm-AA but with a lower level of identity/similarity (55%/68%, Supplemental Figure 1D) suggesting the presence of a fourth enzyme with a potential acylase activity. Like SAM23877_1734 and Sm-AA, this last protein belongs to the M20 Peptidase, carboxypeptidase yscS-like family (cd05675). One candidate product of this last gene could be a protein similar to the short-chain-acyl amino acylase detected but not characterized in *S. mobaraensis* (Koreishi et al., 2005a).

To correlate the acylase activities observed in the crude extract of the wild-type strain *S. ambofaciens* ATCC23877 with the putative genes encoding acylase identified from the genome analysis, several deletion mutants were constructed. A quadruple mutant in which the four genes encoding acylase were in frame deleted (Δ SAM23877_1485::*scar* Δ SAM23877_1734::*scar* Δ SAM23877_0977::*scar* Δ SAM23877_6191::*scar* strain) as well as a double mutant, Δ SAM23877_1485::*scar* Δ SAM23877_1734::*scar*, have been constructed. In addition, SAM23877_1485 and SAM23877_1734 were in-frame deleted (see Materials and Methods) giving rise to the mutants Δ SAM23877_1485::*scar* and Δ SAM23877_1734::*scar* (Table 4.1).

The hydrolytic activity against N- α and N- ϵ -acetyl-L-lysine as substrates was determined in the crude extract from each mutant. As expected, no hydrolytic activity was found with the quadruple mutant. These results confirmed that this enzymatic activity was due to at least one of these four genes encoding acylase. We then analyzed the aminoacylase activity of the crude extract from the double mutant strain Δ SAM23877_1485::*scar* Δ SAM23877_1734::*scar*. The concomitant deletion of SAM23877_1485 and SAM23877_1734 resulted in a dramatic decrease in the hydrolytic activity against both α and ϵ acetyl-lysine. Indeed, the deletion of these two genes induced an 85% loss in the specific hydrolysis of N- α -acetyl-L-lysine (0.02 mmol_{lys}.h⁻¹.g_{protein}⁻¹ vs 0.13 mmol_{lys}.h⁻¹.g_{protein}⁻¹) and a 75% reduction of N- ϵ -acetyl-L-lysine hydrolysis (0.03 mmol_{lys}.h⁻¹.g_{protein}⁻¹ vs 0.11 mmol_{lys}.h⁻¹.g_{protein}⁻¹). From these results, it can be concluded that the aminoacylase activities are in large part due to the products of the genes SAM23877_1485 and SAM23877_1734. Consequently, the activities of the products of these two genes were further characterized.

2.5.4. Partial purification and research for a SAM23877_1485 and SAM23877_1734 specific activity

Two single mutant strains deleted either for *SAM23877_1485* or *SAM23877_1734* were analyzed for their aminoacylase activities to precise the enzyme activity related to each of these genes. Before the enzyme activity determination, a separation of the proteins from the crude extract was performed by ionic low pressure chromatography following the same protocol as with the wild-type strain. The enzyme activity was then assayed in each collected fraction. The Table 4.4 highlighted the fractions in which the enzyme activity was significantly different compared to the wild type strain.

Concerning the hydrolysis of N- ϵ -acetyl-L-lysine, a similar enzyme activity was measured in fractions from crude extracts from *S. ambofaciens* ATCC23877 and from the Δ *SAM23877_1734::scar* mutant. On the contrary, a dramatic decrease in the enzyme activity was observed in the fractions collected from the Δ *SAM23877_1485::scar* mutant (Table 4.4). This result suggested that the product of the *SAM23877_1485* gene would be an aminoacylase catalyzing the specific hydrolysis of N- ϵ -acetyl-L-lysine.

Regarding hydrolysis of N- α -acetyl-L-lysine, although the enzyme activity was quite similar in the fractions from the wild-type strain and that from the Δ *SAM23877_1485::scar* mutant, a low activity was measured in the same fractions from a crude extract from the Δ *SAM23877_1734::scar* mutant. This result supported the hypothesis that *SAM23877_1734* would encode a second aminoacylase, different from the product of *SAM23877_1485* and specific for the hydrolysis of N- α -acetyl-L-lysine. This regio-specificity of the enzyme encoded by *SAM23877_1734* is surprising because the enzyme Sm-AA produced by *S. mobaraensis* was not able to catalyze N-acetyl-L-lysine hydrolysis (Koreishi et al., 2009b).

Table 4.4: Hydrolysis of N- α -acetyl-L-lysine or N- ϵ -acetyl-L-lysine in selected fractions resulting from the separation of the proteins of the crude extracts of the *S. ambofaciens* wild type strain and mutant strain.

Bacterial strain	Aminoacylase activity with N- ϵ -acetyl-L-lysine as substrate		Aminoacylase activity with N- α -acetyl-L-lysine as substrate	
	(mmol _{lys} .h ⁻¹ .g _{protein} ⁻¹)		(mmol _{lys} .h ⁻¹ .g _{protein} ⁻¹)	
	Fraction 3	Fraction 4	Fraction 5	Fraction 6
<i>S. ambofaciens</i> ATCC23877	0.49	0.45	2.9	1.8
Δ <i>SAM23877_1485::scar</i>	0.02	0.02	1.1	1.8
Δ <i>SAM23877_1734::scar</i>	0.68	0.54	0.04	0

To conclude, two aminoacylases catalyzing the hydrolysis of N-acetyl-L-lysine have been identified in *S. ambofaciens* ATCC23877. The first one, the product of *SAM23877_1734*, has the propensity to hydrolyse the α amide bond of N- α -acetyl-L-lysine, whereas the second one, encoded by *SAM23877_1485*, catalyzes mainly the hydrolysis of N- ϵ -acetyl-L-lysine. These two enzymes were the source of most of the hydrolytic activity of *S. ambofaciens* crude extract. However, a probable existence of other aminoacylases potentially able to catalyze the hydrolysis of N- α/ϵ -acetyl-L-lysine has been highlighted. These last enzymes could also be responsible for the interesting acylation activity that was determined with lysine, SYK or LQKW as acyl acceptors. Indeed, this original regiospecificity of these aminoacylases, different from that of lipases such as CALB, led to the N-acylation in amino group and then preserve the functional side chains of any amino acids or peptides. However, further characterization and use of these enzymes imply the heterologous production of each of the aminoacylases identified in *S. ambofaciens* and their purification. This would broaden the perspectives of enzymatic acylation of bioactive molecules with enzymes exhibiting original selectivity.

This work was supported by the “Structure Fédérative de Recherche Ecosystèmes Forestiers, Agroressources, Bioprocédés et Alimentation” of the University of Lorraine, the “Région Lorraine” and the European Union through the “Programme Opérationnel FEDER FSE Lorraine et Massif des Vosges 2014-2020”. The authors would like to thank Cécile Ritt, Julie Challant and Emilie Morel for their help in some of the manipulations.

Supplemental figure 1:

A

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
Sm-ELA  MSERPR---TTLRLNGVHSPADPFATAMVVEGCHTAVVSGEAGADSFDAGVDEVIDLGGALVTPAFTDAHVHTTATGALTGLDLSGAEITLGEALERV
SAM23877_1485 MSESTTPSTVLLRFGVHSPADPFATAMVVERGCVAVVSGEAGADSFDAGVDEVIDLGGALVTPAFTDAHVHTTATGALTGLDLSGAEITREAFATAVR

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
Sm-ELA  AFAAARPGDRVLLGHGWDAARWPEGRPPSRAELDAAADGRPLYLTRVDVHSAVVTTALLDLVENARDLRGFTPDGGLTDAAHHAVRSTAAAVTPAQRTF
SAM23877_1485 DFAAARPGDRVLLGHGWDAARWPEGRPPSRAELDAAADGRPLYLTRVDVHSAVVTTALLDLVEGACDR----ADGPLTAAHHAVRSTAAAVTPAQRTF

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
Sm-ELA  AQRALAAHVASLIGISVHECAGPEISGEDDLTGLLRLAEEFGPRVIGYWAEAFTSVNOQLAKITRELGAHGAAGDLFVDGSLGSHACLHEPYADAPGATG
SAM23877_1485 AQRALAAHVASLIGISVHECAGPEISGEDDLTGLLRLAEEFGPRVIGYWAEEQ-----DVDKARELGAHGAAGDLFVDGSLGSHACLHEPYADAPGAG

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
Sm-ELA  TAILDADVAAHVAACTEAGVQAGFHAIGDAAVTAVVIGVRAAAEKVGLDRVRAARHRVEHAEMLTPEHTAAAFASALTASVQPAFDAAWGGDGGYAAAR
SAM23877_1485 IAILDADVAAHVAACTEAGVQAGFHAIGDAAVTAVVIGVRAAAEKVGLDRVRAARHRVEHAEMLTPEHTAAAFALGLTASVQPAFDAAWGGDGGYAAAR

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
Sm-ELA  LGRERARTLNPYAAILRAGVPLAIGSDSPVTPLDPWGTVRAAAFHRTPEHRVSVRAAFTAHTRGGWRVGRDDAGVLVPGAPADYAVWRIGELVVQVPIA
SAM23877_1485 LCAGRARTLNPYAAILRAGVPLAIGSDSPVTPLDPWGTVRAAAFHRTPEHRVSVRAAFTAHTRGGWRVGRDDAGVLVPGAPADYAVWRIGELVVQVPIA

510     520     530     540
Sm-ELA  RVANWSTDPRSGTPGLEPILVFGGQLRRCVTRTVVAGRTVYAA---
SAM23877_1485 RVANWSTDPRSGTPGLEPILVFGGQLRRCVTRTVVAGRTVYVREPE
    
```

B

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
Sm-AA   MAVDPRRGPCATAPGGEPRGGVSAEHTTGAENEVVDICRDLIRIDTSNYGDHSGPGERAAAEVVAEKLAEVGLEPPIFESHPPGRASTVARIEGEDPSRF
SAM23877_1734 -----MSDSEGTARSVTEG-DEEVVDICRDLIRIDTSNYGDHSGPGERAAAEVVAEKLAEVGLEPPIFESHPPGRASTVARIEGEDPSRF

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
Sm-AA   ALLIHGHTDVPVPAADADWTHHPFAGEIADGCWGRGAVDMKMDAMTLAVVRDRIRGRKPPRDVLAFLADEEAGGTYGARVLDVDRKHPGLFEGVTEAIS
SAM23877_1734 ALLIHGHTDVPVPAADADWTHHPFAGEIADGCWGRGAVDMKMDAMTLAVVRDRIRGRKPPRDVLAFLADEEAGGTYGARVLDVDRKHPGLFEGVTEAIS

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
Sm-AA   EVGGFSFTVSEQRRLYLICTAEKGMHWMELTVAGTAGHGSMTINDNAITELCEAVGRIGRHOFPVRVTKITRAFLDELCDALGTELDPEMEEATLAKLGG
SAM23877_1734 EVGGFSFTVSEQRRLYLICTAEKGMHWMELTVAGTAGHGSMTINDNAITELCEAVARLGRHOFPVRVTKITRAFLDELCDALGTELDPEMEEATLAKLGG

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
Sm-AA   IAKTIGATLRNTAAPTMLGAGYKVNVIPEGATAHVDGRFLPGYEEEFADLDRILGPRVREDVHADKAVETGFDGDLVQAMQALRAEDPTAFVPEYML
SAM23877_1734 IAKTIGATLRNTAAPTQLGAGYKVNVIPEGATAHVDGRFLPGYEEEFADLDRILGPRVREDVHADKAVETGFDGDLVQAMQALVAEDPAKAFVPEYML

410     420     430     440     450     460
Sm-AA   SGGTDAKSFDDLGIKRGFGFAPLKLPPELDFAGMFHGVDERVEVVEGLTFGARVLDREIDEC
SAM23877_1734 SGGTDAKSFDDLGIKRGFGFAPLKLPPELDFAGMFHGVDERVEVVEGLTFGARVLDREIDAS
    
```


Chapitre 4 : Étude de l'acylation enzymatique à l'échelle réactionnelle

C

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
Sm-PVA      MGVILRFRHSRATLANGGVLLTGCALFAVAASD--AARCFRPSAIGLSAVIRYTEYGVPHILADYANLGPQDGRAQAADAVCTLADGPTVTRGERAR
SAM23877_0977 -----MRTILRLRVVAVALLTPATLLPGAADERSRGRHEPSSHGGLSAVIRYTEYGVPHILADYANLGPQDGRAQAADAVCTLADGPTVTRGERSR

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
Sm-PVA      YFGADRAFDHSFSEASTNLSSDLEFRGVDRAPTVENLLDRPAFEGPSRQANELMRGVAAGYNAWLRGHWITDPACRKGQVVRPVTADDVAVRGRGVALIVLG
SAM23877_0977 YFGADVSDLSLSAAATNLSSDLEFRGVDRSCTVERLLAEPARFGPSRQSEELMRGVAAGYNAWLRGNRITDPACRGAAVVRPVTSLDVAVRGRGVALIVLG

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
Sm-PVA      GQCALAFAITFARPPARTVGGGKAVADFAANRAYFAFRHDTGMSNAVAHSGAATANRRGLLLGNPHYPHWGRRRFWQSQQTIPGRTANSGASLLGSP
SAM23877_0977 GQGRAVLCITFARPPAGNAAAAAPGPDASAAARRARELFAADGADGMSNAVAHGGRTTADGRGLLLGNPHYPHWGRRRFWQSQQTIPGRDVAAGCSLLGSA

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
Sm-PVA      TVCIGHNANVAWSHTVATGVFNILVETKAPAFCDERSYLVLDGREREMTDEKVTVAWRGADGRLANVTRSCWVTRYGPVVTGLGDDLPLPWFPGSAYALADE
SAM23877_0977 TVSIGHNAVVAWSHTVATGVFNILHCLALDEAFETVYLVLDGREREMTDRSSTVFWR--DG--RQVTRSCWVTRYGPVVTSLGASLPLPWFATAYALNDF

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
Sm-PVA      NARQFRPFDSLLGKSHARDVRCVREALRRTQGLPWVNTVAADSAGHSILTQSQVLPRTDEVQRSCATALGRHTYHESGLAVLDGSRGACALGDRDRAIC
SAM23877_0977 NAANLRASDNLGFGARGTGDLVDSLRRTQGLPWVNTVAADSAGHSILTQSQVLPRTDELAGRCSLPLGRHTYHESGLAVLDGSRGACAFGRDRDAVQ

      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
Sm-PVA      PCVPGHSAMPTIWDAPYAENSNDSSAWLANADRPLTGVFRFGDITGERSRTRRGVGVEDVAAMNRGRLTVADIERQGFAGRAFTGDLAADAAAPACAKLF
SAM23877_0977 PGIPIGFARMPITISDAPYAENSNDSSAWLANADRPLTGVFRFGVGTGCRSMRTRGATIEDVAAMNRGRLTVADIERQGFADRVFAGDLAADAAAPACAKLF

      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
Sm-PVA      GGRATGPDGRFVDVSCACGVLARWDRRLTGTSGRGLLDFRFRALVRVVPDRLWRFVFFDPARFVTPNTLITAPFGVARALAAVAHLRSGCALDAAT
SAM23877_0977 GGAATDSKGGAVDVRACGVLARWDRITVDTSGRGLLDFRFRALVRVPSDRLWRFVFFSPALPVRTPHTLITAPFGFATALEDAVGETRAEDTPLDART

      710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
Sm-PVA      GEHQFVVRGKRIPIVHGGTELGAWNKVESRWDGSRGGYEVVSGHSYQAVGVDGGHCPVITARTLLTYSQSDPASRHSDDOTGLFSKGRMTRGRFCER
SAM23877_0977 GEHQFVVRGKRIPIVHGGTESLGVWNRHEPVWIFAGGGYEVVITGSSYQAVGVDGSRCPV--ARTLLTYSQSDPASRHHADQRLFSGRWVTSRFCER

      810
Sm-PVA      DIIASPLGRVVVRAQR
SAM23877_0977 DIRASFAIRVVVRER
    
```

D

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
Sm-AA      MAVDPRRPGCTAPCGEPRGGSVSAEHTTCAENEVVDICRILIRIDTSNYDHSGPCERAAAAYVPERLAEVGLTEPRIFESHFGRASTVARIETGEPDSRP
SAM23877_6191 -----MREOTG-----HTGAQALLDEVVRFTESELRIRIDTNRGGDCR-ERRAAEYAAARLAEAGVEFTLLERTEGRINNVARIETGTPDSAD

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
Sm-AA      ALIIVHGHIDVVPAAADRWTHHPFAGEIADGCIWGRGAVDMNMDAMTILAVVRDRMFRGRHFRDVVIAFLADEEAAGTYGARYIVDWHFGLFEGVTEAHS
SAM23877_6191 ALLIVHGHIDVVPAAADKSVHPFSGEIRDCVWGRGAVDMNMDAMTILAVVRDARRRGVFRDRDVIIFATADEEASAEEDGSGFLADHFAALFEGCTEGVS

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
Sm-AA      EVGGSFTVNEINRLYLIVETAQNGMFMMLTVEGTAGHGSMTINDNAITELCEAVGRIGRHOEFVRVDTVTRSPFDELSDALGTPLDPEDEMTLAKLGG
SAM23877_6191 ESGAFTHFDGAGROFPIAAGERCTGQLRLTARGRAGHGSKVNRENNAVTRIAAAVTRHGDHEWFLRLTPTVRAALTELAAVYCIESGLDVMALDLKLG

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
Sm-AA      IARIIIGADIRNTRAPTMICAGYKVNVI PGQATAHVDGRFLFCHEEELADLDRILGERVKREDWHADNALETGFGDGLVQAMQALRAEDFIARAVPYML
SAM23877_6191 AAKLVEATVRNSSNPTMIDAGYKVNVI PGSAVAQVDGRFLGHEDEERSTLDQLTGDDVQEFVHREVALQAPVDSPTYAGRAAVEEFAIEGHVVVPCM

      410     420     430     440     450     460
Sm-AA      SGGTDANSDELGIKCGGFAPLKLPEELDFAGNFHGVDERVPVDCITPGARVLDRFIDEC
SAM23877_6191 SGGTDANCRSRLGIKCGGFAPLKLPEGFDLQAFHGVDERVPEALHFGVRVLDRFIRTA
    
```

2.6. Contribution de l'article

Cette étude a permis de mettre en évidence la présence d'activité aminoacylases dans un extrait brut de *S. ambofaciens* ATCC23877 puis de réaliser une comparaison de spécificité avec la lipase B de CALB dans le cas de l'acylation de la lysine et de différents petits peptides. Ainsi, la capacité des aminoacylases produites par *S. ambofaciens* à catalyser l'acylation de la lysine et de peptides sur leur groupement amine en position N-terminale a pu être mise en évidence.

Dans un premier temps, l'activité de synthèse a été mise en évidence dans l'extrait brut en réalisant l'acylation de la lysine ainsi que les peptides SYK et LQKW avec l'acide oléique. Les résultats ont conduit à démontrer une régiosélectivité majoritairement orientée vers les groupements amines en position N-terminale à la différence de la régiosélectivité de CALB. Les aminoacylases présentes dans l'extrait brut de *S. ambofaciens* possèdent donc un potentiel très prometteur concernant la synthèse d'acides aminés/peptides acylés. En effet, en plus de leur aptitude à réaliser la réaction d'acylation en milieu aqueux, leur régio-sélectivité orientée vers les groupements N-terminaux est un atout très peu décrit à ce jour, qui permettrait d'envisager l'acylation de ces molécules sans modifier les chaînes latérales des acides aminés ou des peptides et donc de limiter ainsi le risque de la perte de leurs fonctionnalités.

La régiosélectivité a également été observée au travers de réactions d'hydrolyse de l' α - et de l' ϵ -acétyl-lysine, mises en œuvre comme méthodes rapides de criblage d'activité. Après la confirmation de la présence d'activités au sein de l'extrait brut, celui-ci a subi une étape de semi-purification. Les activités hydrolytiques ont été recherchées dans les différentes fractions obtenues. Les résultats ont indiqué la présence de plusieurs enzymes possédant des régiosélectivités différentes : l'une spécifique du groupement acétyle sur le groupement amine en position N-terminale et l'autre sur l'amine de la chaîne latérale de la lysine.

La comparaison des séquences génomiques de *S. ambofaciens* a été réalisée avec les gènes des aminoacylases précédemment découvertes chez *S. mobaraensis* (Koreishi et al., 2005a, 2005b, 2006). Ces comparaisons ont montré une similitude de 78% entre SAM23877_0977 et Sm-PVA, de 85% entre SAM23877_1485 et Sm-eLA, ainsi que de 93% entre Sam-AA et SAM23877_1734. De plus, ces analyses ont permis la découverte d'une quatrième séquence, SAM23877_6191 possédant seulement 65% de similitude avec Sm-AA. L'étude de mutants de délétion a permis d'attribuer la spécificité de l'activité hydrolytique pour la liaison amine en position α à la protéine produite par le gène SAM23877_1734 et la spécificité envers la

liaison amine en position ϵ pour la protéine issue de SAM23877_1485. Il est donc démontré que l'activité hydrolytique obtenue à partir de l'extrait brut est majoritairement issue de ces deux enzymes.

Dans la suite de ce chapitre, nous nous sommes référés à plusieurs paramètres-clé de la réaction d'acylation à savoir, la nature du substrat et la nature des catalyseurs utilisés de l'influence des substrats sur la réaction d'acylation.

3. Résultats complémentaires

3.1. Impact de la longueur de la chaîne du donneur d'acyle sur la régiosélectivité de la réaction d'acylation

Les performances d'acylation d'acides aminés et de peptides contenant de la lysine effectuées par CALB et les aminoacylases de *S. ambofaciens*, ont été comparées en utilisant les acides caprylique, laurique, palmitique et oléique possédant respectivement 8, 12, 16 et 18 carbones ainsi qu'une insaturation pour l'acide oléique (Figure 4.4). Les analyses structurales des produits de réaction ont été réalisées par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse comme décrit précédemment.

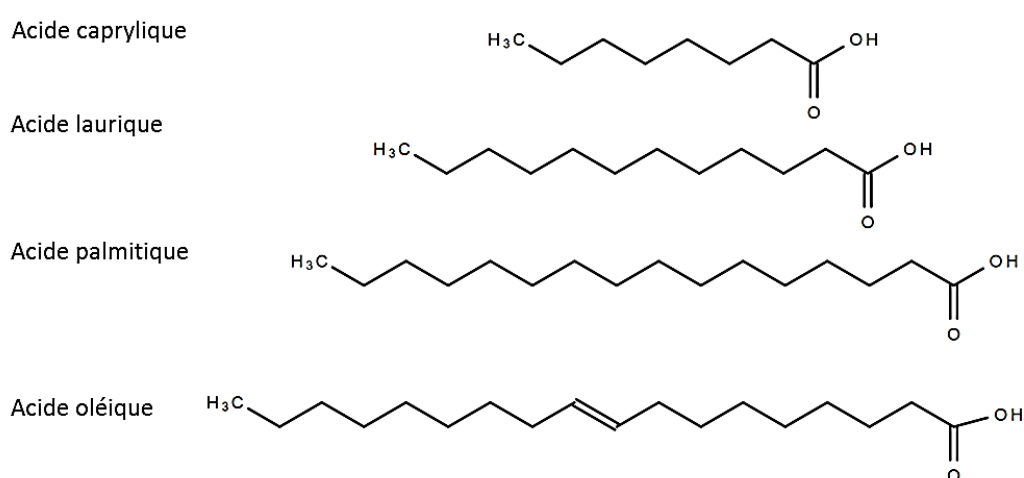


Figure 4.4: Structures moléculaires des acides gras étudiés

Les Figure 4.5 et Figure 4.6 présentent les spectres MS² obtenus après fragmentation des produits mono-acylés majoritairement formé lors des réactions d'acylation de la lysine avec les différents acides gras. L'acylation de la lysine par l'acide caprylique catalysée par CALB a conduit à la formation d'un produit mono-acylé avec une masse moléculaire de 272. Conformément aux résultats obtenus précédemment avec l'acide oléique, la fragmentation de cette molécule a généré l'apparition d'un ion fils majoritaire ($m/z = 210$) correspondant à $[(\text{capryloyl-K}) - \text{H}_2\text{O} - \text{COOH} + \text{H}]^+$ et d'un ion fils minoritaire ($m/z = 237$) correspondant à $[(\text{capryloyl-K}) - 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ (Figure 4.5.A1). Sur la Figure 4.5.A2 sont présentés les résultats obtenus avec les aminoacylases de *S. ambofaciens*. La formation d'un produit de même masse moléculaire a été observé (MM = 272) mais de profil de MS² différent. En effet, l'ion fils majoritaire est celui correspondant à $[(\text{Capryloyl-K}) - 2\text{H}_2\text{O} - + \text{H}]^+$ (Figure 4.5A2).

Ces profils sont cohérents avec la formation d' α -capryloyl-lysine avec les aminoacylases et d' ϵ -capryloyl-lysine avec CALB. Sur la Figure 4.5.B1 et B2, la même comparaison entre les deux biocatalyseurs est réalisée pour la réaction d'acylation de la lysine avec l'acide laurique. L'analyse de ces spectres correspondant au produit mono-acylé de masse moléculaire 328 indique à nouveau un ion fils majoritaire correspondant à $[(\text{lauroyl-K}) - \text{H}_2\text{O} - \text{COOH} + \text{H}]^+$ dans le cas de CALB alors qu'avec les aminoacylases l'ion fils majoritaire correspond au $[(\text{lauroyl-K}) - 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$. Les ions fils observés indiquent donc également la formation d' α -lauroyl-lysine avec les aminoacylases et d' ϵ -lauroyl-lysine avec CALB.

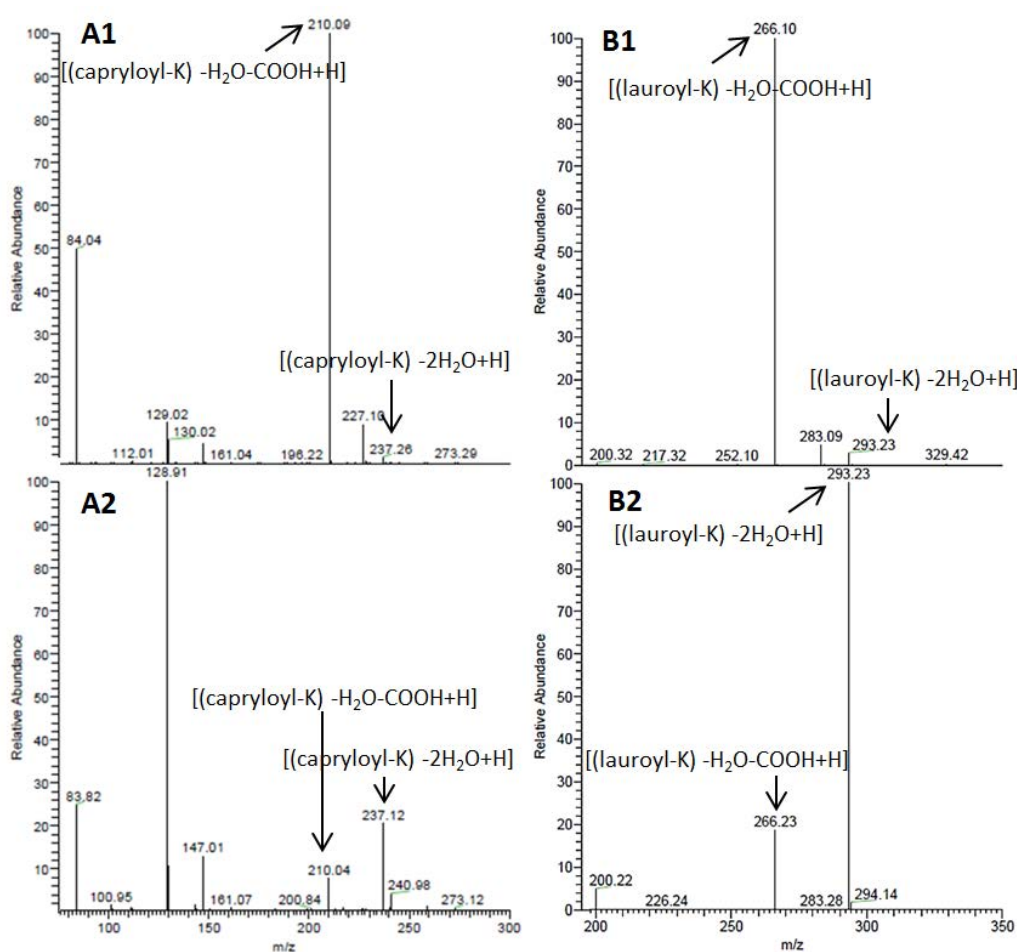


Figure 4.5: Spectre MS² après fragmentation d'acyl-lysine : A: capryloyl-lysine ; B :lauroyl-lysine, synthétisés par (1) CALB ou (2) le mélange d'aminocylases issues du surnageant de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877.

Les spectres correspondant à la fragmentation des produits mono-acylés issus des réactions d'acylation de la lysine avec l'acide palmitique (MM = 384) et l'acide oléique (MM = 410)

sont présentés en Figure 4.6. L'étude structurale des ions fils lors de ces deux réactions permet de conclure, comme précédemment à une régiosélectivité orientée vers le groupement en position ϵ pour CALB et en position α pour les aminoacylases. Il apparaît donc que ni la taille de la chaîne carbonée, ni la présence d'une insaturation n'ont d'impact sur la régiosélectivité de la réaction quel que soit le biocatalyseur testé.

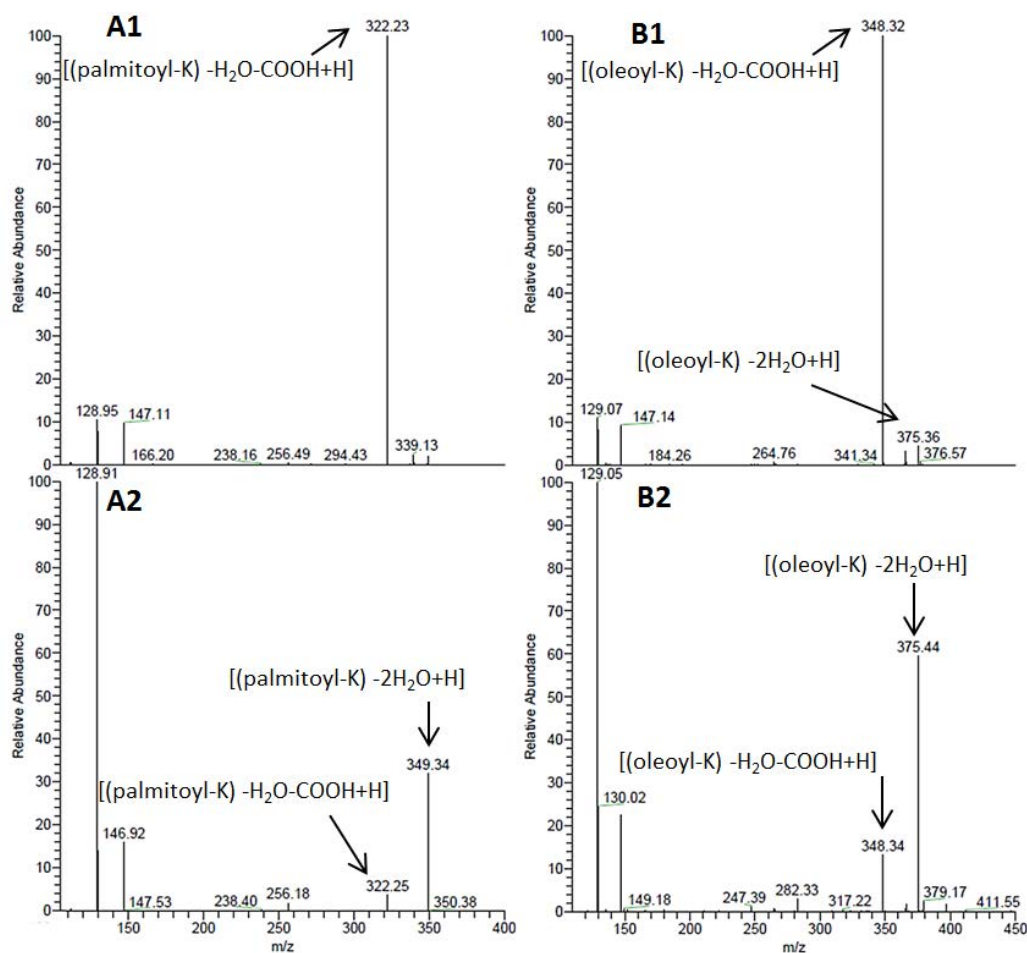


Figure 4.6: Spectre MS² après fragmentation d'acyl-lysine : A: palmitoyl-lysine ; B : oleoyl-lysine, produits par (1) CALB ou (2) le mélange d'аминоacylases issues du surnageant de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877.

Dans chacun des cas évoqués il arrive que des traces du second produit mono-acylé apparaissent, sauf dans le cas de l'acylation par l'acide oléique catalysée par CALB où ce phénomène n'a pas été constaté. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans le chapitre 3 indiquant une régiosélectivité d'autant plus marquée que la chaîne acyle est longue.

Pour conclure sur ces résultats, des régiosélectivités différentes ont été mises en évidence entre les aminoacylases de *S. ambofaciens* et CALB quelle que soit la longueur de la chaîne carbonée du donneur d'acyle utilisé avec la lysine ou les peptides contenant la lysine.

3.2. Impact de la nature du biocatalyseur sur les performances de la réaction

Après avoir étudié la régiosélectivité des aminoacylases de *S. ambofaciens* et de CALB avec des donneurs d'acyles de différentes longueurs de chaîne ainsi que la lysine et des peptides contenant une lysine, les performances de ces enzymes ont été mesurées, à partir d'une réaction modèle : l'acylation de la lysine par l'acide laurique. En l'absence de molécules standards solubles permettant de suivre la synthèse des produits, les cinétiques ont été réalisées par le suivi de la concentration en acide gras.

La Figure 4.7 présente les cinétiques d'acylation de la lysine catalysée par CALB (A) ou les aminoacylases (B). Ces suivis de disparition de l'acide laurique mettent en évidence des vitesses initiales différentes en fonction du biocatalyseur. En effet, lorsque la réaction est catalysée par CALB la vitesse initiale de disparition de l'acide gras est très rapide, $49 \pm 3 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$. Avec les aminoacylases celle-ci est de $3,4 \pm 0,4 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$ (Figure 4.7 C et D). La vitesse initiale est bien supérieure pour CALB mais il faut remarquer que la comparaison entre ces deux biocatalyseurs est difficile car outre le fait que les milieux réactionnels sont différents : i) la concentration de CALB immobilisée sur les billes de Novozym 435[®] est inconnue, ii) l'extrait protéique issu de la culture de *S. ambofaciens* contient 4 aminoacylases différentes dont l'activité respective n'est pas connue. Dans une récente étude la quantité d'enzyme par g de support de Novozym 435[®] a été estimée à 85 mg (dos Santos et al., 2016). Si l'on considère cette estimation, la concentration en CALB dans cette réaction serait de $0,85 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Sachant que lors des réactions catalysées par les aminoacylases, $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de l'extrait protéique contenant le mélange des aminoacylases a été ajouté il est possible que la faible vitesse initiale mesurée soit due à une plus faible concentration en enzyme lors de cette réaction.

L'équilibre thermodynamique de la réaction est atteint avant 24h dans le cas de CALB, alors qu'avec les aminoacylases, celui-ci arrive plus tardivement, environ 40h (Figure 4.7 A et B). Cependant dans les deux cas, le taux de conversion obtenu à l'équilibre thermodynamique (environ 24h) est du même ordre de grandeur, de l'ordre de 40 %.

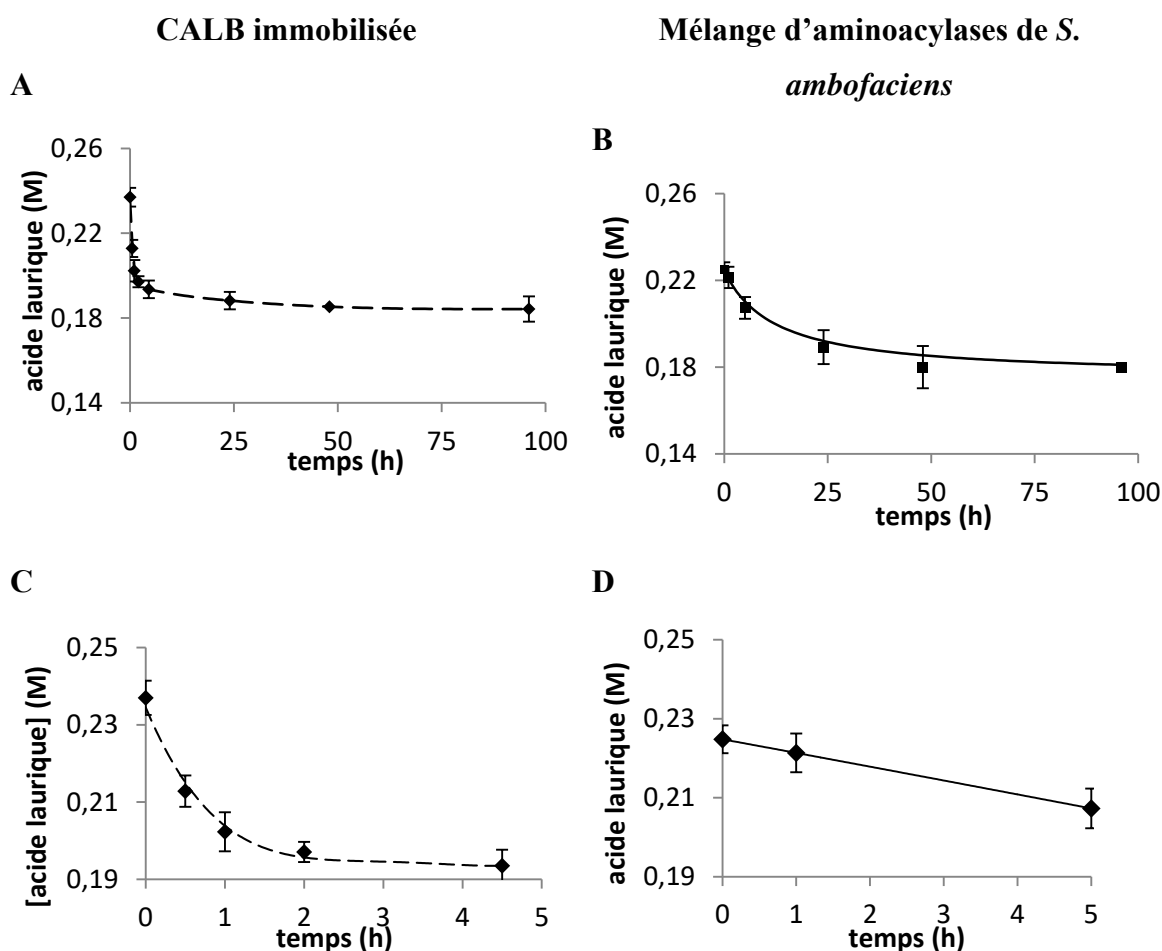


Figure 4.7: Suivis cinétiques de la consommation de l'acide laurique (0,24 M) lors de la réaction d'acylation de la lysine (0,12 M) catalysée par : A CALB (Novozym435[®]) ou B le mélange d'aminocyclases issues du surnageant de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877. Détails des 5 premières heures de réaction en C pour CALB et en D pour les aminocyclases.

3.3. Impact de la longueur de chaîne carbonée du donneur d'acyle sur les performances de la réaction catalysée par CALB

L'effet de la longueur de chaîne carbonée du donneur d'acyle lors de réaction de synthèse catalysée par CALB est un paramètre qui a déjà été étudié lors de réaction d'acylation de flavonoïdes tels que l'isoquercétine (Melika Ardhaoui et al., 2004; Katsoura et al., 2006; Salem et al., 2010). Les résultats obtenus avaient permis de conclure que le taux de conversion était dépendant de la longueur de la chaîne du donneur d'acyle. En effet, les résultats les plus élevés avaient été obtenus avec les chaînes courtes alors qu'au-delà de 12 carbones aucun effet n'avait été observé. La réaction d'acylation de la lysine catalysée par CALB a été mise en œuvre en présence de 3 donneurs d'acyle différents : les acides laurique, palmitique et oléique. Les différences de structure entre ces trois acides gras vont leur conférer des propriétés différentes (température de fusion, solubilité, flexibilité...) pouvant

avoir un impact sur le déroulement de la réaction. Les conditions de réactions ont été maintenues identiques afin de comparer uniquement l'influence de la nature du donneur d'acyle. Les cinétiques obtenues sont représentées sur la Figure 4.8 et les vitesses initiales de disparition du substrat dans le Tableau 4.5. Les vitesses initiales de réactions semblent très différentes. En effet, il apparaît clairement que dans le cas de l'acide palmitique, la réaction démarre lentement avec une vitesse initiale de $5,6 \pm 4 \text{ mM.h}^{-1}$ alors que des vitesses de 49 ± 3 et $61 \pm 1,4 \text{ mM.h}^{-1}$ sont déterminées pour les acides laurique et oléique. De plus, les cinétiques montrent que quelle que soit la nature du donneur d'acyle, l'équilibre thermodynamique de ces réactions semble toujours être atteint rapidement, avant 24h de réaction. L'atteinte rapide de l'équilibre thermodynamique peut être due au fait que le système réactionnel est constitué d'enzymes immobilisées pouvant engendrer des limitations de transfert de masse, à la faible solubilité de la lysine dans le M_2B_2 , à une inhibition par le produit, ou encore à une perte rapide de l'activité de l'enzyme.

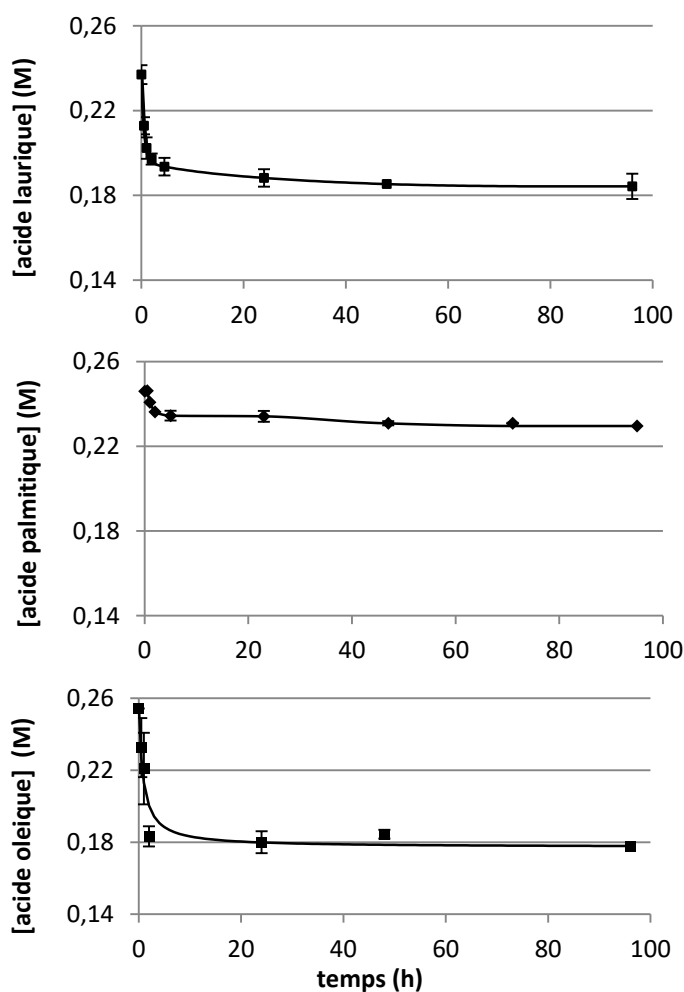


Figure 4.8: Suivis cinétiques de consommations des acides gras (0,24 M) lors de la réaction d'acylation de la lysine (0,12 M) catalysée par CALB (Novozym 435®)

Tableau 4.5: Vitesses initiales apparentes de disparition (mM.h⁻¹) des donneurs d'acyles catalysée par CALB (Novozym 435[®])

	Vitesse initiale apparente de disparition (mM.h ⁻¹)
Acide laurique (C12)	49 ± 3
Acide palmitique (C16)	5,6 ± 4
Acide oléique (C18 :1)	61 ± 1,4

Les taux de conversion obtenus sont de : 54 ± 5 % pour l'acide oléique, 42 ± 10 % pour l'acide laurique ainsi que de 6 ± 2 % pour l'acide palmitique (Figure 4.9). Il n'y a pas de différence significative entre les taux de conversion obtenus avec l'acide laurique et l'acide oléique. Cependant, le faible taux de conversion obtenu pour l'acide palmitique possédant 16 carbones est remarquable. D'après les résultats obtenus lors des études de modélisation moléculaire, cette différence ne semble pas être liée à la taille de l'acide gras qui encombrerait le site actif de CALB, déjà décrit comme étroit et profond. En effet, les résultats des simulations de modélisation moléculaire présentés dans le chapitre précédent n'avaient pas permis d'observer d'impact de la longueur de la chaîne carbonée sur la faisabilité de la réaction. Les résultats obtenus expérimentalement peuvent donc permettre de conclure que les différences de taux de conversion ne sont pas dues à la taille de l'acide gras mais plutôt aux conditions opératoires qui doivent être adaptées aux propriétés de l'acide gras qui varient avec la longueur et la saturation de la chaîne carbonée.

La Figure 4.9 illustre la relation entre la température de réaction, la température de fusion de l'acide gras et le taux de conversion de la lysine en acyl-lysine. Dans le cas de l'acide palmitique, la température de la réaction (55°C) est inférieure à la température de fusion de l'acide gras (63°C), ce qui n'est pas le cas pour les deux autres acides gras étudiés. Ce paramètre pourrait donc expliquer le faible taux de conversion obtenu avec l'acide palmitique. L'effet de la température peut également être dû à une rigidité trop importante des acides gras lorsque les températures sont inférieures à leur point de fusion (Vaysse et al., 2002). Afin de vérifier cette hypothèse, la réaction d'acylation de la lysine avec l'acide palmitique a été réalisée à 65°C. La comparaison des taux de conversion obtenus lors des réactions réalisées à 55 et 65 °C est présentée sur la Figure 4.10. Ces résultats indiquent qu'à une température de fusion supérieure à celle de l'acide palmitique aucune différence significative n'est observée lors de l'acylation de la lysine par CALB. Il semble donc que la température de fusion élevée de l'acide palmitique ne soit pas la cause du faible taux de conversion obtenu.

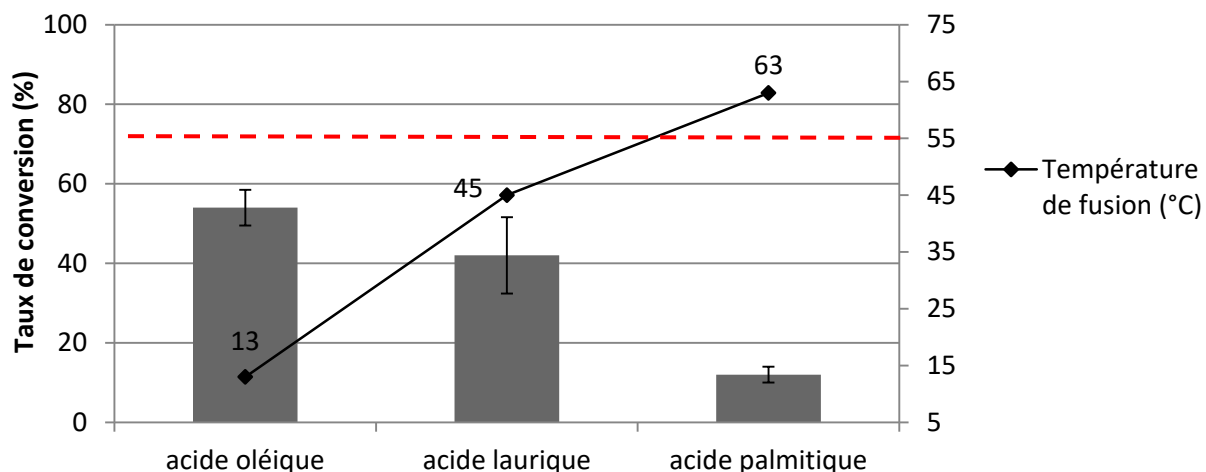


Figure 4.9: Taux de conversions pour la réaction d'acylation de la lysine (0,12 M) avec l'acide laurique, palmitique et oléique (0,24 M) catalysée par CALB à 48h. (-- = température de travail = 55°C)

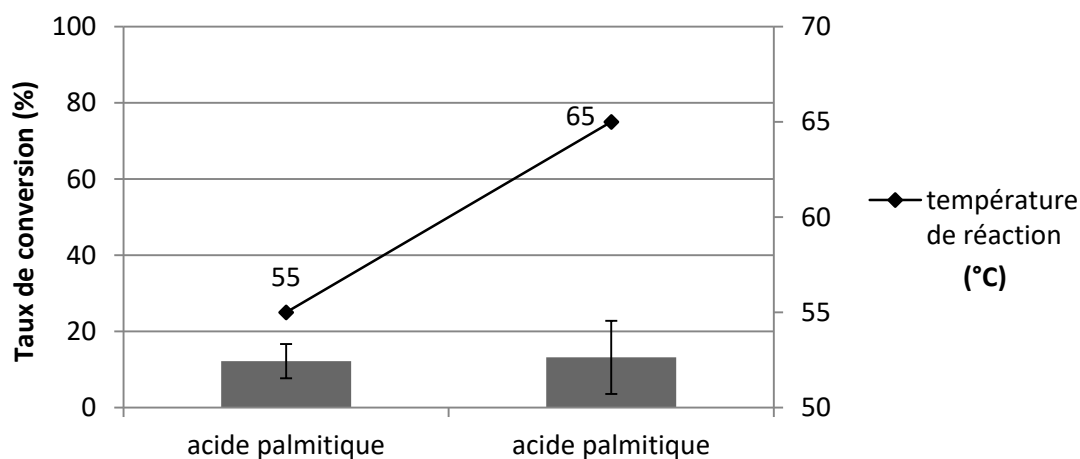


Figure 4.10: Taux de conversion pour la réaction d'acylation de la lysine (0,12 M) avec l'acide palmitique (0,24 M) catalysée par CALB à 48h de réaction à 55 et 65°C.

Soo et son équipe (2004), ont réalisé une étude sur la recherche des conditions optimales d'acylation de la lysine avec l'acide palmitique ou l'acide oléique catalysée par la lipase de *Rhizomucor miehei*. Malgré l'optimisation des conditions réactionnelles par la planification expérimentale, cette étude n'a pas permis d'obtenir des rendements supérieurs à 33 % avec l'acide oléique et 16% avec l'acide palmitique, à des températures respectives de 56,6 et 69,3 °C. Ces résultats ont été en accord avec les rendements théoriques obtenus (15 % avec l'acide palmitique et 32 % avec l'acide oléique) ce qui valide leur méthode de planification. Les

surfaces de réponse obtenues indiquent que les rendements de réaction sont très faibles ce qui est décrit par Soo comme typiquement lié à des problèmes de stabilité enzymatique. Dans le cas de l'acylation catalysée par la lipase de *R. miehei*, il semblerait donc que la température de fusion ne soit pas la cause des faibles taux de conversion de l'acide gras bien que ce soit un paramètre à prendre en compte.

Les résultats des travaux réalisés ici avec CALB montrent une activité spécifique nettement supérieure dans les conditions opératoires utilisées par rapport aux résultats obtenus par Soo (Tableau 4.6). Les plus faibles activités spécifiques sont obtenues avec l'acide palmitique que ce soit avec CALB ou la lipase de *R. miehei*. Il semble que pour l'acylation de la lysine, CALB possède une préférence pour les chaînes courtes, lorsque qu'elles sont saturées. Cependant l'acide oléique semble être le donneur d'acyle préférentiel pour la réaction d'acylation catalysée par CALB alors que celui-ci possède 18 carbones. Cette différence peut être liée à la présence d'une insaturation. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus lors de l'étude à l'échelle moléculaire (chapitre 3). CALB semble être le catalyseur le plus intéressant pour la réaction d'acylation d'acide aminé et d'acide gras puisque l'utilisation de cette enzyme permet l'obtention des activités spécifiques les plus importantes.

Tableau 4.6: Comparaison des conditions opératoires lors de l'acylation de la lysine entre notre étude et celle de Soo et al. 2004 (PA : acide palmitique ; OA : acide oléique ; LA : acide laurique)

	Soo et al. 2004	Cette étude
Enzyme	Lipozyme RM IM	Novozym 435
Quantité d'enzyme immobilisé (mg.g ⁻¹)	(188 mg/g de support)	(85 mg/g de support selon Dos Santos et al. 2016)
Concentration d'enzyme (g.L ⁻¹)	11,6	0,85
Lysine (mM)	33	120
Temps (h)	96	48
Taux de conversion (%)	PA : 16 OA : 33	PA : 12 OA : 54
Activité spécifique (mmol de lysine consommé .h ⁻¹ .g ⁻¹ d'enzyme)	PA : 0,004 OA : 0,01	LA : 1,3 PA : 0,35 OA : 1,6

3.4. Impact de la nature du substrat accepteur d'acyle

Les résultats obtenus lors de l'acylation de la lysine et de peptides contenant une lysine ont montré une régiosélectivité de CALB majoritairement dirigée vers le groupement amine de la chaîne latérale de la lysine. Des traces de produit résultant de l'acylation de la fonction amine en position N-terminale sont parfois observées de façon transitoire. La question de l'acylation en position N-terminale d'acides aminés autres que la lysine se pose. Cette étude va donc porter sur la capacité de CALB à catalyser l'acylation d'une fonction amine N-terminale. La glycine a été choisie comme molécule modèle pour cette étude, en raison de la simplicité de sa structure.

La Figure 4.11 représente les structures moléculaires et les logP des substrats étudiés. Le logP étant une mesure de solubilité différentielle entre octanol et eau ($\log P = \log(C_{\text{octanol}}/C_{\text{eau}})$). Une valeur de logP négative indique que l'on peut considérer la molécule hydrophile et inversement un logP positif indique que la molécule sera plus apolaire car plus soluble dans l'octanol. L'acylation de la glycine avec l'acide laurique catalysée par CALB a été réalisée ; et un taux de conversion de la lysine de $8 \pm 4 \%$ a été obtenu. Ce faible taux de conversion n'est pas surprenant dans la mesure où l'unique site d'acylation possible est la fonction amine N-terminale de la glycine. Les hypothèses émises afin d'expliquer ce faible taux de conversion sont : la faible réactivité de l'acide aminé, la faible solubilité de la glycine dans le solvant organique et le mauvais positionnement du ligand dans la cavité catalytique. Afin de déterminer les causes les plus plausibles de ce phénomène, différentes expériences ont été réalisées, dont les résultats ont été confrontés avec ceux issus de simulations de modélisation moléculaire. L'acylation par l'acide laurique de différents accepteurs d'acyle a été menée : le dipeptide gly-gly ainsi que les composés méthyl-glycine et ter-butyl-glycine. Les structures moléculaires de ces substrats sont représentées sur la Figure 4.11, ces substrats présentant un encombrement stérique et un caractère hydrophile/hydrophobe plus ou moins important.

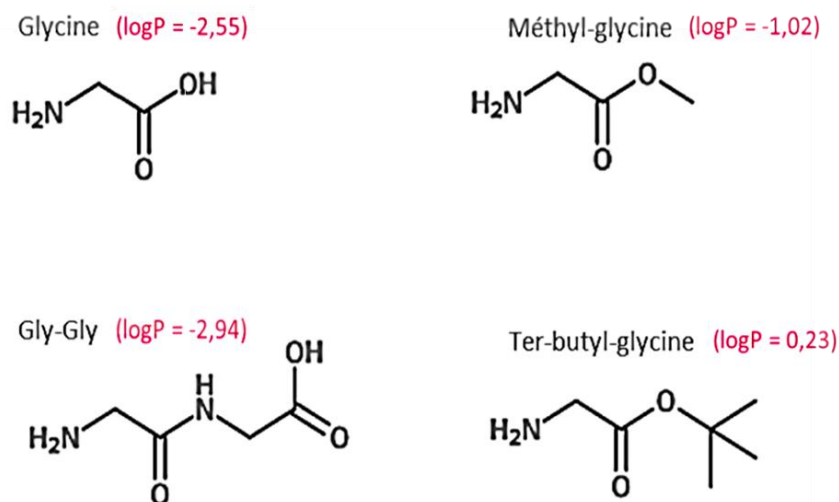


Figure 4.11: Structures moléculaires des accepteurs d'acyles étudiés et leurs logP.

Le taux de conversion obtenu avec chacun de ces substrats est représenté en fonction de leurs logP sur la Figure 4.12. Les taux de conversion obtenus sont supérieurs avec chacun des substrats testés par rapport à la glycine. La comparaison des performances réactionnelles obtenues avec la glycine, la méthyl-glycine et la ter-butyl glycine semble indiquer que l'augmentation de la solubilité de l'accepteur d'acyle dans le milieu réactionnel engendre une nette augmentation du taux de conversion allant jusqu'à 100 % pour la ter-butyl-glycine.

Concernant le dipeptide gly-gly, une amélioration du taux de conversion est observée comparativement à la glycine. Toutefois, ceci ne peut s'expliquer par la solubilité du dipeptide, celle-ci étant légèrement inférieure à celle de la glycine. De plus, le taux de conversion obtenu est significativement supérieur à celui observé avec la méthyl-glycine qui possède une solubilité dans le solvant organique bien supérieure.

Il semblerait donc que la solubilité du substrat ne soit pas le seul paramètre affectant l'efficacité réactionnelle. Pour tenter d'aller plus loin dans la compréhension des résultats observés expérimentalement, des simulations impliquant ces substrats ont été menées selon la méthodologie mise au point précédemment.

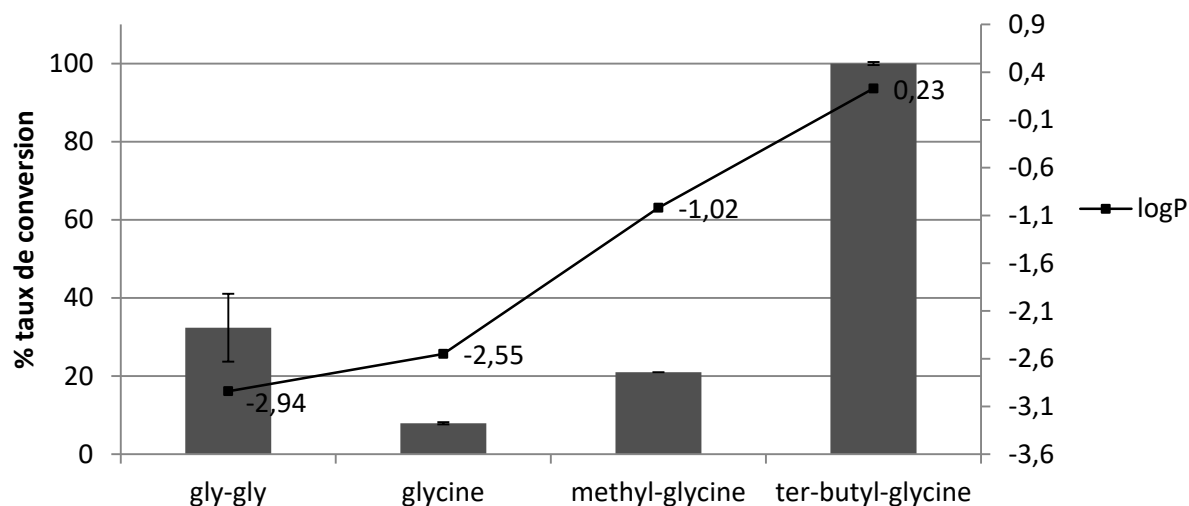


Figure 4.12: Taux de conversion pour la réaction d'acylation de gly-gly, glycine, méthyl-glycine et ter-butyl-glycine (0,12 M) par l'acide laurique (0,24 M), catalysée par CALB (-- = logP du M2B2)

Dans cette étude, la méthodologie de modélisation moléculaire décrite précédemment (chapitre 3), associant simulations de docking et calculs d'énergie d'interaction électrostatique a été appliquée afin d'expliquer les résultats expérimentaux. Des simulations de docking flexible ont été réalisées avec chacun de ces substrats en utilisant comme cible l'acyl-enzyme, lauroyl-CALB. À l'issue de ces simulations, les complexes obtenus ont été étudiés en considérant le respect des critères de distance entre le groupement amine N-terminale des substrats et les deux résidus catalytiques Ser105 et His224. Puis, pour chaque complexe respectant les critères de distance, les énergies d'interaction électrostatique impliquant les résidus de la cavité ont été déterminées. Les moyennes des énergies sont représentées sur la Figure 4.13. Les énergies d'interactions électrostatiques impliquant la Ser105 et l'His224 confirment la possibilité pour CALB de catalyser l'acylation de chacun de ces substrats.

Dans le cas de la glycine, les résultats obtenus indiquent la présence d'interactions favorables avec la Ser105 et légèrement favorables avec l'His224. On note une interaction défavorable avec le résidu polaire Asp134, identifié précédemment comme un point d'interaction crucial pour le bon positionnement du substrat accepteur d'acyle. Ceci suggère une efficacité catalytique moindre vis-à-vis de ce substrat, ce qui semble cohérent avec les résultats expérimentaux et valide les hypothèses émises antérieurement.

La méthyl-glycine semble établir peu d'interaction avec les résidus de la cavité catalytique de l'enzyme. Ceci pourrait expliquer le taux de conversion plus faible que celui obtenu dans le cas de gly-gly, malgré une meilleure solubilité de la méthyl-glycine. En effet, les interactions établies avec certains résidus permettent probablement de guider le ligand vers le fond de la cavité et contribuent à son bon positionnement.

Dans le cas de la ter-butyl-glycine de faibles interactions favorables sont également suggérées, sauf avec le résidu catalytique Asp187 avec lequel une forte énergie d'interaction est obtenue ce qui est favorable au transfert de proton de l'His224 vers l'Asp187. Il semblerait donc que la nette augmentation de solubilité constitue un critère déterminant pour l'efficacité de la réaction, ce substrat conduisant au plus haut taux de conversion. Au vu de ces résultats, il semblerait donc que le blocage du groupement carboxyle de la glycine améliore le taux de conversion de la réaction en augmentant la solubilité du substrat. Par ailleurs, ceci semble permettre l'établissement d'interactions clés avec la cavité catalytique de l'enzyme, notamment avec le résidu Asp134.

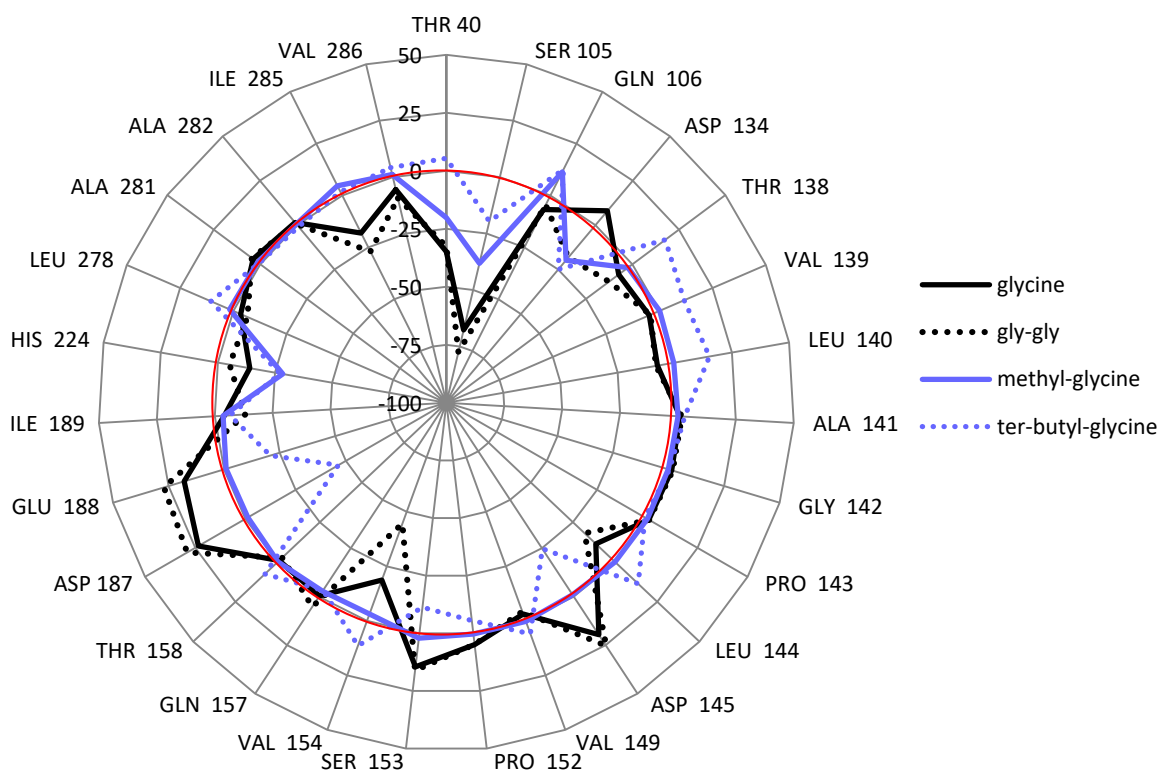


Figure 4.13: Graphique en toile des moyennes des moyennes des énergies d'interactions électrostatiques des résidus de la cavité catalytique pour chaque complexe en fonction de la nature de l'accepteur d'acyle.

Cette étude de l'impact de la nature de l'accepteur d'acyle a montré que la solubilité du substrat aminé peut être un facteur limitant pour leur acylation. Pour pallier cette limitation, il est possible de modifier la structure du substrat en greffant un groupement alkyle sur la fonction carboxyle. Dans une étude portant sur l'acylation de la sérine, un groupement amine a été greffé sur la fonction carboxyle afin d'améliorer la solubilité du substrat. Les rendements de O-acylation ont été améliorés jusqu'à 93 % (Zhang et al., 2005).

Précédemment, le rôle de l'accessibilité des fonctions amines au site actif a été discuté (Ferrari et al., 2014). En effet, la forme étroite et profonde de la cavité a déjà été mise en cause dans la régiosélectivité de l'acylation de la lysine, dirigée majoritairement vers la fonction amine en position ϵ . Il est donc possible d'imaginer qu'un substrat de très petite taille comme la glycine peine à établir les interactions requises pour son bon positionnement dans la cavité, ce qui peut causer un problème d'ancrage du ligand dans la cavité.

Quoi qu'il en soit, l'efficacité de la réaction repose sans doute à la fois sur des éléments macroscopiques comme la solubilité du substrat aminé et des éléments à l'échelle moléculaire comme les interactions avec des résidus clés. En l'état actuel de nos connaissances, il demeure difficile d'établir la nature des éléments qui prédominent.

4. Conclusion générale

L'objectif de ce chapitre était d'étudier l'acylation enzymatique à l'échelle réactionnelle considérant les différents acteurs de la réaction (le substrat à acyler, l'agent acylant et l'enzyme). Tout d'abord, des catalyseurs capables de catalyser des réactions de N-acylation ont été recherchés, tels que les aminoacylases, en particulier dans un surnageant de culture de *S. ambofaciens* ATCC23877.

Trois enzymes possédant de fortes homologues de séquences peptidiques avec celles des aminoacylases découvertes par l'équipe de Koreishi ainsi qu'une 4^{ème} avec une homologie moindre ont pu être mises en évidence. Suite à cette découverte, la capacité de réaliser la N-acylation en milieu aqueux et la spécificité de ces enzymes concernant la réaction d'acylation de la lysine ainsi que des peptides SYK et LQKW ont été comparées avec celles de CALB. La capacité des aminoacylases de *S. ambofaciens* à catalyser l'acylation du groupement amine en position N-terminale des acides aminés et des peptides a ainsi pu être mise en évidence. Cette régiospécificité présente un intérêt important car elle permettrait, potentiellement, d'acyler les acides aminés et les peptides sans modifier leurs chaînes latérales.

La seconde partie de ce chapitre a été consacrée à l'étude de l'influence des substrats sur la réaction d'acylation d'acides aminés. Dans un premier temps, une étude de l'influence de la longueur de la chaîne carbonée du substrat donneur d'acyle sur la régiosélectivité a été réalisée. Il a été observé que la longueur de la chaîne carbonée n'avait pas d'effet significatif sur la régiosélectivité de la réaction d'acylation de la lysine quel que soit le biocatalyseur, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus précédemment dans le chapitre 3. Une étude sur l'influence de la longueur de la chaîne carbonée sur les performances réactionnelles a également été réalisée sur la réaction d'acylation de la lysine catalysée par CALB. Différents donneurs d'acyles de longueurs de chaînes différentes, saturés ou insaturés, ont été étudiés. Les meilleurs taux de conversion ont été obtenus avec l'acide laurique et l'acide oléique. Il a été constaté que l'acide palmitique n'était pas un substrat de choix pour cette réaction.

L'impact d'un changement de substrat accepteur d'acyle a également été étudié. La taille des substrats est importante car la forme profonde et étroite de la cavité catalytique de CALB peut engendrer des phénomènes stériques pouvant impacter la réaction. De plus, l'acylation d'acides aminés et de peptides en solvant organique est limitée par la solubilité de ces molécules. Pour pallier ce problème, plusieurs voies semblent intéressantes à explorer, telles que le changement de température ou encore, la modification structurale des substrats. Dans la

littérature, des méthodologies sont décrites telles que la sonication ou l'utilisation d'homogénéiseur à haute pression, afin d'améliorer la dispersibilité des particules de substrat dans le milieu réactionnel ((Husson et al., 2009).

Chapitre 5 : Étude de l'acylation enzymatique à l'échelle du procédé

1. Introduction

Ce chapitre est consacré à l'aspect procédé de la réaction d'acylation. En effet, à cette échelle il est possible d'intervenir à divers niveaux tels que l'immobilisation de biocatalyseurs ainsi que sur les différents modes de chauffage et d'agitation. Le choix du réacteur doit être adapté aux conditions de la réaction : continu ou discontinu, catalyseur libre (homogène) ou immobilisé (hétérogène), nature du milieu réactionnel, nature du solvant et des substrats utilisés.

Dans une première partie l'immobilisation des aminoacylases de *S. ambofaciens*, biocatalyseurs décrits dans le chapitre précédent, a été réalisée. Pour cela, des matériaux mésoporeux silicatés ont été utilisés pour réaliser la chimisorption et la physisorption des aminoacylases et ainsi rendre possible leur récupération puis leur réutilisation, cet aspect étant important dans une logique de réduction des coûts à l'échelle industrielle. Puis, dans une seconde partie, l'influence du mode de chauffage sur la catalyse a été étudiée par comparaison des résultats obtenus par chauffage conventionnel ou par chauffage micro-onde en catalyse hétérogène avec Novozym 435[®] en solvant organique et en catalyse homogène avec les aminoacylases de *S. ambofaciens* en milieux aqueux. Enfin, l'importance de l'hydrodynamique a été étudiée par une comparaison des performances catalytiques des aminoacylases en milieu aqueux selon que l'on utilise une agitation par barreau aimanté ou bien une agitation en réacteur micro-structuré micro-fluidique.

2. Immobilisation d'un mélange d' aminoacylases de *S. ambofaciens* sur un matériau mésoporeux silicaté

Dans le chapitre précédent, la présence d'activités aminoacylases a été mise en évidence dans un extrait brut issu d'une culture de *S. ambofaciens* ATCC23877. Cette étude a permis de mettre en évidence la présence de 4 aminoacylases différentes et d'identifier les deux enzymes responsables de l'activité de synthèse d'acides aminés/peptides acylés. Ces enzymes présentent un grand intérêt car elles se sont révélées capables de réaliser la réaction d'acylation en milieu aqueux avec une régio-sélectivité orientée vers les groupements N-

terminaux. Cette régiosélectivité permettrait d'acyler les acides aminés et peptides fonctionnels tout en conservant leurs chaînes latérales limitant ainsi le risque de perdre leurs fonctionnalités.

Comme décrit dans le chapitre bibliographie, à l'échelle industrielle les enzymes sont souvent mises en œuvre sous forme immobilisée afin de permettre leur recyclage et de faciliter la séparation avec les produits de réactions et substrats résiduels non réagis (Cao, 2005). Pour cette raison l'immobilisation des aminoacylases de *S. ambofaciens* ATCC 23877 sur un matériau de silicate mésoporeux, le SBA-15, a été étudiée. Dans cette étude, deux méthodes d'immobilisation ont été comparées : la chimisorption et la physisorption, avec pour objectif d'identifier les conditions préférentielles d'usage des aminoacylases.

Les résultats de cette étude sont présentés sous la forme d'une publication intitulé « N-acylation of lysine catalyzed by immobilized aminoacylases from *Streptomyces ambofaciens* in aqueous medium » parue dans le journal *Microporous and Mesoporous Materials*.

N- α -acylation of lysine catalyzed by immobilized aminoacylases from *Streptomyces ambofaciens* in aqueous medium

L. Dettori^a, F. Vibert^b, Y. Guiavarc'h^a, S. Delaunay^a, C. Humeau^a, J.L. Blin^b, I. Chevalot^{a*}

^a: Université de Lorraine/CNRS, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP-UMR 7274), 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602-F-54518 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^b : Université de Lorraine/CNRS, SRSMC, UMR7565, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Corresponding author :

Pr. Isabelle Chevalot

Tel: +33 (0)372743977 Isabelle.Chevalot@univ-lorraine.fr

Keywords: Aminoacylases; N-acylation; Immobilization; Mesoporous silica; SBA-15

2.1. Abstract

Aminoacylases (EC 3.5.1.1.4) of *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 were immobilized by chemical and physical adsorption onto SBA-15 mesoporous silica materials. The activity of the immobilized aminoacylases was firstly evaluated by considering the hydrolysis reactions of N- α - and ϵ -acetyl-lysine, used as a rapid method of screening. After chemical adsorption, a significant loss of activity was observed probably due to a conformational change of the aminoacylases structures upon immobilization. When the immobilization was performed by physisorption a higher amount of enzyme (0.20 against 0.05 mg per mg of support) could be adsorbed onto the mesoporous silica material. The physisorbed enzyme also presented a higher hydrolytic activity as compared to the chemisorbed one. Recycling of the supported enzymes was performed three times with no loss of the specific activity. Furthermore, a better thermostability in comparison with the free enzymes was also observed when using aminoacylases physisorption. Finally, lauroyl-lysine synthesis was catalyzed for the first time by immobilized aminoacylases. The crude extract from *S. ambofaciens* exhibited the rare ability to catalyze the N-acylation on amino group in the α -position of the lysine whereas the lipase B of *Candida antarctica* catalyzed the acylation of lysine on its amino group in ϵ -position. This particular and original regioselectivity was maintained with immobilized enzymes.

2.2. Introduction

The N-acylation reaction allows the synthesis of peptides derivatives exhibiting bioactive and/or techno-functional properties (Bordes and Holmberg, 2015; Craik et al., 2013). The peptides can present several biological activities: antioxidant, opioids, anti-hypertensive, anti-tumor... The improvement of the bioavailability of peptides and bioactive proteins used as drugs is a great challenge. Indeed, the delivery of these drugs *via* oral route occurs in 60% of cases. Moreover, polar peptides usually have difficulties to go through the epithelio-intestinal barrier with a bioavailability around 1-2% (DeVane, 2009; Hamman et al., 2005). Acylation is one of the solutions for this issue. For example, it has been demonstrated that the length of the carbon chain of the acylating agent plays a role in the protection against the *in vitro* proteases (Asada et al., 1994).

The N-acylation reaction is also used for the production of amino-acids based biosurfactants. These molecules are widely used for their potential interest in pharmaceutical, cosmetic,

cleaning and food domains. Now, the impact on the environment, the biodegradability and the biocompatibility have become factors with equivalent importance compared with the surface properties of these molecules (Morán et al., 2004). The research of new bio-surfactant molecules remains challenging. Several studies showed that the use of amino-acids and protein hydrolysates as raw materials to synthesize surfactants can increase the product performances while reducing the product costs (Foley et al., 2012; Pinazo et al., 2016). Furthermore, the wide variety of amino acids and fatty acids available allows the development of a large diversity of bio-surfactants with various properties (Chandra and Tyagi, 2013). Acylated amino acids or peptides synthesis at an industrial scale is generally based on the Schotten-Baumann chemical reaction. This process requires the use of acyl chlorides and organic solvents under highly alkaline conditions, generates by-products such as salted and organic effluents to be recycled, and is not regio- nor chemically selective. Consequently, the development of bioprocesses for acylated amino acids/peptides production is of major interest although they are until now barely described in the literature. One of the main advantages of the enzymatic route is to offer a synthesis strategy in soft experimental situations and to provide regioselective acylation reaction (Schmid et al., 2001). Hydrolytic enzymes, and especially lipases, are used to catalyze acylation reactions.

However, the use of lipases requires non-aqueous environments, such as organic solvents or ionic liquids for the acylation of polar molecules such as amino acids or peptides. For example, lysine acylation in ϵ -position using oleic (69,3°C) and palmitic acids (56,6°C), catalyzed by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*, Lipozyme IM[®], in organic solvent, was reported with 33 and 16% conversion rate, respectively (Soo et al., 2004). In other study, lipase B of *Candida antarctica* (CALB) was used to perform peptides acylation. Then, 36 % and 32 % conversion rate were obtained for acylation of Lys-Ser and carnosine in ϵ -position using oleic acids and CALB in organic solvent (Husson et al., 2009, 2011). An alternative to lipases is aminoacylases (EC 3.5.1) which represent great interest in synthesis of acylated amino acids thanks to their ability to catalyze acylation reaction in aqueous media (Koreishi et al., 2006). These enzymes are produced by different microorganisms, including filamentous bacteria like bacteria from the *Streptomyces* genus. Four acylases have been previously identified from *Streptomyces mobaraensis*, including a ϵ -lysine acylase which has catalytic activity specifically oriented towards amine group in ϵ position and demonstrates the ability of aminoacylases to achieve N- ϵ -acyl-L-lysines synthesis (Koreishi et al., 2005b, 2005a, 2006, 2007, 2009b, 2009a). The specific N-acylation on α -position was reported as

very low with only 5% in comparison with the N-acylation on ϵ -position that can reach 40% (Zhang et al., 2007). This is to the best of our knowledge the higher yields obtained for N-acylation with acylases. Furthermore, until now, no study concerned immobilization of such aminoacylases with the aim of developing a robust process for amino acid or peptides acylation in aqueous medium.

Immobilization of enzyme is a crucial step for most of the industrial processes. Indeed, the immobilization makes possible the separation and the recycling of the enzymes, resulting in reduced production costs. Furthermore, the catalytic properties are maintained or even improved, thanks to a better stability of the immobilized enzyme (Cao, 2005). There are different ways to encapsulate the enzyme such as physical adsorption, physical entrapment, cross-linking or covalent attachment i.e. chemical adsorption (Sheldon and Pelt, 2013). Among the solid supports reported to date, organized mesoporous silica materials are supports of choice for enzyme immobilization responding to both environmental and technical requirements, such as ordered mesopores with tuned sizes, high surface area and pore volume (Hartmann, 2005; Lee et al., 2009; Magner, 2013). In addition, silica, especially the ones prepared by sol-gel chemistry (Zhang et al., 2012), are also known to be safe, not only for the environment, but also for the human body within a certain dose ("Complementary Medicine Evaluation Committee, 16th meeting," n.d.). These supports have thus been used for the immobilization of various enzymes such as chloroperoxidase, glucose oxidase or lipases to design supported biocatalysts (Blin et al., 2005; Galarneau et al., 2006; Han et al., 2002). SBA-15 is of peculiar interest since it possesses a regular hexagonal array of pores with uniform diameter, a very high specific surface area and an important pore volume. It is also inert and stable in elevated temperature (Jacoby et al., 2013), and has good mechanical stability. Moreover, its surface can be easily functionalized for future covalent attachment of proteins (Canilho et al., 2013).

In the acylases class, the penicillin G acylase has been immobilized onto a wide variety of supports (Hassan, 2016; Kallenberg et al., 2005). For example, penicillin G acylase immobilizations onto MCM-41 mesoporous silicas and silica-based macro-mesoporous monolith by both physisorption and chemisorption were described, allowing the reuse of biocatalysts for penicillin G hydrolysis (He et al., 2000; Wang et al., 2013). Despite their important role in various processes, in particular the ones involving N-acylation, the immobilization of other types of acylases is barely considered. For example, magnetic Fe₃O₄ nanoparticles were used for aminoacylases chemisorption through aldehyde linking,

improving the enzyme activity compared to the free one (Feng et al., 2016). Better stability regarding temperature and storage together with retention of the activity was also achieved with aminoacylase–polyethyleneimine cross-linked enzyme aggregates (Vaidya et al., 2012).

The present work consists in immobilization through both physical and chemical adsorption of aminoacylases from *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 onto a SBA-15 mesoporous silicate material. Prior to the covalent linkage of the enzymes, the silica support was functionalized. The obtained supported biocatalysts were used to catalyze the N-acylation on the α -position of the lysine. The efficiency and reusability of the aminoacylases immobilized via physisorption and chemisorption were compared.

2.3. Materials and methods

Pluronic P123 triblock copolymer, (EO)₂₀(PO)₇₀(EO)₂₀ and (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES), 98%, were purchased from Sigma-Aldrich. Tetramethoxysilane (TMOS), 98%, was bought from Alfa Aesar. Glutaric dialdehyde, 25% in water, and 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane, 97%, were obtained from Acros Organics. All chemicals were used as received without further purification. Novozym 435[®] (lipase B from *C. antarctica* immobilized on an acrylic resin) with propyl laurate synthesis activity of 7000 PLU g⁻¹ and protein grade of 1-10% was from Novo Nordisk A/S. Lysine and oleic acid were purchased from Sigma-Aldrich, K with 99% of purity were acquired from Bachem. Aminoacylases were produced from *S. ambofaciens*.

2.3.1. Aminoacylases of *S. ambofaciens* production

S. ambofaciens strains was stored as spore suspensions (10⁷ to 10⁸ Units Forming Colony. mL⁻¹) at -80 °C. The first step of the culture protocol was a culture in the ICS medium (Insoluble complex medium). Medium pH was adjusted at 6.8 prior to sterilization at 121 °C for 20 min. 40 mL of this medium were inoculated with 100 µL of spore suspension. After 48 h of culture, 2.5 mL of ICS medium were transferred in 25 mL of culture medium for the pre-culture step. The composition of this culture medium was described by Koreishi et al. in 2005. The pH of the culture medium was set at 7 before sterilization at 121 °C for 20 min. The preculture was performed for 48 h and then, 5 ml of this preculture were used to inoculate 95 ml of culture medium as described by Koreishi et al., 2005. This last culture was maintained for 7 days as a maximum production of enzymes was identified at this time. All the cultures were carried out in baffled flasks at 250 rpm and 28 °C. All the components of the culture media were purchased from Sigma-Aldrich, except sucrose and yeast extract, from Fluka, (NH₄)₂SO₄ (99%), NaCl, CaCO₃ and acetonitrile, from Carlo Erba. At the end of the main culture, in order to disrupt the bacterial cells, the whole suspension was submitted to 4 passages in a Cell disrupter (Constant system Cell-D) at 2.5 kbars. Then, the cellular debris were removed by centrifugation at 8600 x g, at 4 °C for 20 min. Thereafter, some ammonium sulfate was added to the supernatant to 60% of saturation to precipitate proteins of the supernatant including acylases and agitation was maintained for 1 h at room temperature. The precipitate was recovered by centrifugation at 8600 x g at 4 °C for 20 min and was dissolved in 25 mM Tris-HCl buffer, NaCl 50 mM, at pH 8. The solution was dialyzed 7 times (cutoff at

12.5 kDa) against the same buffer. This solution will be mentioned as *S. ambofaciens* crude extract in the following experiments

2.3.2. Support preparation

Synthesis of SBA-15: SBA-15 silicas were synthesized by sol-gel process according to a standard procedure in the presence of structure-directing agents (Olkhovyk and Jaroniec, 2005). In a typical synthesis: 2.66 g of P123 were dissolved in 100 mL of a chlorhydric acid solution (1 M). Then, 4.17 g of TMOS, the inorganic precursor, were added and the mixture was stirred at room temperature during 30 min. Afterwards the solution was transferred into an autoclave and heated at 40 °C during 24 h following by a heating at 100 °C during 48 h. The mesoporous silica material was obtained after surfactant extraction by ethanol during 48 h using a Soxhlet apparatus. The powder was then dried under vacuum one night to afford **SBA-15** as a white powder.

Chemical functionalization of SBA-15: Mesoporous silicas types SBA-15 were functionalized with organic functions like glutaraldehyde or glycidyle. These functions allow the grafting of enzymes through reactions with the amines they contained *via* imine (with glutaraldehyde) or aminoalcohol formation (with glycidyle function) (Chong and Zhao, 2004; Wang et al., 2013). Grafting of amine function was made by reaction between silanols on the silica surface and trialkoxysilane moieties of aminopropyltriethoxysilane (APTES) (Figure 5.1, red path). The silica **SBA-15-glu** was then obtained by reaction with glutaraldehyde.

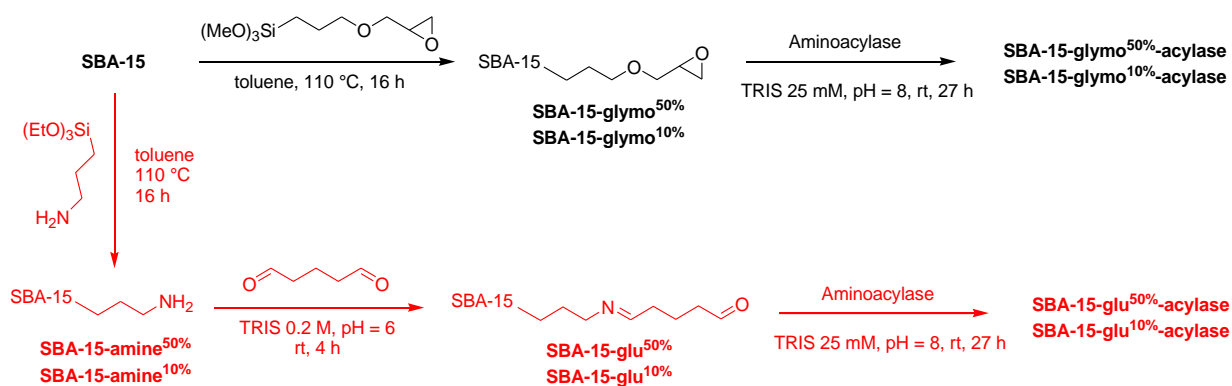


Figure 5.1: SBA-15 glutaraldehyde (red path) and glycidyle (black path) functionalizations followed by aminoacylases chemisorption

By varying the proportion of APTES compared to **SBA-15**, two functionalization rates of organic functions in the silica were obtained: 50 and 10% (functionalization rate = (moles of organosilane / moles of organosilane + moles of silica) x 100). The obtained materials are labeled as SBA-15-R^x, where x stands for the silica/organic group molar ratio (10 or 50%) and R refers to the organic group (amine, glutaraldehyde or glycidyle). The SBA-15-amine^x precursors are prepared as follow:

SBA-15 (1 g) was suspended in toluene (50 mL), APTES (3.7 g for x = 50% or 410 mg for x = 10%) was added and the mixture warmed at 110 °C under stirring during 16 h. After cooling, the mixture was filtrated, washed two times with toluene, two times with ethanol and dried one night under vacuum to afford **SBA-15-amine^{x%}** as a white powder.

Glutaraldehyde (glu) has been attached to SBA-15-amine^x according to the following procedure:

SBA-15-amine^{x%} (1 g for x = 50% or 750 mg for x = 10%) was suspended in TRIS buffer (40 mL for x = 50% or 30 mL for x = 10%, 0.2 M in water, pH = 6), glutaraldehyde, 25% in water (3.5 g for x = 50% or 700 mg for x = 10%) was added and the mixture stirred at room temperature 20 min at 100 mbar and 4 h at atmospheric pressure. The mixture was filtrated, washed three times with distilled water and dried one night under vacuum to afford **SBA-15-glu^{x%}** as a brown powder.

SBA-15 has been functionalized with glycidyle function (glymo) as follow:

SBA-15 (1 g) was suspended in toluene (50 mL), 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) (3.8 g for x = 50% or 450 mg for x = 10%) was added and the mixture warmed at 110 °C under stirring during 16 h. After cooling, the mixture was filtrated, washed two times with toluene, two times with acetone and dried one night under vacuum to afford **SBA-15-glymo^{x%}** as a white powder.

2.3.3. Adsorption of aminoacylases of *S. ambofaciens*

Chemical adsorption of aminoacylases:

The chemical adsorption of the enzyme on the functionalized support was made in a TRIS buffer solution at pH = 8. 300 mg of SBA-15-R^x were suspended in 54 mL of the Tris buffer solution. Then 2.3 mL of the aminoacylase solution (13 mg/mL) were added and the mixture was stirred at room temperature during 3 h under a pressure of 100 mbar and during 24 h under atmospheric pressure. The supported biocatalyst was obtained after filtration and washing two times with TRIS buffer. After drying one night under air either the brown **SBA-15-glu^{x%}-acylase** or the white **SBA-15-glymo^{x%}-acylase** powders were recovered.

Physical adsorption of aminoacylases:

SBA-15 (100 mg) was suspended in TRIS buffer (20 mL, 25 mM in water, NaCl 50 mM, pH = 8), aminoacylases solution (4.6 mL, 13 mg/mL) was added. The mixture was stirred 3 h at room temperature, filtrated, washed three times with TRIS buffer and dried one night under air to afford **SBA-15-acylase** as a light brown powder.

2.3.4. Characterization of the materials

Nitrogen adsorption–desorption isotherms were carried out at –196 °C over a wide relative pressure (P/P₀) range from 0.010 to 0.995 with a volumetric adsorption analyzer TRISTAR 3000 manufactured by Micromeritics. Before measurements, the samples were outgassed under vacuum (pressure = 0.13 mBar) at 25°C during 16 hours. The specific surface area of each sample was calculated by the Brunauer–Emmett–Teller (BET) method. The pore diameter and the pore size distribution were determined from the adsorption branch of the corresponding isotherm using the Barret–Joyner–Halenda (BJH) method (Barrett et al., 1951).

Small angle X-ray scattering (SAXS) experiments were performed using a SAXSess mc² instrument (Anton Paar) with a line collimation setup. The system uses a Cu(K α) radiation source in a sealed tube (λ = 0.1542 nm). A CCD detector positioned at 309 mm from the sample was used to collect the scattering signals. Powder samples were placed between two

Kapton foils in a powder cell. Diffraction data were acquired during 30 min of exposure time. All data were corrected for the background scattering from the empty cell with Kapton.

All solid-state NMR spectra were acquired on a Bruker DSX300 spectrometer, with a magnetic field strength of 7.05 T. Samples were placed in a 4 mm zirconia rotors. ^{29}Si CPMAS NMR spectra were recorded with a relaxation delay of 2.5 s for ^{29}Si and 3 s for ^{13}C at 10 kHz spin rate with 30° flip angle. The contact times for cross-polarization were 2 ms for ^{29}Si and 3 ms for ^{13}C , with a pulse sequence repetition delay of 0.02 s for ^{29}Si and 0.04 s for ^{13}C and the scan number was 5000. The spectra were acquired using 40 kHz spectral for ^{29}Si and 50 kHz spectral for ^{13}C width.

Diffuse reflectance infrared Fourier transformed (DRIFT) analyses were obtained on Harrick HVC-2CI equipment using the Harrick HVC- DRP cell. The functionalized mesoporous powder was mixed with a non-absorbing KBr matrix (5 wt%). In order to evacuate physisorbed water, each sample was kept under vacuum over 30 min before analysis (10^{-4} mbar). The KBr reference and the samples were measured in the same conditions to determine the mesoporous reflectance, R , defined as the ratio of sample reflectance (R_s) over KBr reflectance (R_r). The spectra are shown in pseudo-absorbance ($-\log R$) mode.

Elementary analyses were performed on a Thermo Finnigan EA 1112 apparatus equipped with a Porapak chromatographic column. The system is managed by the Eager 300 software. Dosed elements are C, H, N and S. Results have a $\pm 0.2\%$ absolute precision and are validated by at least 2 trials. Weighing at μg accuracy was made on a Sartorius M2P Precision Balance.

UV-Visible experiments were carried on 1 cm length and 3 mL volume quartz cells on a Cary 3E type spectrophotometer.

2.3.5. Enzyme activity assays, stability and reusability

Hydrolysis reaction:

The aminoacylase activity was determined in each sample using *N*- α -acetyl-L-lysine as substrate. The enzymatic hydrolysis of *N*- α -acetyl-L-lysine was carried out in test tubes. In a typical reaction, 0.2 mL of the substrate (40 mM) and different concentration of free or immobilized enzymes (0.25 or 1.25 mg/ml) were added in Tris-HCl (25 mM) NaCl (50 mM) at pH 8 for a 2 mL final volume. The hydrolysis reaction was started by the addition of the

enzyme. Reaction media were kept at 37 °C and stirred at 250 rpm during 24h. Samples of 50 µL were withdrawn for HPLC analyses. The reaction rate was calculated from the measurement of lysine concentration released during the hydrolysis. Conversion rate was expressed as the percentage of lysine released from acetyl-lysine by free or immobilized enzymes.

For stability test, free or immobilized enzyme was kept one night at 55 °C and then conversion rate and enzyme activity were determined at optimal temperature (37 °C) after 24h. For immobilized enzyme the initial activity (set as 100%) was used to calculate the relative hydrolytic activity to determine the stability.

For recycling experiments, activity of immobilized aminoacylase was cyclically measured 3 times and relative hydrolytic activity of immobilized enzymes was determined considering the first one used as reference (set as 100%). The specific activity of the aminoacylases was defined as the amount (mg) of aminoacylases to hydrolyse 1µmol of α-acetyl-lysine in 1 minute at 37°C. This activity can be evaluated according to the following formula:

$$\text{Specific activity (SA)} = \frac{\text{reaction rate } (\mu\text{mol}/\text{mn})}{\text{protein concentration (mg)}}$$

Acylation reaction:

The enzymatic acylation of lysine was carried out in test tubes. Using *S. ambofaciens* crude extract as biocatalyst, the reaction medium consisted of the acyl-acceptor (0.12 M), acyl-donor (0.24 M) and 1.25 mg/ml of protein in 2 mL of Tris-HCl (25 mM), NaCl (50 mM) at pH 8. Reaction media were stirred at 250 rpm and kept at 45 °C during 48h. To perform CALB-catalyzed reactions, substrates were added in 2 mL of 2-methylbutan-2-ol (M2B2) previously dehydrated on 4 Å molecular sieves. The initial water activity of the medium was decreased below 0.1 to limit the hydrolytic activity of CALB. Triethylamine was added to the reaction media in a large excess (2.4 mol/L) to favor the neutral form of amino groups. After solubilization of the substrates for 12 h at 55 °C, the acylation was started by the addition of 10 g/L of CALB. Reaction media were stirred at 250 rpm and kept at 55 °C for CALB-catalyzed reactions during 48h. 50 µL samples were withdrawn over time for analyses. These samples were diluted with methanol/water (80/20, v/v) before LC–MS analysis. The relative

synthetic activities obtained with immobilized enzymes were compared with free enzymes activity set at 100%.

2.3.6. Analysis of the reaction media

Quantitative analysis of the lysine was performed by high-pressure liquid chromatography (HPLC). The separation of sample constituents was carried out according to the Shimadzu method[®] by derivatization of amino acids with the ortho-phthaldehyde (OPA) which, once excited with a wavelength of 350 nm, emits fluorescence to 460 nm. In hydrolytic reactions, the production of lysine of each reaction was monitored using HPLC (LC 20 AD – VP, Shimadzu, France) equipped with a fluorescence detector (RF-10A): excitation wavelength: 350 nm, emission wavelength: 460 nm. The column used was a C18 (150 × 4.6 mm – 5 μm, Apollo, France) maintained at 45 °C. The elution was performed using a gradient fed at a constant flow rate of 1.0 mL.min⁻¹ as following: 95% reagent A and 5% reagent B for 1 min, 95-0% reagent A and 5-100% reagent B for 9 min, 100% buffer B for 5 min, 100-0% reagent B for 1 min. The column was then washed with acetonitrile (80%) for 5 min. The column temperature was controlled at 45 °C. Mobile phases consisted of NaH₂PO₄ 0.78 g.L⁻¹, Na₂HPO₄ 1.79 g.L⁻¹ for A phase and 600 mL of A phase added at 300 mL of acetonitrile for B phase.

Qualitative and semi quantitative analysis of amino acid and peptide derivatives were carried out on a HPLC–MS system (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) consisting in a binary delivery pump connected to a photodiode array detector (PDA) and a LTQ ion trap as mass analyzer (Linear Trap Quadrupole) equipped with an atmospheric pressure ionization interface operating in positive electrospray mode (ESI⁺). Chromatographic separation was performed on a C18 amide column (150 mm × 2.1 mm, 5 μm porosity – Grace/Alltech, Darmstadt, Germany) equipped with a C18 amide pre-column (7.5 mm × 2.1 mm, 5 μm porosity – Grace/Alltech Darmstadt, Germany) at 25 °C. Mobile phases consisted of methanol/water/TFA (80:20:0.1, v/v/v) for A and methanol/TFA (100:0.1, v/v) for B. Acylated peptides were eluted using a linear gradient from 0% to 100% of B for 5 min and then an isocratic step at 100% of B for 10 min, at a flow rate of 0.2 mL.min⁻¹. Mass spectrometric conditions were as follows: spray voltage was set at +4.5 kV; source gases were set for sheath gas, auxiliary gas and sweep gas at 30, 10 and 10, respectively (in arbitrary units min⁻¹); capillary temperature was set at 250 °C; capillary voltage was set at 48 V; tube lens, split lens and front lens voltages were set at 120 V, –34 V and –4.25 V, respectively.

Full scan MS spectra were performed from 100 to 1000 m/z and additional MS² scans were realized in order to get structural information based on daughter ions elucidation. Raw data were processed using Xcalibur software (version 2.1 Thermo Scientific).

2.4. Results and discussion

2.4.1. Chemisorption of aminoacylases: supports characterization and hydrolysis activity

The materials were fully characterized at each step of the supported biocatalyst preparation. The nitrogen sorption isotherms, the pore size distribution and the SAXS patterns of **SBA-15-R^{50%}** were depicted in Figure 5.2 (A, B and C). The bare silica SBA-15 and all the functionalized mesoporous silica exhibited a type IV isotherm, characteristic of the mesoporous materials according to the IUPAC classification (Sing, 1985).

Considering the glutaraldehyde organic group, a decrease of the specific area, of the pore volume and of the average pores diameter was noted at each step of the functionalization (Table 5.1, Figure 5.2 A and 1B), confirming the grafting of the organic moieties. For example, from 877 m²/g for **SBA-15**, the specific area declined to 259 and 495 m²/g for **SBA-15-amine^{50%}** and **SBA-15-amine^{10%}**, respectively (entries a, b and e). This can be attributed to the presence of the propylamine chains into the mesopores. The difference between the two targeted functionalization loading can be explained by the larger amount of organosilane engaged in the reaction to obtain a 50% loading than for 10 %. The only exception was the increase in specific area and pore volume between **SBA-15-amine^{10%}** and **SBA-15-glu^{10%}** (entries e and f). This may be explained by glutaraldehyde polymerization, resulting in formation of microporosity which could increase specific area and pore volume (Cestari et al., 2004; Kamari et al., 2009). This phenomenon would not occur in **SBA-15-glu^{50%}** because the two aldehyde functions of glutaraldehyde could react on the more numerous amine functions.

After enzyme chemisorption, in addition to a further decrease of the specific area, the pore volume and the average pore diameter, the shape of the **SBA-15-glu^{50%}-acylase** isotherm around 0.5 of relative pressure (Figure 5.2 Ad) indicated bottle-neck type pores (ALothman, 2012), which might be caused by the presence of enzymes.

From the SAXS experiments it can be concluded that the structure of the SBA-15 was not modified during either the functionalization step or the chemisorption of the enzyme. Indeed, the three reflection peaks $q_1:q_2:q_3$ of 1: $\sqrt{3}$: 2 (Figure 5.2 C), which is characteristic of a 2D

hexagonal arrangement of the mesoporous channels were clearly observed on the SAXS patterns after functionalization or immobilization steps

The efficiency of the SBA-15 functionalization was also shown by the FTIR analysis (Figure 5.2D). First remark that can be made was the strong disappearance of the silanols signals ($3000\text{-}3750\text{ cm}^{-1}$), in particular the sharp band at 3740 cm^{-1} characteristic of the free silanols disappears, due to their consumption by APTES during the first step of amine grafting. One characteristic amine signal at 1590 cm^{-1} also appeared after functionalization. A second typical signal, non-represented on this figure, was also present at 4900 cm^{-1} . These two signals strongly decreased after reaction with glutaraldehyde and two others appeared: one of the imine at 1650 cm^{-1} and one of the aldehyde at 1720 cm^{-1} .

Secondly, after the enzyme chemisorption (Figure 5.2 D.d), the aldehyde signal disappeared whereas the imine signal increased, which was consistent with the aldehyde consumption by enzymes' amines thus forming imines. Finally, characteristic signals of the enzymes amides between 1510 and 1680 cm^{-1} further confirmed the enzyme chemisorption inside the mesoporous silica.

^{29}Si CP-MAS NMR spectroscopy was used to confirm the covalent linkage of the organosilane onto the mesoporous silica. Spectra of **SBA-15-amine^{50%}**, **SBA-15-glu^{50%}** and **SBA-15-glu^{50%}-acylase** are given in Figure 5.2 E. These functionalized materials showed four peaks around -61 , -69 , -103 and -113 ppm respectively due to T^2 $[(\text{SiO})_2\text{Si}(\text{OR})\text{C}]$, T^3 $[(\text{SiO})_3\text{SiC}]$, Q^3 $[(\text{RO})\text{Si}(\text{OSi})_3]$ and Q^4 $[\text{Si}(\text{OSi})_4]$, where $\text{R} = \text{H}$, Me or Et . The presence of T^n coordination of Si atoms supports the fact that the propylamine linker was covalently attached to the silica support. Integration of the T^n and Q^n signals allowed the calculation of a real functionalization loading according to the formula $\int \text{T}^n / (\int \text{T}^n + \int \text{Q}^n)$. The obtained value of 59% for **SBA-15-amine^{50%}** was consistent with the theoretical value of 50%. The loadings calculated by the same method for **SBA-15-glu^{50%}** and **SBA-15-glu^{50%}-acylase**, respectively of 57 and 56%, showed that the organic moieties were stable during functionalization with aldehyde and enzyme immobilization. The functionalization loadings for **SBA-15-glymo^{50%}** and **SBA-15-glymo^{50%}-acylase** were 24 and 26% respectively. The higher grafting loading of amine by the use of APTES compared to glycidyle by the use of GPTMS was already observed on functionalization in porous silica powders (Lazghab et al., 2010) and SBA-15 (Jung et al., 2010). This may be due to the steric hindrance of the larger GPTMS chain compared to the one of APTES since the GPTMS trimethoxysilane

group should be more reactive than the APTES triethoxysilane group (Bernards et al., 1991; Loy et al., 2000).

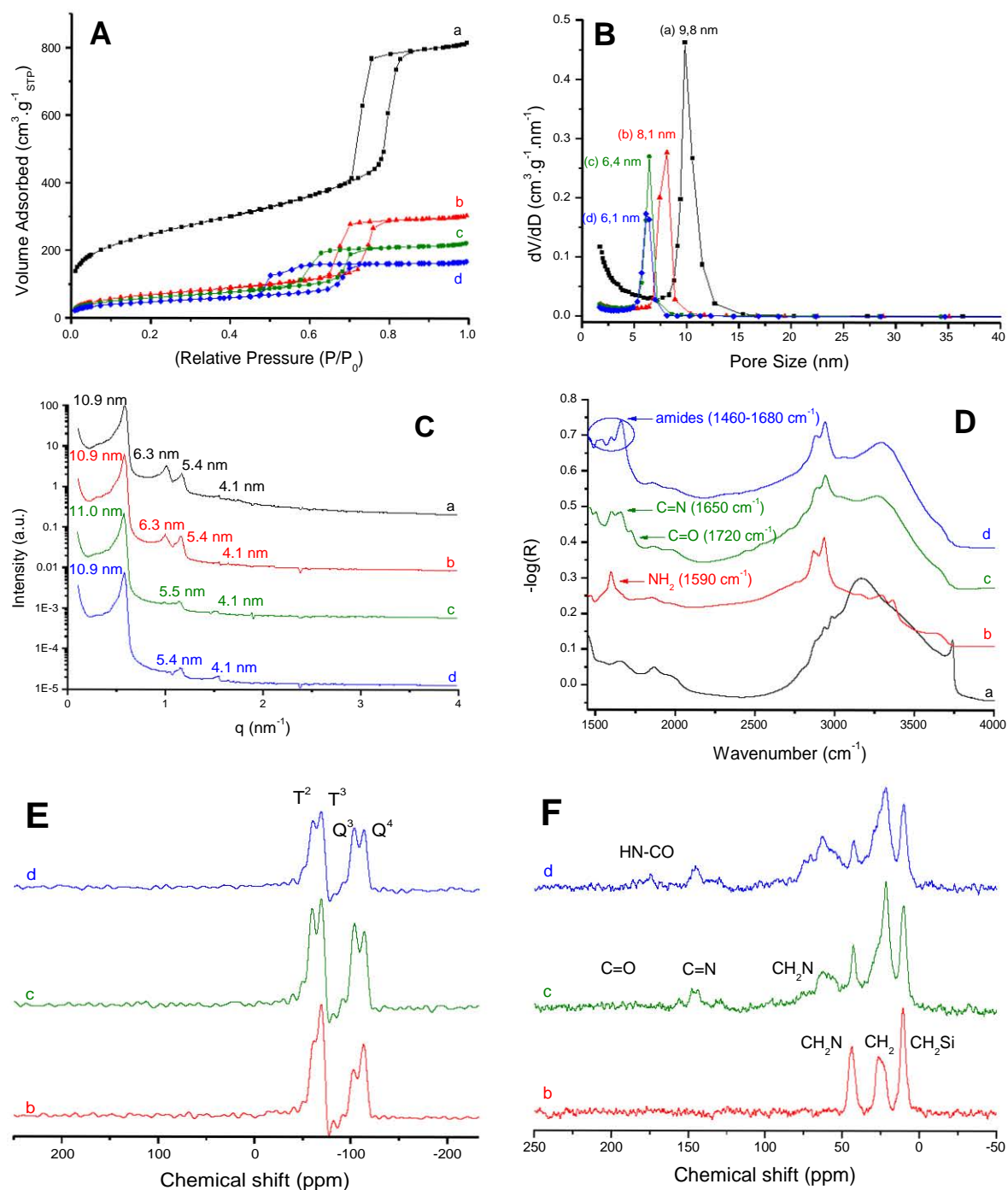


Figure 5.2: SBA-15 (a, ■), SBA-15-amine^{50%} (b, ▲), SBA-15-glu^{50%} (c, ●) and SBA-15-glu^{50%}-acylase (d, ◆) nitrogen sorption isotherms (A), average pore diameter distribution (B), SAXS patterns (C), FTIR spectra (D), ²⁹Si CPMAS NMR spectra (E) and ¹³C CPMAS NMR spectra (F)

^{13}C CPMAS NMR spectra of **SBA-15-amine**^{50%}, **SBA-15-glu**^{50%} and **SBA-15-glu**^{50%}-**acylase** are given in Figure 5.2 F. The three peaks observed at 43.8, 26.3 and 10.6 ppm for **SBA-15-amine**^{50%} correspond at the three carbon atoms of the propyl chain. After reaction with glutaraldehyde, new signals appeared around 150 ppm, which may be attributed to the carbon atoms of the imine functions, and around 60 ppm, which may correspond to the carbon atoms in α position of the nitrogen atom. The spectrum was in accordance with literature (Jung et al., 2010), as the aldehyde carbon signals were also barely visible. Enzymes chemisorption was visible due to the new signal around 180 ppm which can be related to amides carbon atoms (Canilho et al., 2013). In the **SBA-15-glymo**^{50%} spectrum (given in SI) the peaks were consistent with the incorporation of the glycidyle chain (Varghese et al., 2016). With this functionalizations the enzymes chemisorption on the NMR spectra was barely visible. This can be explained by the low amount of enzymes present in the material, making their detection by NMR difficult.

All ^{13}C and ^{29}Si CPMAS NMR spectra done are given in supporting information also with elementary data analysis. The latter also confirmed the incorporation of the organic groups and enzymes in the silicas.

After chemisorption, the quantity of enzyme truly contained into the silica materials was determined by UV-Visible analysis of the filtrate, and subtracting the value calculated to the initial enzyme mass. By this way, the enzyme amount into both **SBA-15-glu**^{50%}-**acylase** and **SBA-15-glu**^{10%}-**acylase** was of 0.054 mg of enzymes per mg of material. Thus, a functionalization loading of 50% was not useful to support a maximal amount of enzymes. As the initial solution contained 0.1 mg of enzymes per mg of material, the chemisorption yield was 54%.

To compare the linker influence onto enzyme immobilization and efficiency for reactions, **SBA-15** was also functionalized with glycidyle functions at two loadings: 50 and 10% (Figure 5.1, black path).

Replacing glutaraldehyde by glycidyle the same evolution was noted concerning the nitrogen adsorption-desorption isotherms, the mesopores size distributions, the SAXS patterns and the infrared spectra. From Table 5. 1 (a, h, i, j, and k) a decrease of the specific area, porous volume and average pore diameter during the functionalization or immobilization step can be noticed. Enzyme immobilization was also confirmed by FTIR. The enzyme amount contained into the silica was also calculated by UV-Visible, both loadings of functionalization allowed

an immobilization of 0.036 mg of enzymes per mg of material. Thus, a 36% yield of immobilization, nearly 20% less than with the glutaraldehyde functionalized silicas was obtained. Surprisingly, glycidyle moiety is considered more reactive towards enzymes (as not only amine but also hydroxyl and thiol groups can react on it) than glutaraldehyde, and usually allows a greater amount of enzyme to be immobilized. As an example, 20% more of carbonic anhydrase was immobilized in SBA-15 by covalent attachment with glycidyle than with glutaraldehyde (Fei et al., 2016). A higher difference of 30% more of lipase of *Candida rugosa* was immobilized in Eupergit C (Knezevic et al., 2006), the same was noted with invertase immobilization onto siliceous mesostructured cellular foams (Szymańska et al., 2007). However, Jung et al. described that this reactivity can be counter-productive as it can induce a multipoint attachment with enzymes, thus denaturing them (Jung et al., 2010). In the present case, the difference may be due to the lower content of glycidyle moiety (25%) than glutaraldehyde (50%) grafted in the silicas. Moreover, as the enzymes will not react in the same way towards glutaraldehyde or glycidyle group, it can be assumed that that all types of aminoacylases present in the *S. ambofaciens* crude extract will not be covalently linked onto the support. This can explain the different immobilized enzyme amount between SBA-15-glu^{x%}-acylase and SBA-15-glymo^{x%}-acylase.

Table 5. 1: Main characteristics of functionalized silicas with glutaraldehyde or glycidyle

Entry	Material	S _{BET} (m ² /g) ^a	V _{por} (cm ³ /g) ^a	Ø _{pore} (nm) ^a	d _{Bragg} (nm) ^b	a ₀ (nm) ^b
a	SBA-15	877	1.1	9.8	10.9	12.6
b	SBA-15-amine ^{50%}	259	0.42	8.1	10.9	12.6
c	SBA-15-glu ^{50%}	220	0.30	6.4	11.0	12.7
d	SBA-15-glu ^{50%} -acylase	176	0.23	6.1	10.9	12.6
e	SBA-15-amine ^{10%}	495	0.72	8.9	10.9	12.6
f	SBA-15-glu ^{10%}	629	0.88	8.2	10.7	12.4
g	SBA-15-glu ^{10%} -acylase	307	0.46	7.4	10.9	12.6
h	SBA-15-glymo ^{50%}	454	0.67	8.4	10.9	12.6
i	SBA-15-glymo ^{50%} -acylase	344	0.61	8.5	10.8	12.5
j	SBA-15-glymo ^{10%}	552	0.80	8.6	10.9	12.6
k	SBA-15-glymo ^{10%} -acylase	351	0.66	8.9	10.8	12.4

^aDetermined by N₂ sorption isotherms. ^bDetermined by SAXS experiments.

After detailed characterization, the obtained supported biocatalysts were tested for hydrolysis of N- α -acetyl-L-lysine reaction since it is a faster screening method for evaluating biocatalyst efficiency.

The conversion rates of the N- α -acetyl-L-lysine hydrolysis, catalyzed by chemisorbed aminoacylases onto SBA-15 supports functionalized by glutaraldehyde or glycidyle function (**SBA-15-glu/glymo^{10%}-acylase**) are presented in Figure 5.3A. Comparing with the activity of the free enzyme a dramatic decrease of hydrolytic activity was noted. Indeed, only 5 to 6% of N- α -acetyl-L-lysine were hydrolyzed by **SBA-15-glu/glymo^{10%}-acylase** within 24 hours, while the free enzyme gave rise to a 100% conversion rate within the same period. In accordance with literature, this loss of activity for the chemisorbed enzymes can be related to mass transfer limitation such as lower concentration of substrate or buffer ions at the support surface. This may induce changes in pH and ionic strength which are no longer optimal for the enzyme. For example, in a study dealing with O₂-dependant enzymes, Bolivar et al. described that the loss of activity of immobilized glucose oxidase was partly due to decreased concentration of oxygen at the material surface (Bolivar et al., 2013).

Other factors that can explain the loss of activity are the presence of covalent bonds between enzyme and support, leading to a limited accessibility to the active site. Moreover, the enzyme stiffening by covalent bonds can involve a conformational changes, as a consequence during the catalytic reaction the access of the substrate to the active sites, the efficiency of the catalytic reaction and the release of the obtained products can be adversely modified (Hoarau et al., 2017). As an example, Van Langen et al. used a site titration to show that penicillin G acylase lost up to 80% of its activity by immobilization as a cross-linking aggregate or chemisorption onto Eupergit C (van Langen et al., 2002). Chemisorption of the same enzyme in epoxy-functionalized macrocellular heterogeneous silica-based monoliths decreased the catalytic activity by more than half (Wang et al., 2013).

Since the optimum pH of the operating enzyme might be shifted after its immobilization, the hydrolysis of N- α -acetyl-L-lysine was performed under various pH. An increase of the activity was observed under alkaline conditions. The hydrolysis yields varied from 1 to 10 when the operating pH was changed from 6 to 10 (Figure 5.3 B). However, the efficiency of the supported biocatalyst remains still lower than the free enzyme. In previous studies in the laboratory, the optimum pH found for acylases was around 8, to obtain a 100% yield in the N- α -acetyl-L-lysine hydrolysis reaction (data not shown). Since basic pH can modify and even

destroy the mesoporous silica structuration, nitrogen sorption analysis and SAXS experiments were performed after reaction at pH 10 to determine the textural and structural properties of the supports (see supporting information). No change of its characteristics was observed.

As the immobilization by chemisorption led to dramatic decrease of activity, a physisorption procedure was developed to evaluate if weaker bonds may allow greater flexibility, stability and reusability of supported enzymes.

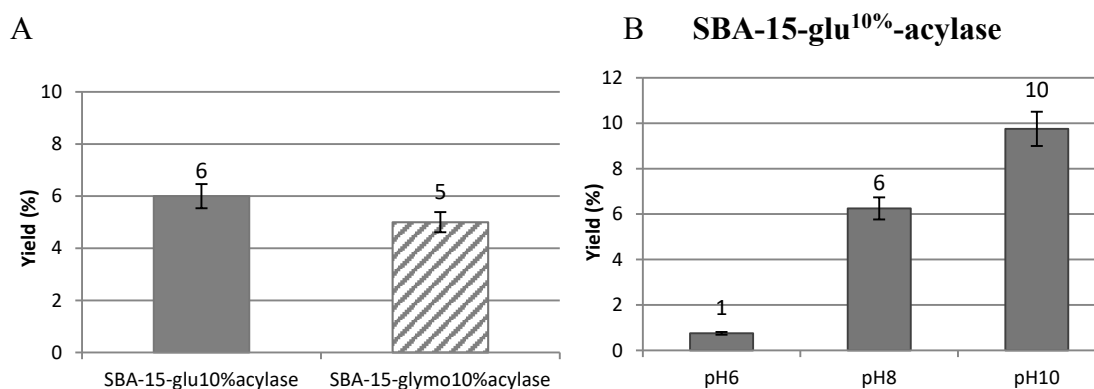


Figure 5.3: Hydrolytic enzyme activity assays obtained for chemisorbed supports (A) and with SBA-15-glu^{10%}-acylase under various pH (B)

2.4.2. Physisorption of aminoacylases: supports characterization and hydrolysis activity

Immobilization conditions for physisorption onto naked SBA-15 were similar to those used for chemisorption in terms of pH, buffer and temperature. Presence of the enzyme onto SBA-15 was evidenced by Infrared (Figure 5.4 A). Indeed, the major absorption bands of the peptide's group vibrations were observed in the range between 1200-2000 cm^{-1} . The amide I band (1600-1700 cm^{-1}) predominantly originates from the C=O stretching vibrations of the peptide bond groups and the amide II band (1510-1680 cm^{-1}) arose from N-H in-plane bending and C-N stretching modes of the polypeptide chains. The amide III band arising from the N-H bending, C-C α and C-N stretching vibration was detected at 1460 cm^{-1} . The sharp band at 3740 cm^{-1} characterizes the free silanols. Below 1200 cm^{-1} , vibrations of the silica framework are mainly at the origin of the peaks. To determine the maximum quantity of acylases that can be adsorbed onto SBA-15, the adsorption isotherm was built.

The curve reported in Figure 5.4 B was fitted according to the Langmuir equation:

$$Q_{eq} = \frac{Q_{max}K_L[C]_{eq}}{1 + K_L[C]_{eq}}$$

where Q_{eq} and Q_{max} respectively stand for the quantity of adsorbed acylase and the maximal quantity of adsorbed acylase.

A Langmuir constant K_L of 8.0 ml.mg^{-1} and a maximum quantity of adsorbed enzymes Q_{max} of 0.25 mg per mg of material were determined. Comparing to values described with penicillin G acylase (Sun et al., 2009), with a Langmuir constant K_L of 29 ml.mg^{-1} and a Q_{max} of 0.19 mg per mg of SBA-15, it appeared that the crude extract of aminoacylases exhibited low affinity for the carrier. However, the amount of physisorbed aminoacylases from *S. ambofaciens* was in the same range as compared to the ones obtained with penicillin G acylase adsorbed onto various kinds of mesoporous silica such as SBA-15 (0.19 mg per mg of SBA-15) or MCM-41 (0.23 mg per mg of material) (He et al., 2000).

According to this, a quantity of 0.2 mg of enzymes per mg of material was adsorbed to evaluate the catalytic efficiency of the supported biocatalyst. Since to reach this value the concentration of enzymes in the starting solution was 0.6 mg per mg of material, the adsorption yields can be estimated to be 33%.

The isoelectric point of aminoacylases crude extract from *S. ambofaciens* was not determined. As the one of penicillin G acylase is around 7 (Sun et al., 2009) and the one of SBA-15 is 2.3 (Kokunešoski et al., 2010), so, the chosen pH for adsorption experiment ($\text{pH} = 8$) seems to not be the optimum one. Indeed, under this pH both the surface of silica and of the aminoacylases are negatively charged and repulsive forces between the supports and the enzyme occur, leading to a decrease of the adsorption efficiency. However, the adsorption pH was not modified since $\text{pH} = 8$ is the more favorable for the aminoacylases extracts, and also showed the best yield (100%) for N- α -acetyl-L-lysine hydrolysis reaction (data not shown).

The difference in the enzyme amount between chemisorbed (0.05 mg of enzyme per mg of material) and physisorbed enzyme (0.2 mg/mg) was consistent with that described by other studies. For example, the quantity of *Mucor miehei* lipase physisorbed onto SBA-15 silicas was almost twice higher (0.43 mg of enzyme per mg of material) than the amount of enzyme

chemisorbed onto isocyanate-functionalized SBA-15 (0.28 mg/mg) (Canilho et al., 2013). The difference was higher with penicillin G acylase physisorbed onto SBA-15 (0.35 mg per mg of material) and chemisorbed onto the glycidyle-functionalized one (0.11 mg/mg) (Sun et al., 2009).

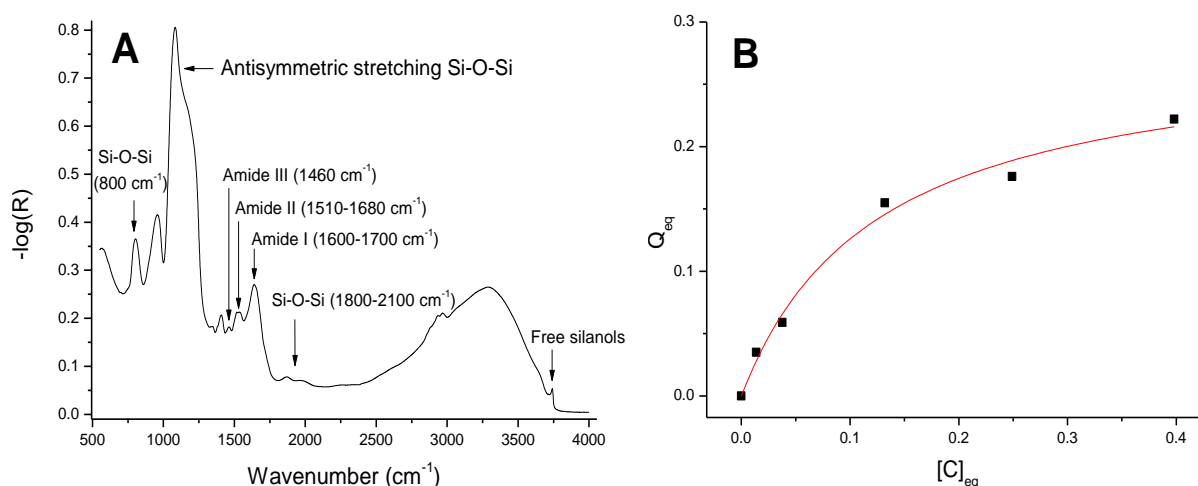


Figure 5.4: FTIR spectrum of SBA-15-acylase (A) and acylase adsorption isotherm on SBA-15 (B)

Using physisorbed acylase for hydrolysis of N- α -acetyl-L-lysine, and comparing results with the ones achieved with the free enzyme, a decrease of the activity was also noted (Figure 5.5 A). However, in that case the loss of activity was less drastic than that for the chemisorbed acylase. Within 24 hours the efficiency of the physisorbed acylase was about 25% of the one of the free enzyme against around 5% for the chemisorbed acylase. This observation is in accordance with literature. Indeed, He et al. also reported that penicillin G acylases immobilized by chemisorption onto MCM-41 silica had 4 times less activity than the one immobilized by physisorption (He et al., 2000). A decrease of penicillin G acylase activity after physisorption on macrocellular heterogeneous silica-based monoliths was also reported (Wang et al., 2013). However, as penicillin G acylase chemisorbed with glutaraldehyde linking onto cubic mesoporous silica KIT-6 presented more than twice higher activity than that of the physisorbed one onto the same material (Lü et al., 2008), it is difficult to predict the most suitable immobilization procedure that depends on the biocatalyst, the nature of the supports and the considered reaction.

The ability to reuse a biocatalyst is an important factor that can determine the economic viability of a biocatalytic process. In this study, the capability of **SBA-15-acylase** to be repeatedly was investigated. After each run, materials containing acylase were washed with Tris.HCl/NaCl buffer and filled with fresh substrate solution. The relative efficiency of the biocatalyst for N- α -acetyl-L-lysine hydrolysis was depicted in Figure 5.5 B. The results indicated that the supported biocatalyst activity was partially preserved but declined from 25 and 30% after two successive reuses. This decrease can arise from either a desorption of enzyme during reactions, or washing steps, or a loss of the enzymatic specific activity. To decide between these two hypotheses, the specific activity was calculated for each cycle. This determination was performed by measuring the proteins concentration in washing water. By this way, a desorption phenomenon was identified as the main cause of reaction yield decrease. In fact, when the immobilization was carried out by physisorption, the interactions between the enzyme and the support are weak. Consequently, the leaching of the enzyme can occur. It is interesting to note that the specific activity was constant during the 3 cycles (Figure 5.5 B). The thermal stability of the immobilized enzyme was also investigated. To do so, reaction temperature was maintained 12 hours at 55 °C and reduced at 37 °C, which was the optimal temperature for hydrolytic reaction.

On Figure 5.5 C was represented the relative enzyme activity obtained in thermal stability tests with free or immobilized enzymes. The initial enzyme activity (set as 100%) was used to calculate the relative enzyme activity. The diagrams highlighted a loss of enzyme activity of 78% with free enzyme and 58% with **SBA-15-acylase**. These results showed that physisorption of enzymes on supports led to better thermal resistance, as confinement effect in a material may prevent from aggregation or denaturation by reducing extensive conformational changes (Urabe et al., 2007). Physisorption thus increases the capacity of aminoacylases to face extreme thermal conditions.

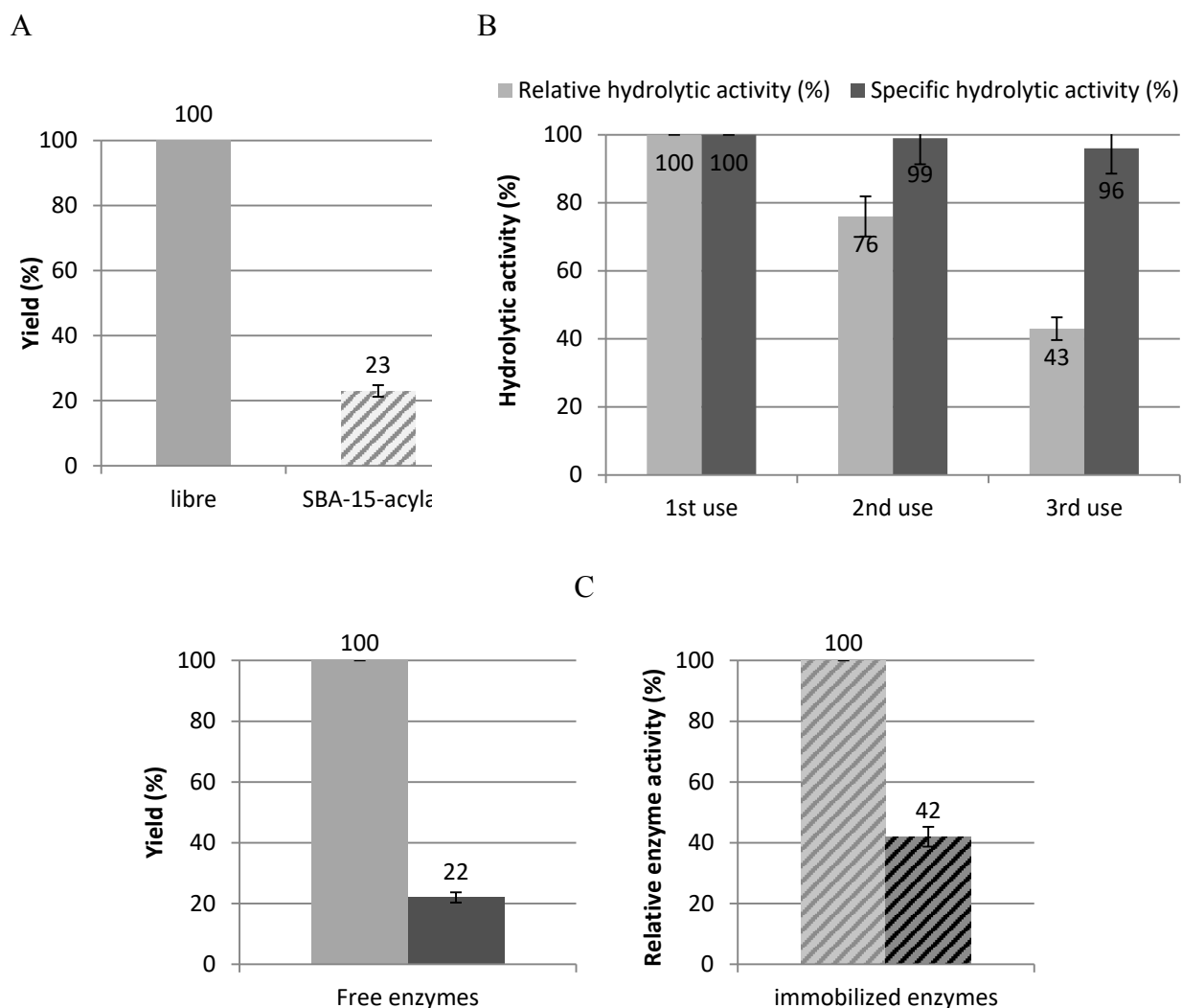


Figure 5.5: (A) Hydrolytic activity with physisorbed acylase and free acylases; (B) Relative enzyme activity and relative specific activity of hydrolytic enzyme activity assays after re-use for 3 cycles; (C) Relative enzyme activity for hydrolytic enzyme activity assays: in normal conditions (37 °C, 250 rpm) (grey) or after one night at 55 °C (black) catalyzed by free enzymes or SBA-15-acylase

2.4.3. Synthesis of lauroyl-lysine

After materials synthesis characterization, and hydrolytic trials, focus was made on the aminoacylases synthetic activity and comparison with commercial immobilized CALB (Novozym435[®]). In this case, N-lauroyl-lysine was synthesized by reaction between lysine and lauroic acid in aqueous medium.

The thermodynamic equilibrium of the reaction was achieved in less than 24 h with Novozym 435. A longer time was requested (about 40 h) to reach this equilibrium for supported aminoacylases (data not shown). Nevertheless, in both cases, the conversion rate obtained at

thermodynamic equilibrium was about 40%. In Figure 5.6, the relative activities obtained with immobilized enzymes versus free enzymes (set at 100%), for synthesis of α -lauroyl-lysine were represented. The biocatalyst designed by the physisorption of the aminoacylases onto SBA-15 exhibited about a third of the activity of the free enzyme. This result was promising and optimization will be performed in future work to enhance the yield.

It should be noted that as observed for the N- α -acetyl-L-lysine hydrolysis, physisorbed aminoacylases were more efficient than chemisorbed ones. For the N-lauroyl-lysine production, physisorption provided a 9-fold increase as compared to chemisorption. This supports our hypothesis that chemisorption induced conformational changes on enzymes, thus denaturing them, as seen in hydrolysis reaction.

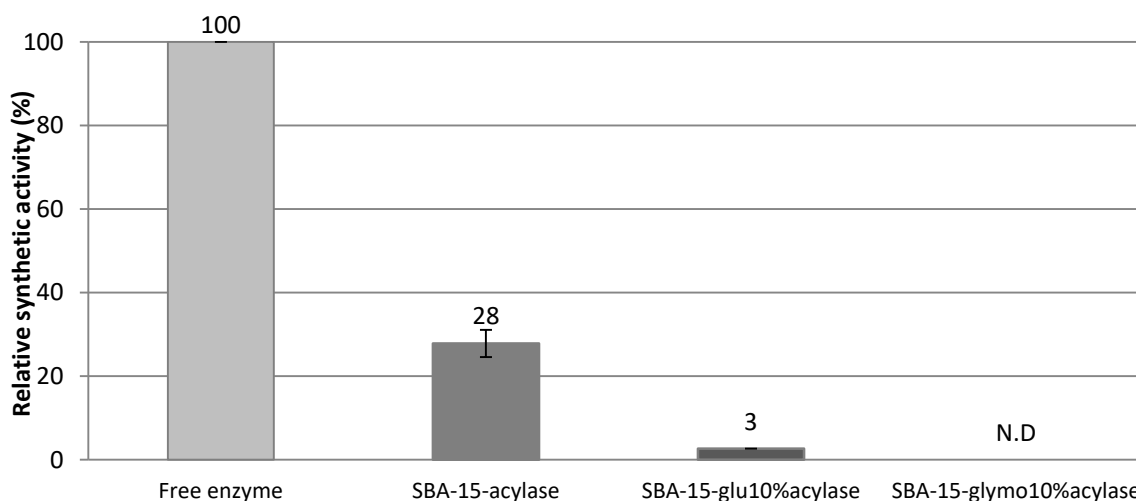


Figure 5.6: Synthetic enzyme activity assay with immobilized enzyme: SBA-15-glu^{10%}-acylase, SBA-15-glymo^{10%}-acylase and SBA-15-acylase comparison with free enzyme. (N.D: non detected)

Lysine acylation reaction catalyzed by commercial immobilized CALB (Novozym435[®]) with lauric acid led to mono-acylated product with a molecular mass of $M = 328 \text{ MS}^2$. Fragmentations for structural elucidation of this product generated two daughter ions, major ion ($m/z = 266$) corresponding to $[(\text{lauroyl-K}) - \text{H}_2\text{O} - \text{COOH} + \text{H}]^+$ and minor ion ($m/z = 293$) corresponding to $[(\text{lauroyl-K}) - 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$. The MS^2 profiles were consistent with MS^2 spectrum of mono-acylated standards, indicating the production of ϵ -lauroyl-lysine. No α -lauroyl-lysine was detected (Figure 5.7.A).

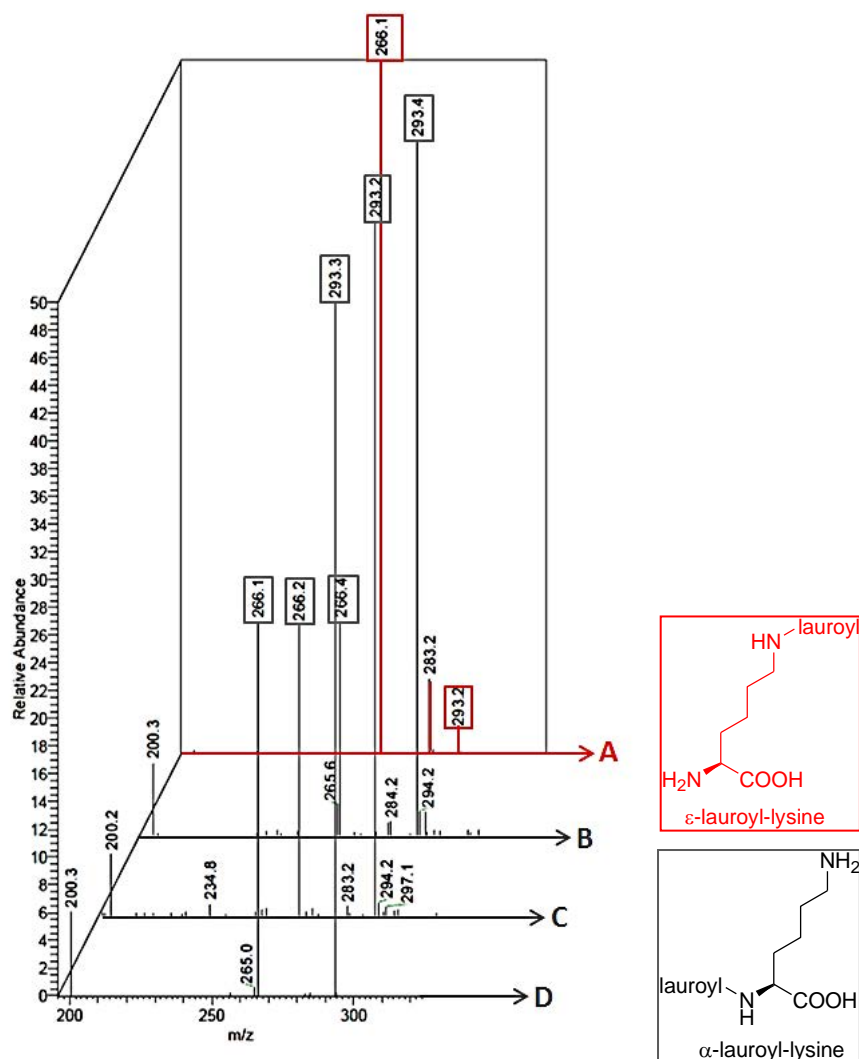


Figure 5.7: MS² spectra of lauroyl-lysine synthesized using

Surprisingly, when lysine acylation was catalyzed by free aminoacylases of *S. ambofaciens* another mono-acylated product with the same molecular mass ($M = 328$) but different MS² profile was formed (Figure 5.7.B). The major daughter ion corresponded to $[(\text{lauroyl-K}) - 2\text{H}_2\text{O} - \text{H}]^+$ ($m/z = 293$) and the MS² spectrum was consistent with the production of α -lauroyl-lysine. Up to now, this specific reaction has never been performed with free or immobilized enzymes.

In Figure 5.7 C and D the MS² profiles obtained with SBA-15-glu^{10%}-acylase or **SBA-15-acylase** were the same as the one obtained with the free enzyme. It can be concluded that the immobilization of aminoacylases onto SBA-15 support by chemisorption or physisorption did not change the regioselectivity of the lysine acylation reaction.

It should be outlined that it is the first time that the N-acylation on the α -position of the lysine or of the amino-acid in N-terminal position of peptides was performed with free or immobilized aminoacylases in aqueous medium. This opens new perspectives for the development of this type of enzymes and its complementary use compared to existing biocatalysts for acylated aminoacids synthesis.

2.5. Conclusion

The present work reports for the first time the original regiospecificity of aminoacylases from *S. ambofaciens* for the N-acylation of lysine in α -position. An immobilization procedure using physisorption is proposed allowing to maintain this regiospecificity and presenting performances higher than the already reported ones. It is important to note that this reaction was conducted in aqueous media, by opposition with previously described reactions taking place in organic solvents and ionic liquids. This is of utmost importance in the framework of acylation of polar molecules such as aminoacids and peptides. In future work, in order to improve the reusability of the supported biocatalyst, silylation and immobilization onto meso-macro materials will be considered to reduce desorption and improve synthetic activity performances of these original biocatalysts.

2.6. Acknowledgement

The work was financed by the ANR project n°ANR-15-CE07-0023: « Intensified & Sustainable Enzymatic Acylation Processes on Innovative Macroporous/Mesoporous Materials ».

2.7. Contribution de cet article

Ce travail avait pour objectif de développer un procédé de N-acylation enzymatique de la lysine en position α catalysée par les aminoacylases de *S. ambofaciens* immobilisées sur un support mésoporeux silicaté. L'immobilisation de ces enzymes devrait conduire à une meilleure stabilité globale de ces dernières ainsi qu'à la possibilité de les recycler, ce qui permettrait le développement de stratégie de biocatalyse en réacteur continu.

Dans une première partie les aminoacylases ont été immobilisées par chimisorption sur des supports SBA-15 fonctionnalisés par 2 molécules : le glutaraldéhyde (glu) ou le 3-glycidyloxypropyl-triméthoxysilane (glymo). Le maintien de l'activité enzymatique a été évalué par la mesure de l'activité hydrolytique de l'acétyl-lysine puis de l'activité de synthèse de lauroyl-lysine. Dans le cas des aminoacylases chimisorbées, les activités hydrolytiques et synthétiques ont été retrouvées avec de meilleurs résultats avec le SBA-15-glu-acylase avec un taux de greffage de 10 %. Cependant une importante perte d'activité a été observée, suite à l'immobilisation des aminoacylases par rapport aux enzymes libres. Différentes hypothèses peuvent expliquer cette perte d'activité telles que des limitations de transfert de masse au cœur du matériau, le blocage du site actif lors de l'immobilisation ou encore à de nombreuses liaisons covalentes lors de la chimisorption induisant une rigidification de l'enzyme.

Dans une seconde partie, l'immobilisation par physisorption a été étudiée. Les résultats obtenus ont montré un taux d'immobilisation et des activités enzymatiques supérieurs à ceux obtenus lors de l'immobilisation par chimisorption. Des investigations ont été réalisées sur la stabilité thermique ainsi que sur le potentiel de recyclage de ces enzymes physisorbées. Les résultats ont indiqué que l'immobilisation par physisorption a permis de stabiliser les enzymes lors d'un traitement thermique par rapport à l'enzyme libre. Cette stabilité conférée aux enzymes physisorbées a été confirmée après le recyclage des enzymes jusqu'à trois cycles. Cependant un phénomène de désorption a été mis en évidence lors de ces recyclages, avec des pertes allant jusqu'à 25 % à chaque cycle. Fait intéressant, l'activité spécifique enzymatique des enzymes demeurant sur le support à quant à elle été maintenue pendant 3 cycles.

En perspective, plusieurs pistes peuvent être explorées. Dans un premier temps, la synthèse de supports méso-macroporeux fonctionnalisés est envisagée afin d'augmenter la surface disponible pour éventuellement augmenter le taux d'immobilisation, tout en diminuant surtout les limitations de transfert de matière. Enfin, concernant le problème de désorption des enzymes, une étape de silylation post-physisorption des enzymes est envisagée.

3. Intensification du procédé d'acylation en réacteur micro-onde ou micro-fluidique

Dans cette partie le choix du réacteur a été étudié. En effet, de nombreux paramètres sont à prendre en compte lors de la réalisation de la réaction afin d'orienter correctement le choix du réacteur. Ces paramètres sont le milieu réactionnel, les substrats utilisés, le biocatalyseur utilisé, le type de catalyse utilisée (homogène / hétérogène) en procédé continu ou discontinu. Dans cette partie deux types de réacteurs vont être étudiés : d'une part un réacteur agité mécaniquement et chauffé par irradiation micro-onde et d'autre part un réacteur micro-fluidique utilisant le chauffage conventionnel.

Dans un premier temps, l'influence du mode de chauffage a été étudiée en solvant organique avec CALB et en milieu aqueux avec les aminoacylases de *S. ambofaciens*, par comparaison entre le chauffage dit « conventionnel » c'est-à-dire via un bain d'huile sur une plaque chauffante thermostatée et le chauffage par irradiations micro-onde. L'irradiation par micro-onde peut influencer la réaction par un effet thermique dû à un chauffage plus homogène du milieu réactionnel ainsi qu'un effet non-thermique pouvant être lié à une agitation moléculaire, favorisant le contact entre les molécules ou encore des interactions entre les molécules polaires et le champ électrique qui favoriseraient la formation d'intermédiaire tétraédrique (Fanti et al., 2015; Mazinani and Yan, 2016). Les effets non-thermiques sont étudiés par comparaison entre le chauffage par irradiation micro-onde et le chauffage conventionnel à une même température. En ce qui concerne l'acylation par des aminoacylases en milieu aqueux un réacteur micro-fluidique a été mis en œuvre afin d'améliorer le mélange de l'acide gras en milieu aqueux. Dans ce cas de milieu biphasique, l'hydrodynamique est d'une grande importance. Des comparaisons ont été réalisées entre les résultats de catalyse obtenue avec un réacteur agité mécaniquement par un barreau aimanté et un réacteur micro-structuré micro-fluidique utilisant une géométrie en forme de cœur pour réaliser et favoriser le mélange, adapté pour les mélanges de milieux biphasiques (Elgue et al., 2013).

3.1. Influence du mode de chauffage : conventionnel & microonde : CALB en solvant organique

Considérant les résultats obtenus dans le chapitre précédent sur la longueur de la chaîne de l'agent acylant sur les performances réactionnelles, les réactions d'acylation de la lysine catalysées par CALB ont été réalisées avec les acides oléique et laurique.

En l'absence de standard d' ϵ -lauroyl- et d' ϵ -oléoyl-lysine, les résultats ont été obtenus à partir d'une quantification par spectrométrie de masse à l'aide d'un standard interne, l'undecenoyl-phenylalanine. Ils sont donc représentés par un facteur d'efficacité relative, le facteur θ (§2.4.7 Chapitre 2).

$$\theta = \frac{\textit{Abondance relative}_{[X]}}{\textit{Abondance relative}_{[Xref]}} \times 100$$

ou [X] correspond à l'aire du pic de produit monoacylé issue des spectres MS et [X]ref l'aire du pic de référence correspondant à 24h de réaction en chauffage conventionnel (équilibre thermodynamique atteint)

Dans un premier temps, les effets non-thermiques de l'irradiation par micro-onde ont été étudiés. Sur la Figure 5. 8 sont représentés les facteurs θ correspondant au rapport entre la quantité produite dans une condition donnée et celle obtenue après 24h de réaction en chauffage conventionnel. Lors de la comparaison entre deux réactions d'une heure mais de mode de chauffage différent, une amélioration de θ passant de 4 % avec le chauffage conventionnel à 13 % avec l'irradiation par micro-onde a été mise en évidence. Les résultats obtenus en 1h30 en réacteur micro-onde indiquent une augmentation d'un facteur 16 par rapport au chauffage conventionnel pendant 1h. Aucun impact de l'irradiation sur la régiosélectivité de l'enzyme n'est observé. Ces résultats montrent que l'irradiation par micro-onde permet une augmentation de la vitesse de réaction pour la production d' ϵ -lauroyl-lysine.

Cette même étude a également été réalisée pour la réaction d'acylation de la lysine avec l'acide oléique, les résultats sont représentés sur la Figure 5. 9. La même tendance est observée pour cette réaction avec un facteur θ de 3 % pour 1h en chauffage conventionnel à 27 % pour 1h en réacteur chauffé par micro-onde. De plus, une amélioration de la production d' ϵ -oléoyl-lysine d'un facteur 15 est obtenu entre 1h30 en réacteur micro-onde et 1h de chauffage conventionnel. Cet effet favorable observé peut être dû soit à une meilleure homogénéisation de la température, soit à des effets non-thermiques (Réjasse et al., 2007, 2006, 2004).

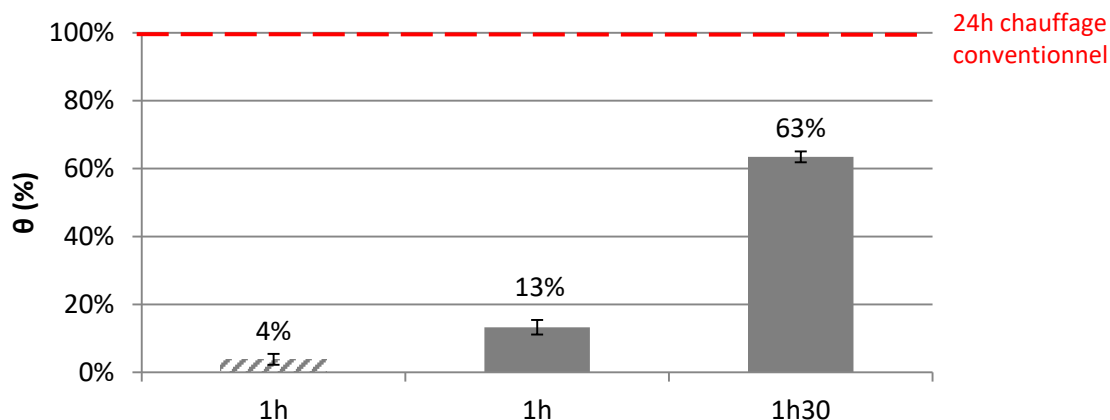


Figure 5. 8: Comparaison des facteurs θ de la réaction d'acylation de la lysine avec l'acide laurique catalysé par CALB dans du M_2B_2 à 55°C, en réacteur conventionnel et en réacteur micro-ondes histogramme à motif : conventionnel ; plein : micro-onde.

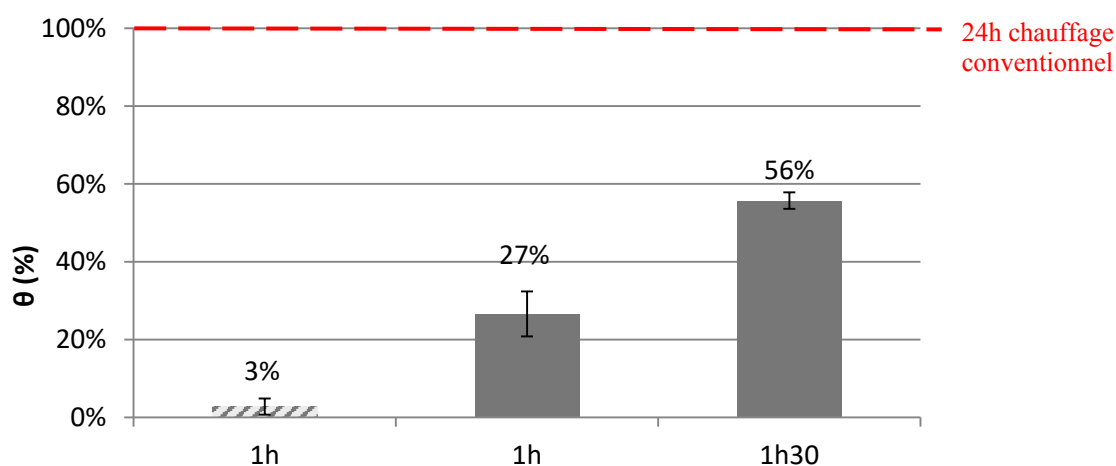


Figure 5. 9: Comparaison des facteurs θ de la réaction d'acylation de la lysine avec l'acide oléique catalysé par CALB dans du M_2B_2 à 55°C, en réacteur conventionnel et en réacteur micro-ondes histogramme à motif : conventionnel ; plein : micro-onde.

La synthèse d'oléoyl-lysine a également été réalisée en réacteur conventionnel et micro-onde à 70°C. La comparaison des échantillons correspondant à 24h de réaction réalisée à 55°C et 70°C en chauffage conventionnel montre un facteur 13,5 fois plus élevé en faveur de la réaction à 70°C, ce qui nous permet de confirmer la présence d'un effet thermique très conséquent sur l'augmentation de l'activité enzymatique.

Les résultats présentés en Figure 5. 10 sont les facteurs θ calculés avec comme référence l'échantillon à 24h de chauffage conventionnel à 70°C. Les résultats obtenus pour

l'échantillon à 1h de chauffage conventionnel indiquent une vitesse de réaction qui est accrue par rapport aux réactions réalisées à 55°C puisque à 1h de réaction, un facteur de 11 % est obtenu à 70°C contre 3 % seulement à 55°C. Une nette amélioration du facteur θ est observée puisque ce dernier passe de 11 % à 57 % (facteur 5) en utilisant le chauffage micro-onde par rapport au chauffage conventionnel durant 1h à 70°C, révélant une action autre que simplement thermique du chauffage micro-onde sur la réaction. En augmentant le temps de réaction sous réacteur micro-onde à 3h les performances sont quasi équivalentes à celle obtenues en 24h de réaction en chauffage conventionnel.

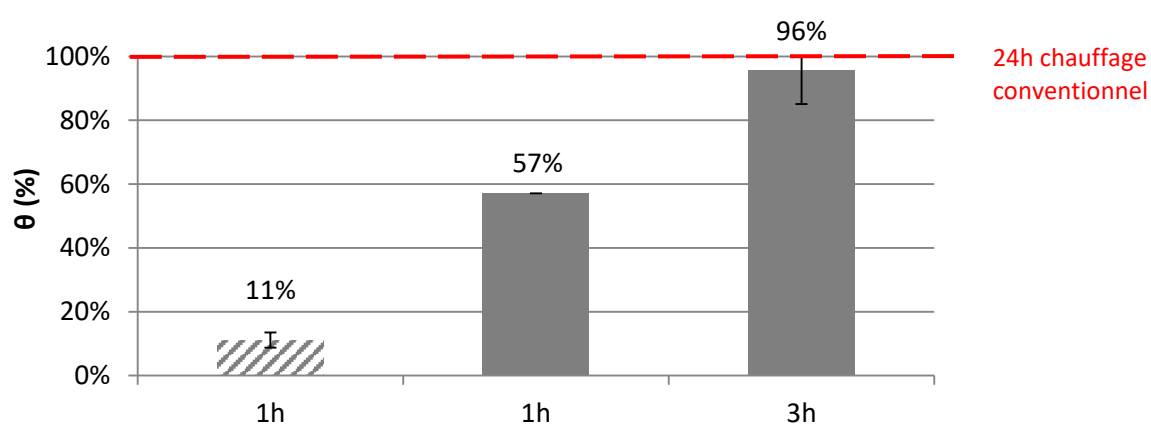


Figure 5. 10: Comparaison des facteurs θ de la réaction d'acylation de la lysine avec l'acide oléique catalysé par CALB dans du M_2B_2 à 70°C, en réacteur conventionnel et en réacteur micro-ondes histogramme à motif : conventionnel ; plein : micro-onde.

En conclusion de cette étude comparative du mode de chauffage, il apparaît clairement que les performances réactionnelles sont très dépendantes de la température appliquée, mais également du mode de chauffage. Dans le cas de l'acylation de la lysine catalysée par CALB, l'irradiation par micro-onde permet toujours une augmentation significative de l'activité enzymatique par rapport au chauffage conventionnel.

Les résultats obtenus indiquent donc l'implication d'effets thermiques et non-thermiques dans l'intensification des réactions étudiées. Les effets non thermiques pouvant être la présence d'une agitation des groupements polaires des substrats et/ou CALB agissant sur la réactivité des molécules. Ces résultats sont cohérents avec les études sur les effets des irradiations micro-onde sur CALB. En effet des études ont montré que CALB possède une stabilité thermique comparable entre le chauffage conventionnel et les irradiations par micro-onde

(Kidwai et al., 2009; Rouillard et al., 2014; Rouillard and Thiery, 2013). La présence d'effets non-thermiques a également été observée sur CALB en réalisant des comparaisons de mode de chauffages à même température. Ces effets sont généralement favorables au chauffage micro-onde et permettent un accroissement de la vitesse de la réaction. Dans une étude réalisée par Réjasse (2004), une amélioration de la stabilité de Novozym 435® a été observée lors d'une comparaison entre chauffage conventionnel et chauffage par irradiation microonde. L'hypothèse émise ici est la présence de modifications de la flexibilité de la protéine sous l'effet du champ électromagnétique ce qui lui confèrerait des propriétés différentes et une stabilité améliorée (Réjasse et al., 2004).

La biocatalyse sous irradiation micro-onde est dépendante de la température, du solvant, de la puissance mais surtout de la nature de l'enzyme utilisée. La réaction de N-acylation catalysée par CALB semble être adaptée à ce mode de chauffage, il serait donc intéressant d'optimiser cette réaction dans ce type de réacteur. De plus une étude menée par Rouillard (2014), a montré que la puissance de l'irradiation pouvait avoir un impact positif mais aussi négatif en fonction de la réaction ; il serait donc intéressant d'observer cet effet sur la N-acylation d'acide aminé (Rouillard et al., 2014).

3.2. Influence du mode de chauffage : aminoacylases en milieu aqueux

Dans la littérature, les effets des irradiations micro-ondes sur l'activité enzymatique en milieu aqueux sont très divergents. Certaines études ont conclu à une amélioration de l'activité enzymatique (Bradoo et al., 2002). D'autres n'ont constaté aucun effet et certaines ont constaté une inactivation de l'enzyme (Zhao, 2010; Zhu et al., 2006). Les effets des irradiations micro-ondes sur une réaction enzymatique en milieu aqueux semblent donc varier en fonction de la composition du milieu et du biocatalyseur. La possibilité d'intensifier, en réacteur micro-onde, la réaction d'acylation de la lysine avec l'acide laurique lorsque celle-ci est catalysée par le mélange d'aminacylases de *S. ambofaciens* a donc été étudiée et des tests par ajout progressif de solvant ont été réalisés. En possession du standard α -lauroyl-lysine, le produit a pu être quantifié directement. La Figure 5. 11 représente donc les taux de conversion de réactions réalisées après 1h à 45°C, soit dans le tampon Tris (25 mM) NaCl (50 mM) à pH 8, soit dans du M₂B₂ ou dans un mélange tampon/M₂B₂ (50/50). Ces résultats montrent une baisse de rendement de 9 % en chauffage conventionnel à 1,7 % avec le chauffage par irradiation micro-onde lorsque la réaction est réalisée en milieu aqueux. Il semblerait donc

que les irradiations micro-ondes ont dans le cas de cette réaction un effet inhibiteur pouvant être dû à une inactivation des enzymes.

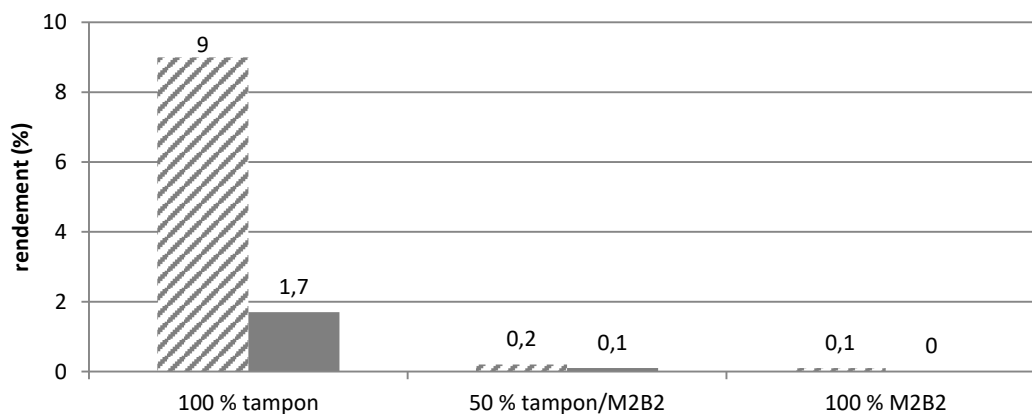


Figure 5. 11: Taux de conversion après une 1h de synthèse d'α-lauroyl-lysine catalysée par les aminoacylases de *S. ambofaciens* dans différents milieux réactionnels. Histogramme à motif : conventionnel ; plein : micro-onde.

Des tests complémentaires ont été réalisés en solvant organique-aqueux 100 % et 50 %. Les résultats montrent une perte d'activité enzymatique déjà présente lors de la réaction réalisée en chauffage conventionnel. Cette perte d'activité est donc également liée à la présence de solvant organique. Lors du chauffage par irradiations micro-ondes, la perte d'activité est également constatée. Il semble donc que la réaction d'acylation catalysée par *S. ambofaciens* (i) ne soit pas réalisable en présence de solvant organique et (ii) que cette même réaction en milieu aqueux ne soit pas compatible avec un chauffage par irradiation micro-onde. L'intensification ne semble pas pouvoir être envisagée par irradiations micro-ondes dans le cas de la mise en œuvre des réactions d'acylation par les aminoacylases de *S. ambofaciens*. Cependant, il n'est pas impossible qu'en modifiant le pH, la force ionique, la nature du tampon et la puissance d'irradiation, de meilleurs résultats puissent tout de même être obtenus. C'est une voie qui serait tout de même intéressante à explorer étant donné l'intérêt catalytique des amino-acylases.

3.3. Influence du mode d'agitation

Puisque l'intensification des aminoacylases ne semble pas pouvoir être envisagée en réacteur microonde, un autre mode d'intensification a été étudié. La réaction avec les aminoacylases ayant lieu en milieu biphasique, l'influence du mode d'agitation sur la réaction d'acylation de la lysine avec l'acide oléique catalysée par les aminoacylases de *S. ambofaciens* dans un milieu aqueux a été étudiée. Dans un premier temps, la réaction a été réalisée en système agité par un barreau aimanté à 250 rpm avec une sonication préalable des substrats pour favoriser la formation d'une émulsion. Les rendements obtenus avec et sans sonication sont présentés dans le Tableau 5. 2. Une amélioration significative du rendement est obtenue avec l'ajout de l'étape de sonication, celle-ci permet donc une amélioration de l'émulsion dans la réaction et démontre l'importance de l'homogénéisation du milieu. L'étape de sonication a donc été maintenue par la suite pour les autres réactions.

Dans un second temps, la vitesse d'agitation a été étudiée. Les résultats ont indiqué qu'à 50 rpm la vitesse d'agitation est trop faible, que l'émulsion n'est pas stable et qu'une séparation de phases apparaît, alors qu'à 500 rpm aucune différence significative n'est obtenue par rapport à 250 rpm. En effet, il a été décrit qu'un bon mélange augmente le taux de conversion de la réaction, par contre, une agitation trop forte peut induire la désactivation des enzymes et donc une réduction de l'efficacité de la réaction (Ingesson et al., 2001). Dans l'étude de Mussatto (2008), la désactivation des enzymes est expliquée par la présence de trop fortes forces de cisaillement présentes lors d'une agitation excessive (Mussatto et al., 2008). Ces observations montrent l'importance de la mise en œuvre d'une agitation permettant un bon mélange afin de pallier les limitations de transfert de masse, ainsi que l'obtention d'un milieu le plus homogène possible sans appliquer trop de contraintes sur les biocatalyseurs.

Tableau 5. 2: Rendement de la réaction d'acylation de la lysine et de l'acide oléique catalysées par les aminoacylases de *S. ambofaciens* à 45°C dans du tampon Tris (50 mM) NaCl (25 mM) à pH 8 avec ou sans sonication et à différentes vitesses d'agitation.

		Rendement à 24h (%)
Sans sonication 250rpm		12 ± 1
Sonication	50 rpm	< 0
	250 rpm	18 ± 2
	500 rpm	16 ± 3

Les résultats obtenus confirment l'aspect primordial de la réalisation d'un bon mélange ; à cette fin, des réacteurs de type microstructurés microfluidique ont été développés.

Les cinétiques de synthèse d'oléoyl-lysine avec agitation par barreau aimanté et agitation en réacteur micro-fluidique à différents débits sont représentées sur la Figure 5. 12 et les rendements de ces réactions sont indiqués dans le Tableau 5. 3. Les cinétiques ont été réalisées en parallèle soit en réacteur batch agité soit en réacteur batch avec recirculation du milieu réactionnel dans un réacteur microstructuré microfluidique (Corning®Advanced-Flow™ Reactors LF).

Les résultats obtenus montrent qu'à un débit de $0,5 \text{ ml.mn}^{-1}$ aucune différence significative n'est observée, avec les réactions sous agitation mécanique à 250 rpm après 24h de réaction. Cependant, une augmentation du débit en réacteur micro-fluidique à 1 ml.mn^{-1} a pour conséquence une amélioration significative de la réaction permettant d'obtenir très rapidement $33 \pm 8 \%$ de taux de conversion. L'équilibre thermodynamique est en effet atteint au bout de 3h seulement alors qu'il n'est toujours pas atteint après 24 h dans les autres conditions. L'agitation par réacteur micro-fluidique semble donc permettre une amélioration de la réaction probablement en réduisant les contraintes causées par l'agitation sur les biocatalyseurs tout en permettant un bon maintien du mélange.

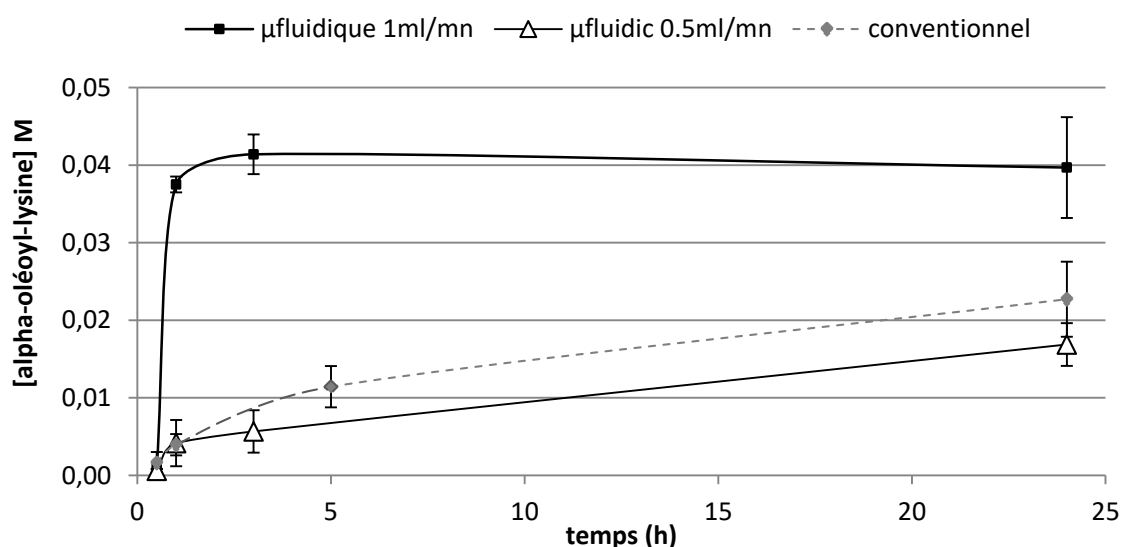


Figure 5. 12: Concentration en α -oléoyl-lysine (M) produite sur 24h de réaction par les aminoacylases de *S. ambofaciens* à 45°C dans du tampon Tris (50 mM) NaCl (25 mM) à pH 8 dans différentes conditions d'agitation.

Tableau 5. 3: Rendement de la réaction d'acylation de la lysine et de l'acide oléique catalysées par les aminoacylases de *S. ambofaciens* à 45°C dans du tampon Tris (50 mM) NaCl (25 mM) à pH 8 en réacteur micro-fluidique à différents débits en comparaison avec les résultats de réaction à 250 rpm.

Conditions d'agitation (avec sonication)	Rendement à 24h (%)
250 rpm	18 ± 2
μfluidique (0,5 ml.mn ⁻¹)	14 ± 2
μfluidique (1 ml.mn ⁻¹)	33 ± 8

En conclusion, ces résultats préliminaires ont permis de montrer que l'agitation en réacteur microstructuré permet d'intensifier significativement la réaction d'acylation de la lysine avec l'acide oléique catalysée par les aminoacylases de *S. ambofaciens* en milieu aqueux. L'utilisation d'un réacteur microstructuré permettrait donc d'améliorer le micromélange et de favoriser les interactions enzymes-substrat en milieu biphasique

4. Conclusion du chapitre

L'objectif de ce chapitre était de trouver des conditions de mise en œuvre permettant l'intensification de la réaction d'acylation, que ce soit pour les lipases ou les acylases. Plusieurs voies sont possibles pour atteindre cet objectif : i) immobiliser le catalyseur pour le stabiliser et pouvoir le recycler, ii) étudier l'impact d'un procédé microonde, iii) comparer des configurations de réacteurs, sachant que dans un milieu biphasique, le mélange est primordial.

Une étude préliminaire sur l'immobilisation des aminoacylases de *S. ambofaciens* a été réalisée. En effet, ces enzymes récemment découvertes et décrites dans le chapitre 4 possèdent des propriétés très intéressantes telles que la catalyse de la réaction d'acylation en milieu aqueux des acides aminés ou des peptides bioactifs en particulier sur la fonction amine en position α . C'est pourquoi une immobilisation de ces enzymes paraît pertinente en vue de leur mise en œuvre en réacteur continu et de leur recyclage.

Au cours de cette étude sur l'immobilisation de ces enzymes, différentes méthodes d'immobilisation ont été comparées afin de cibler la méthode adéquate. Les résultats obtenus ont permis de montrer que l'immobilisation par chimisorption engendrait une perte d'activité hydrolytique et synthétique importante alors qu'une physisorption permettait l'immobilisation d'une plus grande quantité d'enzyme. L'immobilisation a permis d'améliorer la thermostabilité des enzymes et de réaliser trois recyclages, tout en maintenant l'activité spécifique des enzymes. Cependant un phénomène de désorption a été mis en évidence lors de ces recyclages, avec des pertes allant jusqu'à 25 % à chaque cycle. Il a également été observé une perte d'activité par rapport aux enzymes libres probablement liée à des limitations de transfert de masse ou un accès réduit au site actif ou à une perte de flexibilité. Pour pallier ces problèmes, en perspective de ce travail, l'ajout d'une étape de silylation afin d'empêcher la désorption des enzymes ainsi que l'emploi de matériaux de type méso-, macroporeux sont envisagés pour favoriser les transferts de masse cruciaux pour la catalyse

Dans une seconde partie, la biocatalyse sous irradiations micro-ondes a été étudiée. Tout d'abord, les effets de ce type de chauffage ont été observés en catalyse hétérogène avec Novozym435® en solvant organique. Les résultats obtenus ont indiqué que la réaction de N-acylation catalysée par CALB semble être adaptée à ce mode de chauffage. L'impact positif de l'augmentation de la température sur les taux de conversion a été démontré ainsi que la présence d'effets non thermiques également responsables d'une amélioration des performances de la réaction. Par contre, les réactions de N-acylation en catalyse homogène

avec les aminoacylases de *S. ambofaciens* en milieu aqueux ont permis de mettre en évidence une incompatibilité de ce mode de chauffage sur cette réaction, dans nos conditions réactionnelles. Les influences respectives ou combinées du pH, de la molarité, de la force ionique et de la nature du tampon tout comme de la puissance du chauffage μonde sur l'acylation dans l'eau demeurent cependant intéressantes à étudier.

L'utilisation du chauffage par micro-ondes semble donc être une piste intéressante pour l'intensification de la réaction de N-acylation par CALB en solvant organique.

Dans une dernière partie, le mode d'agitation a été étudié dans le cas de l'acylation en milieu aqueux par les aminoacylases. La N-acylation étant réalisée ici en présence d'une émulsion de l'acide gras dans le tampon de réaction, l'optimisation de l'aspect hydrodynamique semble importante. Les résultats obtenus ont permis d'établir que l'utilisation d'un réacteur microstructuré permettait d'augmenter significativement le taux de conversion de ces réactions et également leurs vitesses.

Conclusion générale

L'objectif de ces travaux de thèse était d'étudier les voies possibles d'amélioration de la réaction de N-acylation d'acides aminés par voie enzymatique par une approche multi-échelle : moléculaire, réactionnelle et procédé. L'intérêt de la N-acylation d'acides aminés a déjà été largement décrit. En effet, ces molécules constituent une classe d'agents tensioactifs avec d'excellentes propriétés de surface, des activités biologiques intéressantes, un faible potentiel de toxicité et un faible impact environnemental. Pour pallier les limitations de cette voie enzymatique par rapport à la voie chimique actuellement utilisée dans l'industrie, ce travail a cherché à améliorer la compréhension de cette réaction à différentes échelles.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la catalyse de la réaction de N-acylation de la lysine par CALB. À l'échelle moléculaire, les questions scientifiques auxquelles nous avons cherché à apporter des réponses étaient les suivantes :

- **Y-a-t-il des changements conformationnels induits par la lysine ? (induced fit effect)**
- **L'orientation de la lysine a-t-elle un impact sur la conformation des résidus de la cavité et notamment les résidus catalytiques ?**
- **Les réponses à ces différentes questions peuvent-elles être corrélées à la faisabilité, l'efficacité et la sélectivité réactionnelle ?**
- **Quelles sont les règles qui régissent cette régiosélectivité ? (Chapitre 3 : échelle moléculaire)**

À l'échelle moléculaire, le but recherché était de développer un outil d'amélioration de la compréhension du mécanisme réactionnel d'une enzyme de structure connue et déjà utilisée dans l'industrie, CALB. Dans le souci de proposer un outil prédictif pertinent, des méthodes de simulation peu coûteuses en temps de calcul ont été privilégiées. Pour cela une méthodologie associant des simulations de docking et des calculs d'interactions a été développée.

Au point de départ de cette étude, l'acyl-CALB et le ligand étudié ont été obtenus à partir de l'acyl-enzyme construite et optimisée lors des travaux de thèse de Ferrari (2014), afin de

réaliser les simulations de la réaction d'acylation. Pour réaliser cette étude, nous nous sommes concentrés sur la réaction de N-acylation de la lysine par l'acide laurique. En effet, cet acide aminé est un substrat de choix pour réaliser une étude sur l'efficacité et la régiosélectivité de CALB.

L'échantillonnage de l'espace conformationnel du lauroyl-CALB et de la lysine a été réalisé par un protocole de docking flexible au cours duquel la flexibilité de chaînes latérales d'acides aminés représentatifs du site actif a été explorée. Le protocole choisi a été mis au point par l'équipe de Koska en 2008. Les résultats ont montré que la lysine pouvait être orientée avec l'un ou l'autre de ces groupements NH_2 vers le fond du site actif. Les différentes poses issues de la simulation de docking flexible ont ensuite été étudiées. Tout d'abord par la mesure de deux critères de distances déjà décrits dans plusieurs études comme permettant de trier les complexes obtenus, ceux ne respectant pas les critères de distance étant considérés comme « non-productifs » (De Oliveira et al., 2009; Ferrari et al., 2014). Les résultats obtenus ont indiqué plusieurs poses respectant les critères de distances indépendamment de l'orientation malgré une distance par rapport à l'His224, résidu catalytique, qui semble limitante en orientation α . Les résultats expérimentaux ont montré une N-acylation de la lysine dirigée sur son groupement NH_2 en position ϵ , l' α -lauroyl-lysine n'ayant été observé que dans de très rares cas et sous forme de trace. Ces résultats semblent donc indiquer que les critères de distances, dans le cas de l'acylation de la lysine, sont nécessaires mais non suffisants pour trier les complexes « productifs », des complexes « non-productifs ».

Afin de pallier cette limitation, une étape supplémentaire de calcul d'énergie d'interaction électrostatique des résidus Ser105 et His224 a été réalisée (Domagała et al., 2011). Ces calculs ont permis l'obtention de résultats très intéressants montrant que l'orientation en position α de la lysine ne permet dans aucun des cas l'interaction avec l'Histidine catalytique. Alors que, pour l'orientation ϵ , une nette concordance apparaît entre le respect des critères de distance et les énergies électrostatiques d'interaction. Ces résultats indiquent donc clairement une régiosélectivité dirigée vers le groupement amine en position ϵ , cohérente avec les résultats expérimentaux. Il semble que l'association de simulations de docking flexible, de mesures de distances ainsi que des calculs d'énergie d'interaction électrostatique sur les poses respectant les critères de distances constitue une méthodologie permettant de prédire l'efficacité et la régiosélectivité de réactions d'acylation catalysées par CALB avec peu de temps de calcul.

L'étude suivante a eu pour but de comprendre les règles de cette régiosélectivité. Tout d'abord, l'observation de la flexibilité des résidus par détermination de RMSD par rapport à l'acyl-enzyme de départ a permis d'observer que, globalement, l'orientation n'avait que peu d'impact sur les mouvements des chaînes latérales. Cependant, un phénomène de retournement de l'His224 a été observé. Celui-ci provoquerait un éloignement entre les atomes du cycle imidazole impliqué dans un transfert de proton faisant parti du mécanisme catalytique et les deux autres résidus catalytiques qui l'entourent (Ser105 et Asp187). En observant ce phénomène en fonction de l'orientation de la lysine, il est apparu que ce positionnement défavorable de l'His224 se produit le plus souvent avec l'orientation α . Ce phénomène met en cause l'His224 dans la régiosélectivité de cette réaction de N-acylation.

En complément de cette étude, la détermination des énergies d'interactions électrostatiques a été réalisée sur les résidus représentatifs de la cavité catalytique afin d'identifier d'éventuelles interactions pouvant causer cette régiosélectivité. Les résultats obtenus ont permis d'identifier l'implication de certains résidus dans l'éloignement ou le rapprochement avec les résidus catalytiques, tels que l'Asp134 qui est apparu comme un résidu permettant de tirer le ligand vers le fond de la cavité.

En complément de cette étude une question supplémentaire a été considérée :

- **La nature de la chaîne acyle a-t-elle un effet sur la conformation de la cavité catalytique et sur les modes d'interaction de la lysine avec la cavité ?**

Dans cette étude de l'impact de la chaîne carbonée sur la réaction d'acylation, des simulations de docking flexible ont été réalisées sur plusieurs acyl-CALB présentant des chaînes carbonées de longueur différente : capryloyl-, lauroyl-, palmitoyl- et oléoyl-CALB. Les résultats ont montré que la nature de la chaîne carbonée de l'acyle avait un impact. En effet, l'analyse de toutes les distances d'intérêt au sein des complexes suggère une sélectivité dirigée sur la fonction amine ϵ de la lysine ainsi qu'une efficacité réactionnelle plus importante avec l'acide oléique, comparativement aux autres donneurs d'acyle. Ce qui a été vérifié expérimentalement dans le chapitre suivant.

Au cours de cette étude de la N-acylation de la lysine par CALB à l'échelle moléculaire une méthodologie permettant d'améliorer la compréhension des règles régissant la sélectivité et la réactivité de CALB a été développée.

Cet outil associant docking et calcul d'énergie d'interaction électrostatique semble pertinent afin d'envisager l'efficacité et la sélectivité d'une réaction d'acylation catalysée par CALB. Cet outil pourrait permettre de cribler rapidement les ligands pouvant être acylés efficacement par CALB et prévoir la nature du produit qui sera obtenu. Une meilleure compréhension des interactions entre le site actif et le ligand peut également guider ce choix. Ces informations sur les interactions avec les résidus du site actif peuvent également donner des indications intéressantes lorsque l'on souhaite effectuer de l'ingénierie enzymatique. Il serait intéressant de réaliser les calculs d'énergies d'interactions électrostatiques de la Ser105 et de l'His224 pour tous les acyl-CALB étudiés. Enfin, tester la méthodologie mise au point sur d'autres acides aminés et peptides permettrait d'explorer *in-silico* les possibilités d'acylation de CALB et ainsi de faciliter et d'orienter les prises de décision quant au choix des expériences à réaliser préférentiellement.

De plus, à titre indicatif, un calcul DFT permettrait peut-être de valider une énergie d'activation moins importante lorsque l'acylation est dirigée vers le groupement NH₂ en position ϵ .

À l'échelle réactionnelle, nous avons tenté d'apporter des éléments de réponse à la question suivante :

→ **Quel est l'impact d'un changement de biocatalyseur, de substrats, sur la sélectivité et les performances ?** (Chapitre 4 : échelle réactionnelle)

À l'échelle réactionnelle, l'objectif de notre étude était de déterminer expérimentalement le potentiel de différents biocatalyseurs lors de réactions de N-acylation de différents substrats acylés, aussi bien au niveau réactionnel qu'au niveau de la sélectivité. Pour cela, cette étude a démarré par une évaluation de l'activité aminoacylase dans un surnageant de culture de *S.ambofaciens* ATCC23877. Des activités d'hydrolyse de lysines acétylées sur leur groupement amine en position α et ϵ ont été observées ainsi qu'une activité d'acylation de lysine, SYK et LQKW avec l'acide oléique. En comparant les produits acylés obtenus lors de

ces réactions, avec les produits des mêmes réactions, mais catalysées par CALB des différences ont été observées. En effet, en réalisant une étude structurale par CLHP-MS-MS des molécules acylées issus de ces réactions, une différence de régiosélectivité a été montrée entre les deux biocatalyseurs. Il est apparu que les aminoacylases de *S. ambofaciens* possèdent une régiosélectivité majoritairement dirigée vers le groupement N-terminal de la lysine alors que dans le cas de CALB, la lysine est préférentiellement acylée sur le groupement amine en position ϵ . Cette différence de sélectivité vient donc s'ajouter au fait que les aminoacylases réalisent l'acylation en milieu aqueux contrairement à CALB. Ces enzymes possèdent donc un potentiel très prometteur concernant la synthèse d'acides aminés/peptides acylés. En effet, la régiosélectivité orientée vers les groupements N-terminaux est un atout très peu décrit à ce jour, et qui permet d'acyler ces molécules sans modifier leurs chaînes latérales et donc leurs fonctionnalités. Ce potentiel des aminoacylases à acyler de nombreux acides aminés ou peptides devra être confirmé en élargissant les investigations à des substrats azotés autres que la lysine ou les peptides SYK et LQKW.

En complément de cette étude, il a été observé que la nature du donneur d'acyle et notamment la longueur de sa chaîne carbonée n'avait pas d'impact sur la régiosélectivité quel que soit le biocatalyseur utilisé. De plus, des taux de conversion équivalents ont été obtenus dans le cas de l'acylation de la lysine avec l'acide laurique. L'utilisation d'un extrait protéique contenant plusieurs enzymes empêche la détermination de l'activité spécifique de l'enzyme afin de comparer véritablement avec CALB. Pour cette raison l'extrait protéique de *S. ambofaciens* a été étudié par comparaison des séquences génomiques de *S. ambofaciens* avec les gènes des aminoacylases précédemment découverte chez *S. mobaraensis*. Les résultats obtenus ont montré : 78% de similitude entre SAM23877_0977 et Sm-PVA, 85% de similitude entre SAM23877_1485 et Sm-eLA, ainsi que 93% de similitude entre Sam-AA et SAM23877_1734. Une quatrième séquence, SAM23877_6191 possédant 65% de similitude Sm-AA a également été découverte. Afin de rechercher la ou les enzymes responsables de cette activité aminoacylase des mutants de délétion ont été construits et leurs activités étudiées. À partir de ces résultats deux aminoacylases ont été identifiées comme responsables de l'activité hydrolytique dirigé vers l'N-acétyl-L-lysine avec deux sélectivités différentes. En effet, le produit du gène SAM23877_1485 réalise principalement l'hydrolyse de l'N- ϵ -acetyl-L-lysine alors que le produit du gène SAM23877_1734 possède la capacité d'hydrolyser préférentiellement la N- α -acétyl-L-lysine. Il est donc possible d'imaginer que le produit du

gène *SAM23877_1734* soit principalement responsable de l'acylation régiosélective sur le groupement N-terminal de la lysine ainsi que des deux peptides SYK et LQKW.

D'autres études à l'échelle réactionnelle ont été réalisées plus spécifiquement sur CALB afin d'observer l'impact de la nature des substrats. Tout d'abord l'impact de la nature du donneur d'acyle en comparant les taux de conversion obtenus ainsi que la nature du produit dans le cas de l'acylation de la lysine. Il est apparu qu'avec les longueurs de chaînes carbonées de : 8, 12 et 16 carbones la régiosélectivité est très majoritairement orienté vers la N-acylation en position ϵ même si quelques traces d' α -acyl-lysine peuvent apparaître. Lors de l'acylation de la lysine avec l'acide oléique seul l' ϵ -oléoyl-lysine a été observé. Ces résultats sont parfaitement cohérents avec ceux obtenus précédemment lors de l'étude réalisée à l'échelle moléculaire. Au niveau des performances réactionnelles, les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'acide laurique et l'acide oléique. Il a également été constaté que l'acide palmitique n'était pas un substrat de choix pour cette réaction. Puis, une étude expérimentale et théorique a été réalisée sur l'impact de la nature du substrat accepteur d'acyle. Cette étude a permis d'observer que dans le cas d'une réaction catalysée par CALB en solvant organique plusieurs paramètres devaient être pris en compte. En effet, la forme profonde et étroite de la cavité catalytique de CALB peut engendrer des phénomènes stériques pouvant impacter la réaction.

Au cours de cette étude de la N-acylation enzymatique à l'échelle réactionnelle, les aminoacylases de *S. ambofaciens* et CALB ont montré un potentiel très intéressant pour la réalisation de cette réaction proposant des régiosélectivités différentes dans des milieux réactionnels différents. Pour les réactions catalysées par CALB, des donneurs d'acyles préférentiels ont été identifiés, les acides laurique et oléique. Il serait intéressant de tester ces réactions dans des milieux originaux tels que des solvants eutectiques... Il serait également intéressant de rechercher au travers de la modélisation moléculaire les raisons du faible taux de conversion obtenu lors de l'acylation de la lysine avec l'acide palmitique. En effet, quelques différences avaient été observées au niveau des résultats de RMSD pour les simulations réalisées avec cette acyle-enzyme. De plus, la faible solubilité des acides aminés en solvant organique a été mise en cause, en particulier dans le cas de l'acylation de la glycine. Afin d'éliminer ce problème, plusieurs voies sont envisageables comme la modification structurale du substrat ou encore le changement de température de réaction et l'amélioration de la dispersion du substrat (sonication, cell disrupteur).

Les aminoacylases de *S. ambofaciens* ont un fort potentiel du point de vue de la régiosélectivité tout en catalysant cette réaction en milieu aqueux. Il semble que le gène codant pour l'enzyme responsable de cette activité ait été identifié ; pour cette raison la production hétérologue ainsi que la purification de cette enzyme est en cours de réalisation. En attendant, la capacité de ce mélange d' aminoacylases à acyler d'autres acides aminés et peptides doit être explorée.

Enfin à l'échelle du procédé, dans une dernière partie de cette étude, nous sommes attachés à répondre aux questions suivantes :

- **Quel est l'impact de l'immobilisation sur les aminoacylases de *S. ambofaciens* ?**
Quel est l'impact du mode de chauffage, d'agitation sur les performances réactionnelles ? (Chapitre 5 : échelle du procédé)

À l'échelle du procédé, l'objectif était de trouver des conditions de mise en œuvre permettant d'améliorer la réaction de N-acylation quel que soit le biocatalyseur utilisé (immobilisé ou libre). Dans le cas des aminoacylases de *S. ambofaciens*, celles-ci étant sous forme soluble, une étude préliminaire portant sur la possibilité de les immobiliser a été réalisée. Les résultats obtenus ont montré que l'immobilisation par chimisorption engendrait une perte d'activité hydrolytique et synthétique alors qu'une physisorption permettait l'immobilisation d'une plus grande quantité d'enzyme. La perte d'activité peut être attribuée à des limitations diffusionnelles ou encore à de trop fortes contraintes appliquées sur les enzymes dont on ne connaît pas la structure, mais qui pourrait être multimérique comme c'est souvent le cas avec les acylases. Malgré cela, l'activité synthétique ainsi que la régiosélectivité des aminoacylases ont été maintenues. De plus, l'immobilisation par physisorption a permis d'améliorer la thermo-stabilité des enzymes et a permis 3 recyclages avec un maintien de l'activité spécifique des enzymes. Cependant, un important phénomène de désorption a été mis en évidence lors de ces recyclages. Cette étude préliminaire a permis de déterminer les conditions adéquates d'immobilisation des aminoacylases qui sera une étape importante dans l'amélioration de la N-acylation en position N-terminale des acides aminés et des peptides. En attendant, d'autres possibilités d'amélioration de cette réaction catalysée par les aminoacylases ont été explorées en catalyse homogène. Les aminoacylases réalisant la N-

acylation en présence d'une émulsion de l'acide gras dans le tampon de réaction, l'étude de l'optimisation de l'aspect hydrodynamique nous a semblé pertinente. Pour cela, une étude comparative de l'impact de l'agitation a été réalisée par comparaison entre agitation par un barreau aimanté et par module microfluidique. Les résultats de cette étude montrent que la qualité du mélange est effectivement un paramètre important à prendre en compte dans le cas de cette réaction et il semble que l'utilisation du réacteur microstructuré microfluidique permettrait d'augmenter significativement le taux de conversion et également les vitesses de ces réactions. Dans ce chapitre, le mode de chauffage a également été étudié soit en catalyse homogène sur les aminoacylases de *S. ambofaciens* en milieu aqueux, soit en catalyse hétérogène sur CALB (Novozym435®). Les résultats obtenus avec CALB ont indiqué que la réaction de N-acylation de la lysine par les acides laurique et oléique semble être adaptée à ce mode de chauffage. En effet, l'augmentation de la température et des effets non thermiques ont permis l'amélioration de la production d'acyl-lysine. Le chauffage par irradiation microondes semble être une voie intéressante pour intensifier la réaction de N-acylation par CALB en solvant organique. Cependant les expérimentations réalisées en milieu aqueux avec les aminoacylases de *S. ambofaciens* ont montré l'incompatibilité de ce mode de chauffage sur cette réaction, dans nos conditions réactionnelles.

Au cours de cette étude de la N-acylation à l'échelle du procédé, l'objectif était la recherche de réacteurs adaptés aux conditions de réaction ainsi que l'immobilisation des aminoacylases produites au laboratoire afin d'élargir les possibilités d'amélioration du procédé d'acylation par ces enzymes.

A cette fin, un scale-up de la production des aminoacylases de *S. ambofaciens* est une étape nécessaire afin de pouvoir les caractériser. Des premiers essais ont déjà été réalisés dans un réacteur de type air-lift. Ensuite, concernant l'immobilisation de ces enzymes l'ajout d'une étape de silylation est en cours de réalisation afin de pouvoir utiliser la physisorption tout en limitant ou empêchant le phénomène de lessivage de l'enzyme durant le procédé. L'usage de matériaux de type mésoporeux assez large, ou macroporeux est envisagé afin de favoriser les transferts de masse cruciaux pour la catalyse en milieu hétérogène.

Le chauffage par microonde semble être bien adapté à l'acylation catalysée par CALB. Cependant, les conditions de mise en œuvre restent à optimiser par la mise en place d'un plan d'expériences. Concernant, les aminoacylases, il faudrait vérifier si la perte d'activité est due à des conditions opératoires non adaptées à ce mode de chauffage ou à une inactivation des enzymes. Par ailleurs, en réacteur microfluidique, une amélioration du taux de conversion par

rapport à une agitation mécanique avec un barreau aimanté a été constatée. Cette piste semble très prometteuse pour l'intensification des réactions de N-acylation au regard de ces premiers résultats préliminaires.

Références

- Abbott, A.P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D.L., Rasheed, R.K., 2004. Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 9142–9147.
- Alonso, H., Bliznyuk, A.A., Gready, J.E., 2006. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Med. Res. Rev.* 26, 531–568.
- Alothman, Z., 2012. A Review: Fundamental Aspects of Silicate Mesoporous Materials. *Materials* 5, 2874–2902.
- Ardhaoui, M., Falcimaigne, A., Engasser, J.-M., Moussou, P., Pauly, G., Ghoul, M., 2004. Acylation of natural flavonoids using lipase of candida antarctica as biocatalyst. *J. Mol. Catal. B Enzym., Proceedings of the 6th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations.*
- Ardhaoui, M., Falcimaigne, A., Ognier, S., Engasser, J.M., Moussou, P., Pauly, G., Ghoul, M., 2004. Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids. *J. Biotechnol.* 110, 265–272.
- Asada, H., Douen, T., Mizokoshi, Y., Fujita, T., Murakami, M., Yamamoto, A., Muranishi, S., 1994. Stability of Acyl Derivatives of Insulin in the Small Intestine: Relative Importance of Insulin Association Characteristics in Aqueous Solution. *Pharm. Res.* 11, 1115–1120.
- Avinash, V.S., Pundle, A.V., Ramasamy, S., Suresh, C.G., 2016. Penicillin acylases revisited: importance beyond their industrial utility. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36, 303–316.
- Barrett, E.P., Joyner, L.G., Halenda, P.P., 1951. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *J. Am. Chem. Soc.* 73, 373–380.
- Bellahouel, S., Rolland, V., Roumestant, M.L., Viallefont, P., Martinez, J., 2001. Chemoenzymatic synthesis of surfactants from carbohydrates, amino acids, and fatty acids. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 31, 71–80.
- Bernards, T.N.M., van Bommel, M.J., Boonstra, A.H., 1991. Hydrolysis-condensation processes of the tetra-alkoxysilanes TPOS, TEOS and TMOS in some alcoholic solvents. *J. Non-Cryst. Solids* 134, 1–13.
- Bidouil, C., 2012. Modélisation moléculaire de l'acétylation de la quercétine par des lipases : étude des interactions enzyme-substrat. Université de Lorraine.
- Bidouil, C., Basilio De Oliveira, E., Chebil, L., Maia, E.-R., Maigret, B., Ronat-Heidt, E., Ghoul, M., Engasser, J.-M., Humeau, C., 2011. Combined docking and molecular dynamics simulations to enlighten the capacity of Pseudomonas cepacia and Candida antarctica lipases to catalyze quercetin acetylation. *J. Biotechnol.* 156, 203–210.
- Blanchfield, J.T., Dutton, J.L., Hogg, R.C., Gallagher, O.P., Craik, D.J., Jones, A., Adams, D.J., Lewis, R.J., Alewood, P.F., Toth, I., 2003. Synthesis, Structure Elucidation, in Vitro Biological Activity, Toxicity, and Caco-2 Cell Permeability of Lipophilic Analogues of α -Conotoxin MII. *J. Med. Chem.* 46, 1266–1272.
- Blin, J.L., Gérardin, C., Carteret, C., Rodehüser, L., Selve, C., Stébé, M.J., 2005. Direct One-Step Immobilization of Glucose Oxidase in Well-Ordered Mesostructured Silica Using a Nonionic Fluorinated Surfactant. *Chem. Mater.* 17, 1479–1486.
- Bokhove, M., Jimenez, P.N., Quax, W.J., Dijkstra, B.W., 2010. The quorum-quenching N-acyl homoserine lactone acylase PvdQ is an Ntn-hydrolase with an unusual substrate-binding pocket. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 686–691. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911839107>
- Bolivar, J.M., Consolati, T., Mayr, T., Nidetzky, B., 2013. Quantitating intraparticle O₂ gradients in solid supported enzyme immobilizates: Experimental determination of

- their role in limiting the catalytic effectiveness of immobilized glucose oxidase. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 2086–2095.
- Bordes, R., Holmberg, K., 2015. Amino acid-based surfactants – do they deserve more attention? *Adv. Colloid Interface Sci.* 222, 79–91.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bradoo, S., Rathi, P., Saxena, R.K., Gupta, R., 2002. Microwave-assisted rapid characterization of lipase selectivities. *J. Biochem. Biophys. Methods* 51, 115–120.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Hüge-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L., Menge, U., 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343, 767–770.
- Brannigan, J.A., Dodson, G., Duggleby, H.J., Moody, P.C., Smith, J.L., Tomchick, D.R., Murzin, A.G., 1995. A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* 378, 416–419. <https://doi.org/10.1038/378416a0>
- Brito, R.O., Silva, S.G., Fernandes, R.M.F., Marques, E.F., Enrique-Borges, J., do Vale, M.L.C., 2011. Enhanced interfacial properties of novel amino acid-derived surfactants: Effects of headgroup chemistry and of alkyl chain length and unsaturation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 86, 65–70.
- Brooks, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S., Karplus, M., 1983. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* 4, 187–217.
- Bruice, T.C., 2006. Computational Approaches: Reaction Trajectories, Structures, and Atomic Motions. *Enzyme Reactions and Proficiency. Chem. Rev.* 106, 3119–3139.
- Brun, N., Babeau Garcia, A., Deleuze, H., Achard, M.-F., Sanchez, C., Durand, F., Oestreicher, V., Backov, R., 2010. Enzyme-Based Hybrid Macroporous Foams as Highly Efficient Biocatalysts Obtained through Integrative Chemistry. *Chem. Mater.* 22, 4555–4562.
- Bunet, R., Mendes, M.V., Rouhier, N., Pang, X., Hotel, L., Leblond, P., Aigle, B., 2008. Regulation of the Synthesis of the Angucyclinone Antibiotic Alpomycin in *Streptomyces ambofaciens* by the Autoregulator Receptor AlpZ and Its Specific Ligand. *J. Bacteriol.* 190, 3293–3305.
- Bunet, R., Riclea, R., Laureti, L., Hotel, L., Paris, C., Girardet, J.-M., Spitteller, D., Dickschat, J.S., Leblond, P., Aigle, B., 2014. A Single Sfp-Type Phosphopantetheinyl Transferase Plays a Major Role in the Biosynthesis of PKS and NRPS Derived Metabolites in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877. *Plos One* 9, e87607.
- Canilho, N., Jacoby, J., Pasc, A., Carteret, C., Dupire, F., Stébé, M.J., Blin, J.L., 2013. Isocyanate-mediated covalent immobilization of *Mucor miehei* lipase onto SBA-15 for transesterification reaction. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 112, 139–145.
- Cao, L., 2005. Immobilised enzymes: science or art? *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9, 217–226.
- Carn, F., Colin, A., Achard, M.-F., Deleuze, H., Sellier, E., Birot, M., Backov, R., 2004. Inorganic monoliths hierarchically textured via concentrated direct emulsion and micellar templates. *J. Mater. Chem.* 14, 1370–1376.
- Carrea, G., Ottolina, G., Riva, S., 1995. Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends Biotechnol.* 13, 63–70.
- Celia, E., Cernia, E., Palocci, C., Soro, S., Turchet, T., 2005. Tuning *Pseudomonas cepacea* lipase (PCL) activity in supercritical fluids. *J. Supercrit. Fluids* 33, 193–199.
- Cestari, A.R., Vieira, E.F.S., dos Santos, A.G.P., Mota, J.A., de Almeida, V.P., 2004. Adsorption of anionic dyes on chitosan beads. 1. The influence of the chemical

- structures of dyes and temperature on the adsorption kinetics. *J. Colloid Interface Sci.* 280, 380–386.
- Chamouleau, F., Coulon, D., Girardin, M., Ghoul, M., 2001. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, Proceedings of the 4th International Symposium on Biocatalysis 11, 949–954.
- Chandra, N., Tyagi, V.K., 2013. Synthesis, Properties, and Applications of Amino Acids Based Surfactants: A Review. *J. Dispers. Sci. Technol.* 34, 800–808.
- Chang, S.-W., Yang, C.-J., Chen, F.-Y., Akoh, C.C., Shieh, C.-J., 2009. Optimized synthesis of lipase-catalyzed l-ascorbyl laurate by Novozym® 435. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 56, 7–12.
- Chebil, L., Anthoni, J., Humeau, C., Gerardin, C., Engasser, J.-M., Ghoul, M., 2007. Enzymatic Acylation of Flavonoids: Effect of the Nature of the Substrate, Origin of Lipase, and Operating Conditions on Conversion Yield and Regioselectivity. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9496–9502.
- Chi, C.-F., Wang, B., Wang, Y.-M., Zhang, B., Deng, S.-G., 2015. Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads. *J. Funct. Foods* 12, 1–10.
- Chong, A.S.M., Zhao, X.S., 2004. Design of large-pore mesoporous materials for immobilization of penicillin G acylase biocatalyst. *Catal. Today* 93–95, 293–299.
- Choulet, F., Aigle, B., Gallois, A., Mangenot, S., Gerbaud, C., Truong, C., Francou, F.-X., Fourier, C., Guérineau, M., Decaris, B., Barbe, V., Pernodet, J.-L., Leblond, P., 2006. Evolution of the Terminal Regions of the *Streptomyces* Linear Chromosome. *Mol. Biol. Evol.* 23, 2361–2369.
- Christelle, B., Eduardo, B.D.O., Latifa, C., Elaine-Rose, M., Bernard, M., Evelyne, R.-H., Mohamed, G., Jean-Marc, E., Catherine, H., 2011. Combined docking and molecular dynamics simulations to enlighten the capacity of *Pseudomonas cepacia* and *Candida antarctica* lipases to catalyze quercetin acetylation. *J. Biotechnol.* 156, 203–210.
- Collins, J.M., Leadbeater, N.E., 2007. Microwave energy: a versatile tool for the biosciences. *Org. Biomol. Chem.* 5, 1141.
- Complementary Medicine Evaluation Committee, 16th meeting, n.d.
- Craik, D.J., Fairlie, D.P., Liras, S., Price, D., 2013. The Future of Peptide-based Drugs: Peptides in Drug Development. *Chem. Biol. Drug Des.* 81, 136–147.
- Cummings, J.A., Fedorov, A.A., Xu, C., Brown, S., Fedorov, E., Babbitt, P.C., Almo, S.C., Raushel, F.M., 2009. Annotating Enzymes of Uncertain Function: The Deacylation of d-Amino Acids by Members of the Amidohydrolase Superfamily. *Biochemistry (Mosc.)* 48, 6469–6481.
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6640–6645.
- De Oliveira, E.B., Humeau, C., Chebil, L., Maia, E.R., Dehez, F., Maigret, B., Ghoul, M., Engasser, J.-M., 2009. A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 59, 96–105.
- De Oliveira, E.B., Humeau, C., Maia, E.R., Chebil, L., Ronat, E., Monard, G., Ruiz-Lopez, M.F., Ghoul, M., Engasser, J.-M., 2010. An approach based on Density Functional Theory (DFT) calculations to assess the *Candida antarctica* lipase B selectivity in rutin, isoquercitrin and quercetin acetylation. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 66, 325–331.
- De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G., Cavalli, A., 2016. Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* 59, 4035–4061.

- Derewenda, Z.S., 1994. Structure and Function of Lipases, in: C.B. Anfinsen, J.T.E., Frederic M. Richards and David S. Eisenberg (Ed.), *Advances in Protein Chemistry, Lipoproteins, Apolipoproteins, and Lipases*. Academic Press, pp. 1–52.
- DeVane, C.L., 2009. Principles of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, in: *The American Psychiatric Publishing Textbook of Psychopharmacology*. American Psychiatric Publishing.
- Dexter, A.F., Middelberg, A.P.J., 2008. Peptides As Functional Surfactants. *Ind. Eng. Chem. Res.* 47, 6391–6398.
- Di Gioia, M.L., Barattucci, A., Bonaccorsi, P., Leggio, A., Minuti, L., Romio, E., Temperini, A., Siciliano, C., 2014. Deprotection/reprotection of the amino group in α -amino acids and peptides. A one-pot procedure in [Bmim][BF₄] ionic liquid. *RSC Adv* 4, 2678–2686.
- Díaz, P., D'Suze, G., Salazar, V., Sevcik, C., Shannon, J.D., Sherman, N.E., Fox, J.W., 2009. Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na⁺ permeability changes. *Toxicon* 54, 802–817.
- Diller, D.J., Merz, K.M., 2001. High throughput docking for library design and library prioritization. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 43, 113–124.
- Docherty, K.M., Kulpa, Jr., C.F., 2005. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. *Green Chem.* 7, 185.
- Domagała, S., Munshi, P., Ahmed, M., Guillot, B., Jelsch, C., 2011. Structural analysis and multipole modelling of quercetin monohydrate – a quantitative and comparative study. *Acta Crystallogr. B* 67, 63–78.
- dos Santos, P., Zobot, G.L., Meireles, M.A.A., Mazutti, M.A., Martínez, J., 2016. Synthesis of eugenyl acetate by enzymatic reactions in supercritical carbon dioxide. *Biochem. Eng. J.* 114, 1–9.
- Doukyu, N., Ogino, H., 2010. Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochem. Eng. J.* 48, 270–282.
- Duggleby, H.J., Tolley, S.P., Hill, C.P., Dodson, E.J., Dodson, G., Moody, P.C.E., 1995. Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. *Nature* 373, 264–268. <https://doi.org/10.1038/373264a0>
- Durand, E., 2013. Solvants de type eutectiques profonds: nouveaux milieux réactionnels aux réactions de lipophilisation biocatalysées par les lipases?
- Durand, E., Lecomte, J., Villeneuve, P., 2015. Are emerging deep eutectic solvents (DES) relevant for lipase-catalyzed lipophilizations? *OCL* 22, D408.
- Egleton, R.D., Davis, T.P., 1997. Bioavailability and Transport of Peptides and Peptide Drugs into the Brain. *Peptides* 18, 1431–1439.
- Elgue, S., Conte, A., Marty, A., Condoret, J.-S., 2013. Two-phase enzymatic reaction using Process Intensification technologies. *Chim. Oggi* 31, 43–46.
- Erickson, J.A., Jalaie, M., Robertson, D.H., Lewis, R.A., Vieth, M., 2004. Lessons in Molecular Recognition: The Effects of Ligand and Protein Flexibility on Molecular Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* 47, 45–55.
- Eş, I., Vieira, J.D.G., Amaral, A.C., 2015. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2065–2082.
- Falkeborg, M., Paitaid, P., Shu, A.N., Pérez, B., Guo, Z., 2015. Dodecyl succinylated alginate as a novel material for encapsulation and hyperactivation of lipases. *Carbohydr. Polym.* 133, 194–202.

- Fanti, A., Casu, S., Desogus, F., Montisci, G., Simone, M., Casula, G.A., Maxia, P., Mazzarella, G., Carta, R., 2015. Evaluation of a microwave resonant cavity as a reactor for enzyme reactions. *J. Electromagn. Waves Appl.* 29, 2380–2392.
- Fedoryshyn, M., Petzke, L., Welle, E., Bechthold, A., Luzhetskyy, A., 2008. Marker removal from actinomycetes genome using Flp recombinase. *Gene* 419, 43–47.
- Fei, X., Chen, S., Liu, D., Huang, C., Zhang, Y., 2016. Comparison of amino and epoxy functionalized SBA-15 used for carbonic anhydrase immobilization. *J. Biosci. Bioeng.* 122, 314–321.
- Feng, J., Yu, S., Li, J., Mo, T., Li, P., 2016. Enhancement of the catalytic activity and stability of immobilized aminoacylase using modified magnetic Fe₃O₄ nanoparticles. *Chem. Eng. J.* 286, 216–222.
- Feng, W., Ji, P., 2011. Enzymes immobilized on carbon nanotubes. *Biotechnol. Adv.* 29, 889–895.
- Férrir, G., Petrova, M.I., Andrei, G., Huskens, D., Hoorelbeke, B., Snoeck, R., Vanderleyden, J., Balzarini, J., Bartoschek, S., Brönstrup, M., Süßmuth, R.D., Schols, D., 2013. The Lantibiotic Peptide Labyrinthopeptin A1 Demonstrates Broad Anti-HIV and Anti-HSV Activity with Potential for Microbicidal Applications. *PLoS ONE* 8, e64010.
- Fernández-Pérez, M., Otero, C., 2003. Selective enzymatic synthesis of amide surfactants from diethanolamine. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 650–660.
- Fernández-Pérez, M., Otero, C., 2001. Enzymatic synthesis of amide surfactants from ethanolamine. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 527–536.
- Ferrari, F., Paris, C., Maigret, B., Bidouil, C., Delaunay, S., Humeau, C., Chevalot, I., 2014b. Molecular rules for chemo- and regio-selectivity of *Candida antarctica* lipase B in peptide acylation reactions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 101, 122–132.
- Findlay, B., Zhanel, G.G., Schweizer, F., 2012. Investigating the antimicrobial peptide ‘window of activity’ using cationic lipopeptides with hydrocarbon and fluorinated tails. *Int. J. Antimicrob. Agents* 40, 36–42.
- Foley, P., Pour, A.K., S. Beach, E., B. Zimmerman, J., 2012. Derivation and synthesis of renewable surfactants. *Chem. Soc. Rev.* 41, 1499–1518.
- Friesner, R.A., 2004. Combined quantum and molecular mechanics (QM/MM). *Drug Discov. Today Technol.* 1, 253–260.
- Frokjaer, S., Otzen, D.E., 2005. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 298–306.
- Fuentes, G., Ballesteros, A., Verma, C.S., 2004. Specificity in lipases: A computational study of transesterification of sucrose. *Protein Sci.* 13, 3092–3103.
- Furutani, T., Furui, M., Ooshima, H., Kato, J., 1996. n-acylation of β -amino alcohol by acyl migration following enzyme-catalyzed esterification. *Enzyme Microb. Technol.* 19, 578–584.
- Galarneau, A., Mureseanu, M., Atger, S., Renard, G., Fajula, F., 2006. Immobilization of lipase on silicas. Relevance of textural and interfacial properties on activity and selectivity. *New J. Chem.* 30, 562.
- Ganske, F., Bornscheuer, U.T., 2005. Lipase-Catalyzed Glucose Fatty Acid Ester Synthesis in Ionic Liquids. *Org. Lett.* 7, 3097–3098.
- Gardossi, L., Bianchi, D., Klivanov, A.M., 1991. Selective acylation of peptides catalyzed by lipases in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 6328–6329.
- Gautam, K.K., Tyagi, V.K., 2006. Microbial Surfactants: A Review. *J. Oleo Sci.* 55, 155–166.
- Gehlhaar, D.K., Verkhivker, G.M., Rejto, P.A., Sherman, C.J., Fogel, D.R., Fogel, L.J., Freer, S.T., 1995. Molecular recognition of the inhibitor AG-1343 by HIV-1 protease: conformationally flexible docking by evolutionary programming. *Chem. Biol.* 2, 317–324.

- Gelo-Pujic, M., Guibé-Jampel, E., Loupy, A., 1997. Enzymatic glycosidations in dry media on mineral supports. *Tetrahedron* 53, 17247–17252.
- Gerard, D., 2016. Séparation par voie enzymatique d'énantiomères de profènes: optimisation du biocatalyseur et mise en oeuvre en dioxyde de carbone supercritique.
- Gohlke, H., Klebe, G., 2002. Approaches to the Description and Prediction of the Binding Affinity of Small-Molecule Ligands to Macromolecular Receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 2644–2676.
- González, M.E., Cea, M., Sangaletti, N., González, A., Toro, C., Diez, M.C., Moreno, N., Querol, X., Navia, R., 2013. Biochar Derived from Agricultural and Forestry Residual Biomass: Characterization and Potential Application for Enzymes Immobilization. *J. Biobased Mater. Bioenergy* 7, 724–732.
- González, M.E., González, A., Toro, C.A., Cea, M., Sepúlveda, N., Diez, M.C., Navia, R., 2012. Biochar as a Renewable Matrix for the Development of Encapsulated and Immobilized Novel Added-Value Bioproducts. *J. Biobased Mater. Bioenergy* 6, 237–248.
- González-Sabín, J., Lavandera, I., Rebolledo, F., Gotor, V., 2006. Redesigning the mechanism of the lipase-catalysed aminolysis of esters. *Tetrahedron Asymmetry* 17, 1264–1274.
- Gordon, C.M., 2001. New developments in catalysis using ionic liquids. *Appl. Catal. Gen.* 222, 101–117.
- Gorelik, B., Goldblum, A., 2008. High quality binding modes in docking ligands to proteins. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 71, 1373–1386.
- Gorke, J.T., Srienc, F., Kazlauskas, R.J., 2010. Deep Eutectic Solvents for *Candida antarctica* Lipase B-Catalyzed Reactions. *ACS Symp. Ser.* 1038, 169–180.
- Goujard, L., Figueroa, M.C., Villeneuve, P., 2004. Chemo-enzymatic synthesis of N-arachidonoyl glycine. *Biotechnol. Lett.* 26, 1211–1216.
- Gremos, S., Zarafeta, D., Kekos, D., Kolisis, F., 2011. Direct enzymatic acylation of cellulose pretreated in BMIMCl ionic liquid. *Bioresour. Technol.* 102, 1378–1382.
- Groenhof, G., 2013. Introduction to QM/MM Simulations, in: Monticelli, L., Salonen, E. (Eds.), *Biomolecular Simulations*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 43–66.
- Gust, B., Challis, G.L., Fowler, K., Kieser, T., Chater, K.F., 2003. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1541–1546.
- Habulin, M., Šabeder, S., Paljevac, M., Primožič, M., Knez, Ž., 2007. Lipase-catalyzed esterification of citronellol with lauric acid in supercritical carbon dioxide/co-solvent media. *J. Supercrit. Fluids* 43, 199–203.
- Hamman, J.H., Enslin, G.M., Kotzé, A.F., 2005. Oral delivery of peptide drugs. *BioDrugs* 19, 165–177.
- Han, Y.-J., Watson, J.T., Stucky, G.D., Butler, A., 2002. Catalytic activity of mesoporous silicate-immobilized chloroperoxidase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 17, 1–8.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580.
- Hanefeld, U., Gardossi, L., Magner, E., 2009. Understanding enzyme immobilisation. *Chem Soc Rev* 38, 453–468.
- Harris, F., Dennison, S.R., Singh, J., Phoenix, D.A., 2013. On the selectivity and efficacy of defense peptides with respect to cancer cells. *Med. Res. Rev.* 33, 190–234.
- Hartmann, M., 2005. Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis. *Chem. Mater.* 17, 4577–4593.
- Hassan, M.E., 2016. production, immobilization and industrial uses of penicillin G acylase. *Int. J. Curr. Res. Rev.* 8, 11.

- He, J., Li, X., Evans, D.G., Duan, X., Li, C., 2000. A new support for the immobilization of penicillin acylase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 11, 45–53.
- Hernández-Ledesma, B., del Mar Contreras, M., Recio, I., 2011. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv. Colloid Interface Sci., Food Colloids 2010 - On the Road from Interfaces to Consumers* 165, 23–35.
- Hernández-Martín, E., Otero, C., 2008. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. *Bioresour. Technol.* 99, 277–286.
- Hernick, M., Fierke, C.A., 2005. Zinc hydrolases: the mechanisms of zinc-dependent deacetylases. *Arch. Biochem. Biophys.*, Highlight issue on Enzyme Mechanisms 433, 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.08.006>
- Hoarau, M., Badieyan, S., Marsh, E.N.G., 2017. Immobilized enzymes: understanding enzyme – surface interactions at the molecular level. *Org. Biomol. Chem.*
- Homaei, A.A., Sariri, R., Vianello, F., Stevanato, R., 2013. Enzyme immobilization: an update. *J. Chem. Biol.* 6, 185–205.
- Hudson, E.P., Eppler, R.K., Clark, D.S., 2005. Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 637–643.
- Humeau, C., Girardin, M., Rovel, B., Miclo, A., 1998a. Effect of the thermodynamic water activity and the reaction medium hydrophobicity on the enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate. *J. Biotechnol.* 63, 1–8.
- Humeau, C., Girardin, M., Rovel, B., Miclo, A., 1998b. Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 5, 19–23.
- Husain, Q., 2016. Magnetic nanoparticles as a tool for the immobilization/stabilization of hydrolases and their applications: An overview. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 6.
- Husson, E., Garcia-Matilla, V., Humeau, C., Chevalot, I., Fournier, F., Marc, I., 2010. Enzymatic acylation of a bifunctional molecule in 2-methyl-2-butanol: Kinetic modelling. *Enzyme Microb. Technol.* 46, 338–346.
- Husson, E., Humeau, C., Blanchard, F., Framboisier, X., Marc, I., Chevalot, I., 2008. Chemo-selectivity of the N,O-enzymatic acylation in organic media and in ionic liquids. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 55, 110–117.
- Husson, E., Humeau, C., Harscoat, C., Framboisier, X., Paris, C., Dubreucq, E., Marc, I., Chevalot, I., 2011. Enzymatic acylation of the polar dipeptide, carnosine: Reaction performances in organic and aqueous media. *Process Biochem.* 46, 945–952.
- Husson, E., Humeau, C., Paris, C., Vanderesse, R., Framboisier, X., Marc, I., Chevalot, I., 2009. Enzymatic acylation of polar dipeptides: Influence of reaction media and molecular environment of functional groups. *Process Biochem.* 44, 428–434.
- Ilmi, M., Hommes, A., Winkelmann, J.G.M., Hidayat, C., Heeres, H.J., 2016. Kinetic studies on the transesterification of sunflower oil with 1-butanol catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase in a biphasic aqueous-organic system. *Biochem. Eng. J.* 114, 110–118.
- Infante, M.R., Pérez, L., Pinazo, A., Clapés, P., Morán, M.C., Angelet, M., García, M.T., Vinardell, M.P., 2004. Amino acid-based surfactants. *Comptes Rendus Chim.* 7, 583–592.
- Ingesson, H., Zacchi, G., Yang, B., Esteghlalian, A.R., Saddler, J.N., 2001. The effect of shaking regime on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of cellulose. *J. Biotechnol.* 88, 177–182.
- Irimescu, R., Saito, T., Kato, K., 2004. Enzymatic kinetic resolution of primary alcohols by direct esterification in solvent-free system. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 27, 69–73.
- Irwin, J., Shoichet, B., 2016. Docking Screens for Novel Ligands Conferring New Biology., *Docking Screens for Novel Ligands Conferring New Biology. J. Med. Chem. J. Med. Chem.* 59, 59, 4103, 4103–4120.

- Izumi, T., Yagimuma, Y., Haga, M., 1997. Enzymatic syntheses of N-lauroyl- β -alanine homologs in organic media. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 875–878.
- Jacoby, J., Pasc, A., Carteret, C., Dupire, F., Stébé, M.J., Coupard, V., Blin, J.L., 2013. Ordered mesoporous materials containing *Mucor Miehei* Lipase as biocatalyst for transesterification reaction. *Process Biochem.* 48, 831–837.
- Jain, A.N., 1996. Scoring noncovalent protein-ligand interactions: A continuous differentiable function tuned to compute binding affinities. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 10, 427–440.
- Jain, N., Kumar, A., Chauhan, S., Chauhan, S.M.S., 2005. Chemical and biochemical transformations in ionic liquids. *Tetrahedron* 61, 1015–1060.
- Jensen, M.Ø., Jensen, T.R., Kjaer, K., Bjørnholm, T., Mouritsen, O.G., Peters, G.H., 2002. Orientation and Conformation of a Lipase at an Interface Studied by Molecular Dynamics Simulations. *Biophys. J.* 83, 98–111.
- Ji, P., Tan, H., Xu, X., Feng, W., 2010. Lipase covalently attached to multiwalled carbon nanotubes as an efficient catalyst in organic solvent. *AIChE J.* 56, 3005–3011.
- Jiang, Z.Y., Xu, S.W., Wu, H., 2002. Enzymatic structural modification of natural products. *Chin. J. Org. Chem.* 22, 220–226.
- Jung, D., Streb, C., Hartmann, M., 2010. Covalent Anchoring of Chloroperoxidase and Glucose Oxidase on the Mesoporous Molecular Sieve SBA-15. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 762–778.
- Kaar, J.L., Jesionowski, A.M., Berberich, J.A., Moulton, R., Russell, A.J., 2003. Impact of Ionic Liquid Physical Properties on Lipase Activity and Stability. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 4125–4131.
- Kabza, K.G., Gestwicki, J.E., McGrath, J.L., Petrassi, H.M., 1996. Effect of Microwave Radiation on Copper (II) 2, 2'-Bipyridyl-Mediated Hydrolysis of Bis (p-nitrophenyl) Phosphodiester and Enzymatic Hydrolysis of Carbohydrates. *J. Org. Chem.* 61, 9599–9602.
- Kadereit, D., Waldmann, H., 2000. Invited Review Chemoenzymatic Synthesis of Lipidated Peptides. *Monatshefte Für Chem. Chem. Mon.* 131, 571–584.
- Kallenberg, A.I., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., 2005. Immobilization of Penicillin G Acylase: The Key to Optimum Performance. *Adv. Synth. Catal.* 347, 905–926.
- Kamari, A., Ngah, W.S.W., Chong, M.Y., Cheah, M.L., 2009. Sorption of acid dyes onto GLA and H₂SO₄ cross-linked chitosan beads. *Desalination* 249, 1180–1189.
- Kappe, C.O., 2004. Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, 6250–6284.
- Kartal, F., Janssen, M.H.A., Hollmann, F., Sheldon, R.A., Kilinc, A., 2011. Improved esterification activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvent by immobilization as Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *J. Mol. Catal. B Enzym.* 71, 85–89.
- Katsoura, M.H., Polydera, A.C., Tsironis, L., Tselepis, A.D., Stamatis, H., 2006. Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency. *J. Biotechnol.* 123, 491–503.
- Khoobi, M., Khalilvand-Sedagheh, M., Ramazani, A., Asadgol, Z., Forootanfar, H., Faramarzi, M.A., 2016. Synthesis of polyethyleneimine (PEI) and β -cyclodextrin grafted PEI nanocomposites with magnetic cores for lipase immobilization and esterification: Lipase immobilization on magnetic core nanocomposites. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 375–384.
- Khoobi, M., Motevalizadeh, S.F., Asadgol, Z., Forootanfar, H., Shafiee, A., Faramarzi, M.A., 2015. Polyethyleneimine-modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for lipase immobilization: Characterization and application. *Mater. Chem. Phys.* 149–150, 77–86.

- Kidwai, M., Poddar, R., Mothra, P., 2009. N-acylation of ethanolamine using lipase: A chemoselective catalyst. *Beilstein J. Org. Chem.* 5.
- Kieser, bibb, Buttner, Chater, Hopwood, 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. *Int. Microbiol.* 3, 260–261.
- Kim, M.-J., Choi, M.Y., Lee, J.K., Ahn, Y., 2003. Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids: significantly enhanced reactivity and regioselectivity. *J. Mol. Catal. B Enzym., Biocatalytic Activity in Korea* 26, 115–118.
- Kiran, K.R., Babu, C.S., Divakar, S., 2001. Thermostability of porcine pancreas lipase in non-aqueous media. *Process Biochem.* 36, 885–892.
- Klibanov, A.M., 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409, 241.
- Klibanov, A.M., 1989. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem. Sci.* 14, 141–144.
- Kmecz, I., Simándi, B., Poppe, L., Juvancz, Z., Renner, K., Bódai, V., Tőke, E.R., Csajági, C., Sawinsky, J., 2006. Lipase-catalyzed enantioselective acylation of 3-benzyloxypropane-1,2-diol in supercritical carbon dioxide. *Biochem. Eng. J.* 28, 275–280.
- Knezevic, Z., Milosavic, N., Bezbradica, D., Jakovljevic, Z., Prodanovic, R., 2006. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment. *Biochem. Eng. J.* 30, 269–278.
- Koda, Y., Del Borgo, M., Wessling, S.T., Lazarus, L.H., Okada, Y., Toth, I., Blanchfield, J.T., 2008. Synthesis and in vitro evaluation of a library of modified endomorphin 1 peptides. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 6286–6296.
- Kokunešoski, M., Gulicovski, J., Matović, B., Logar, M., Milonjić, S.K., Babić, B., 2010. Synthesis and surface characterization of ordered mesoporous silica SBA-15. *Mater. Chem. Phys.* 124, 1248–1252.
- Kontoyianni, M., McClellan, L.M., Sokol, G.S., 2004. Evaluation of Docking Performance: Comparative Data on Docking Algorithms. *J. Med. Chem.* 47, 558–565.
- Koreishi, M., Asayama, F., Imanaka, H., Imamura, K., Kadota, M., Tsuno, T., Nakanishi, K., 2005. Purification and characterization of a novel aminoacylase from *Streptomyces mobaraensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 1914–1922.
- Koreishi, M., Kawasaki, R., Imanaka, H., Imamura, K., Nakanishi, K., 2005. A novel ϵ -lysine acylase from *Streptomyces mobaraensis* for synthesis of $N\epsilon$ -acyl-L-lysines. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82, 631–637.
- Koreishi, M., Kawasaki, R., Imanaka, H., Imamura, K., Takakura, Y., Nakanishi, K., 2009a. Efficient $N\epsilon$ -lauroyl-L-lysine production by recombinant ϵ -lysine acylase from *Streptomyces mobaraensis*. *J. Biotechnol.* 141, 160–165.
- Koreishi, M., Nakatani, Y., Ooi, M., Imanaka, H., Imamura, K., Nakanishi, K., 2009b. Purification, Characterization, Molecular Cloning, and Expression of a New Aminoacylase from *Streptomyces mobaraensis* That Can Hydrolyze N-(Middle/Long)-chain-fatty-acyl-L-amino Acids as Well as N-Short-chain-acyl-L-amino acids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 1940–1947.
- Koreishi, M., Tani, K., Ise, Y., Imanaka, H., Imamura, K., Nakanishi, K., 2007. Enzymatic synthesis of β -lactam antibiotics and N-fatty-acylated amino compounds by the acyl-transfer reaction catalyzed by penicillin V acylase from *Streptomyces mobaraensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1582–1586.
- Koreishi, M., Zhang, D., Imanaka, H., Imamura, K., Adachi, S., Matsuno, R., Nakanishi, K., 2006. A Novel Acylase from *Streptomyces mobaraensis* that Efficiently Catalyzes Hydrolysis/Synthesis of Capsaicins as Well as N-Acyl-L-amino Acids and N-Acyl-peptides. *J. Agric. Food Chem.* 54, 72–78.

- Koska, J., Spassov, V.Z., Maynard, A.J., Yan, L., Austin, N., Flook, P.K., Venkatachalam, C.M., 2008. Fully Automated Molecular Mechanics Based Induced Fit Protein–Ligand Docking Method. *J. Chem. Inf. Model.* 48, 1965–1973.
- Kraai, G.N., van Zwol, F., Schuur, B., Heeres, H.J., de Vries, J.G., 2008. Two-Phase (Bio)Catalytic Reactions in a Table-Top Centrifugal Contact Separator. *Angew. Chem.* 120, 3969–3972.
- Krammer, A., Kirchhoff, P.D., Jiang, X., Venkatachalam, C.M., Waldman, M., 2005. LigScore: a novel scoring function for predicting binding affinities. *J. Mol. Graph. Model.* 23, 395–407.
- Krishnamoorthi, S., Banerjee, A., Roychoudhury, A., 2015. Immobilized enzyme technology: potentiality and prospects. *J. Enzym. Metab.* 1, 104.
- Kurtzhals, P., Havelund, S., Jonassen, I., Kiehr, B., Larsen, U.D., Ribel, U., Markussen, J., 1995. Albumin binding of insulins acylated with fatty acids: characterization of the ligand-protein interaction and correlation between binding affinity and timing of the insulin effect in vivo. *Biochem. J.* 312, 725–731.
- Lazghab, M., Saleh, K., Guigon, P., 2010. Functionalisation of porous silica powders in a fluidised-bed reactor with glycidoxypyltrimethoxysilane (GPTMS) and aminopropyltriethoxysilane (APTES). *Chem. Eng. Res. Des.* 88, 686–692.
- Le Joubioux, F., Achour, O., Bridiau, N., Graber, M., Maugard, T., 2011. Kinetic study of 2-butanol O-acylation and sec-butylamine N-acylation catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 70, 108–113.
- Leach, A.R., Shoichet, B.K., Peishoff, C.E., 2006. Prediction of Protein–Ligand Interactions. Docking and Scoring: Successes and Gaps. *J. Med. Chem.* 49, 5851–5855.
- Lee, C.-H., Lin, T.-S., Mou, C.-Y., 2009. Mesoporous materials for encapsulating enzymes. *Nano Today* 4, 165–179.
- Léonard, V., Fransson, L., Lamare, S., Hult, K., Graber, M., 2007. A Water Molecule in the Stereospecificity Pocket of *Candida Antarctica* Lipase B Enhances Enantioselectivity towards Pentan-2-ol. *ChemBioChem* 8, 662–667.
- Léonard-Nevers, V., Marton, Z., Lamare, S., Hult, K., Graber, M., 2009. Understanding water effect on *Candida antarctica* lipase B activity and enantioselectivity towards secondary alcohols. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 59, 90–95.
- Li, C., Tan, T., Zhang, H., Feng, W., 2010. Analysis of the Conformational Stability and Activity of *Candida antarctica* Lipase B in Organic Solvents insight from molecular dynamics and quantum mechanics/simulation. *J. Biol. Chem.* 285, 28434–28441.
- Li, C., Wang, Q., Zhao, Z.K., 2008. Acid in ionic liquid: An efficient system for hydrolysis of lignocellulose. *Green Chem.* 10, 177–182.
- Li, J., Ehlers, T., Sutter, J., Varma-O'Brien, S., Kirchmair, J., 2007. CAESAR: A New Conformer Generation Algorithm Based on Recursive Buildup and Local Rotational Symmetry Consideration. *J. Chem. Inf. Model.* 47, 1923–1932.
- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., Su, Z., 2012. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* 37, 207–215.
- Li, Y., Zhou, G., Li, C., Qin, D., Qiao, W., Chu, B., 2009. Adsorption and catalytic activity of Porcine pancreatic lipase on rod-like SBA-15 mesoporous material. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 341, 79–85.
- Lin, W.J., Chien, Y.L., Pan, C.Y., Lin, T.L., Chen, J.Y., Chiu, S.J., Hui, C.F., 2009. Epinecidin-1, an antimicrobial peptide from fish (*Epinephelus coioides*) which has an antitumor effect like lytic peptides in human fibrosarcoma cells. *Peptides* 30, 283–290.

- Lindqvist, A., Rip, J., Kregten, J. van, Gaillard, P.J., Hammarlund-Udenaes, M., 2015. In vivo Functional Evaluation of Increased Brain Delivery of the Opioid Peptide DAMGO by Glutathione-PEGylated Liposomes. *Pharm. Res.* 33, 177–185.
- Liu, W., Zhou, F., Zhang, X.-Y., Li, Y., Wang, X.-Y., Xu, X.-M., Zhang, Y.-W., 2014. Preparation of Magnetic Fe₃O₄@SiO₂ Nanoparticles for Immobilization of Lipase. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14, 3068–3072.
- Loy, D.A., Baugher, B.M., Baugher, C.R., Schneider, D.A., Rahimian, K., 2000. Substituent Effects on the Sol–Gel Chemistry of Organotrialkoxysilanes. *Chem. Mater.* 12, 3624–3632.
- Lozano, L.J., Godínez, C., de los Ríos, A.P., Hernández-Fernández, F.J., Sánchez-Segado, S., Alguacil, F.J., 2011. Recent advances in supported ionic liquid membrane technology. *J. Membr. Sci.* 376, 1–14.
- Lozano, P., 2010. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. *Green Chem.* 12, 555–569.
- Lozano, P., Bernal, J.M., Vaultier, M., 2011. Towards continuous sustainable processes for enzymatic synthesis of biodiesel in hydrophobic ionic liquids/supercritical carbon dioxide biphasic systems. *Fuel* 90, 3461–3467.
- Lozano, P., de Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M., Iborra, J.L., 2003. Lipase Catalysis in Ionic Liquids and Supercritical Carbon Dioxide at 150 °C. *Biotechnol. Prog.* 19, 380–382.
- Lozano, P., Diego, T. de, Carrié, D., Vaultier, M., Iborra, J.L., 2002. Continuous green biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Chem. Commun.* 692–693.
- Lü, Y., Guo, Y., Wang, Y., Liu, X., Wang, Y., Guo, Y., Zhang, Z., Lu, G., 2008. Immobilized penicillin G acylase on mesoporous silica: The influence of pore size, pore volume and mesophases. *Microporous Mesoporous Mater.* 114, 507–510.
- Lundell, K., Kurki, T., Lindroos, M., Kanerva, L.T., 2005. Room Temperature Ionic Liquids in the Kinetic Resolution of Adrenaline-Type Aminoethanols by *Burkholderia cepacia* Lipase under Normal and Microwave Conditions. *Adv. Synth. Catal.* 347, 1110–1118.
- Macneil, D., Gewain, K., Ruby, C., Dezeny, G., Gibbons, P., Macneil, T., 1992. Analysis of *Streptomyces-Avermitilis* Genes Required for Avermectin Biosynthesis Utilizing a Novel Integration Vector. *Gene* 111, 61–68.
- Magner, E., 2013. Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6213–6222.
- Mahmod, S.S., Yusof, F., Jami, M.S., Khanahmadi, S., Shah, H., 2015. Development of an immobilized biocatalyst with lipase and protease activities as a multipurpose cross-linked enzyme aggregate (multi-CLEA). *Process Biochem.* 50, 2144–2157.
- Mala, J.G.S., Takeuchi, S., 2008. Understanding Structural Features of Microbial Lipases—An Overview. *Anal. Chem. Insights* 3, 9.
- Malcolm, A.S., Dexter, A.F., Middelberg, A.P., 2007. Peptide surfactants (Pepfactants) for switchable foams and emulsions. *Asia-Pac. J. Chem. Eng.* 2, 362–367.
- Manyar, H.G., Gianotti, E., Sakamoto, Y., Terasaki, O., Coluccia, S., Tumbiolo, S., 2008. Active Biocatalysts Based on Pepsin Immobilized in Mesoporous SBA-15. *J. Phys. Chem. C* 112, 18110–18116.
- Martínez-Palou, R., 2010. Microwave-assisted synthesis using ionic liquids. *Mol. Divers.* 14, 3–25.
- Mateo, C., Grazú, V., Pessela, B.C.C., Montes, T., Palomo, J.M., Torres, R., López-Gallego, F., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., 2007. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization–stabilization. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1593–1601.

- Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D., Monsan, P., 1998. Enzymatic amidification for the synthesis of biodegradable surfactants: Synthesis of N-acylated hydroxylated amines. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 5, 13–17.
- Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D., Monsan, P., 1997. Lipase-catalyzed chemoselective n-acylation of amino-sugar derivatives in hydrophobic solvent: Acid-amine ion-pair effects. *Tetrahedron* 53, 7587–7594.
- Mazinani, S.A., Yan, H., 2016. Impact of microwave irradiation on enzymatic activity at constant bulk temperature is enzyme-dependent. *Tetrahedron Lett.* 57, 1589–1591.
- McPherson, A., 1990. Current approaches to macromolecular crystallization. *FEBS J.* 189, 1–23.
- Mohamad, N.R., Marzuki, N.H.C., Buang, N.A., Huyop, F., Wahab, R.A., 2015. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 29, 205–220.
- Montet, D., Servat, F., Pina, M., Graille, J., Galzy, P., Arnaud, A., Ledon, H., Marcou, L., 1990. Enzymatic synthesis of N- ϵ -acyllysines. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67, 771–774.
- Morán, C., Clapés, P., Comelles, F., García, T., Pérez, L., Vinardell, P., Mitjans, M., Infante, M.R., 2001. Chemical Structure/Property Relationship in Single-Chain Arginine Surfactants. *Langmuir* 17, 5071–5075.
- Morán, M.C., Pinazo, A., Pérez, L., Clapés, P., Angelet, M., García, M.T., Vinardell, M.P., Infante, M.R., 2004. “Green” amino acid-based surfactants. *Green Chem* 6, 233–240.
- Moreau, M., 2014. Méthodologies pour la caractérisation hydrodynamique et l’extrapolation de réacteurs intensifiés millistructurés URL <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00003027/> (accessed 5.29.17).
- Muegge, I., 2006. PMF Scoring Revisited. *J. Med. Chem.* 49, 5895–5902.
- Muegge, I., Martin, Y.C., 1999. A general and fast scoring function for protein-ligand interactions: a simplified potential approach. *J. Med. Chem.* 42, 791–804.
- Mussatto, S.I., Dragone, G., Fernandes, M., Milagres, A.M.F., Roberto, I.C., 2008. The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer’s spent grain. *Cellulose* 15, 711–721.
- Nestl, B.M., Nebel, B.A., Hauer, B., 2011. Recent progress in industrial biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol., Biocatalysis and Biotransformation/Bioinorganic Chemistry* 15, 187–193.
- Nestor, J., 2009. The medicinal chemistry of peptides. *Curr. Med. Chem.* 16, 4399–4418.
- Ngo, D.H., Vo, T.S., Ngo, D.N., Wijesekara, I., Kim, S.K., 2012. Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *Int. J. Biol. Macromol.* 51, 378–383.
- Ogino, H., Ishikawa, H., 2001. Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. *J. Biosci. Bioeng.* 91, 109–116.
- Oinonen, C., Rouvinen, J., 2000. Structural comparison of Ntn-hydrolases. *Protein Sci.* 9, 2329–2337. <https://doi.org/10.1110/ps.9.12.2329>
- Oliveira, E.B.D., 2009. Simulations moléculaires appliquées à l’acétylation de flavonoïdes catalysée par des lipases : influence des structures de la lipase e du flavonoïde sur la régiosélectivité de la bioconversion. Institut National Polytechnique de Lorraine - INPL.
- Olkhovyk, O., Jaroniec, M., 2005. Periodic Mesoporous Organosilica with Large Heterocyclic Bridging Groups. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 60–61. <https://doi.org/10.1021/ja043941a>
- Pang, X., Aigle, B., Girardet, J.-M., Mangenot, S., Pernodet, J.-L., Decaris, B., Leblond, P., 2004. Functional Angucycline-Like Antibiotic Gene Cluster in the Terminal Inverted Repeats of the *Streptomyces ambofaciens* Linear Chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 575–588.

- Pangestuti, R., Ryu, B., Himaya, S., Kim, S.-K., 2013. Optimization of hydrolysis conditions, isolation, and identification of neuroprotective peptides derived from seahorse *Hippocampus trimaculatus*. *Amino Acids* 45, 369–381.
- Pérez, L., Pinazo, A., Teresa García, M., Lozano, M., Manresa, A., Angelet, M., Pilar Vinardell, M., Mitjans, M., Pons, R., Rosa Infante, M., 2009. Cationic surfactants from lysine: Synthesis, micellization and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 1884–1892.
- Pinazo, A., Manresa, M.A., Marques, A.M., Bustelo, M., Espuny, M.J., Pérez, L., 2016. Amino acid-based surfactants: New antimicrobial agents. *Adv. Colloid Interface Sci.* 228, 17–39.
- Pinnert-Sindico, S., 1954. Une nouvelle espèce de *Streptomyces* productrice d'antibiotiques: *Streptomyces ambofaciens* n. sp., caracteres cultureux. *Ann Inst Pasteur Paris* 87, 702–707.
- Plaza, A., Bifulco, G., Keffer, J.L., Lloyd, J.R., Baker, H.L., Bewley, C.A., 2009. Celebesides A–C and Theopapuamides B–D, Depsipeptides from an Indonesian Sponge That Inhibit HIV-1 Entry. *J. Org. Chem.* 74, 504–512.
- Pleiss, J., Fischer, M., Schmid, R.D., 1998. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chem. Phys. Lipids* 93, 67–80.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 2013. Chapter 77 - Introduction: Metallopeptidases and Their Clans, in: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, pp. 325–370. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00077-6>
- Raynal, A., Karray, F., Tiphile, K., Darbon-Rongere, E., Pernodet, J.-L., 2006. Excisable cassettes: New tools for functional analysis of *Streptomyces* genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4839–4844.
- Réjasse, B., Besson, T., Legoy, M.-D., Lamare, S., 2006. Influence of microwave radiation on free *Candida antarctica* lipase B activity and stability. *Org. Biomol. Chem.* 4, 3703–3707.
- Réjasse, B., Lamare, S., Legoy, M.-D., Besson, T., 2007. Influence of microwave irradiation on enzymatic properties: applications in enzyme chemistry. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 22, 519–527.
- Réjasse, B., Lamare, S., Legoy, M.-D., Besson, T., 2004. Stability improvement of immobilized *Candida antarctica* lipase B in an organic medium under microwave radiation. *Org. Biomol. Chem.* 2, 1086–1089.
- Renukuntla, J., Vadlapudi, A.D., Patel, A., Boddu, S.H., Mitra, A.K., 2013. Approaches for Enhancing Oral Bioavailability of Peptides and Proteins. *Int. J. Pharm.* 447, 75–93.
- Reyes-Duarte, D., Castillo, E., Martínez, R., López-Munguía, A., 2002. Lipase-catalysed synthesis of olvanil in organic solvents. *Biotechnol. Lett.* 24, 2057–2061.
- Rouillard, H., Deau, E., Domon, L., Chérouvrier, J.-R., Graber, M., Thiéry, V., 2014. Microwave-Assisted Kinetic Resolution of Homochiral (Z)-Cyclooct-5-ene-1,2-diol and (Z)-2-Acetoxycyclooct-4-enyl Acetate Using Lipases. *Molecules* 19, 9215–9227.
- Rouillard, H., Thiéry, V., 2013. Microwave-assisted kinetic resolution of homochiral diols using lipase. *MDPI*, p. c005.
- Salem, J.H., Humeau, C., Chevalot, I., Harscoat-Schiavo, C., Vanderesse, R., Blanchard, F., Fick, M., 2010. Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters. *Process Biochem.* 45, 382–389.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Saxena, R.K., Isar, J., Saran, S., Kaushik, R., Davidson, W.S., 2005. Efficient microwave-assisted hydrolysis of triolein and synthesis of bioester, bio-surfactant and glycerides using *Aspergillus carneus* lipase. *Curr. Sci.* 89, 1000–1003.

- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B., 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409, 258–268.
- Scott, W.R.P., Hünenberger, P.H., Tironi, I.G., Mark, A.E., Billeter, S.R., Fennen, J., Torda, A.E., Huber, T., Krüger, P., van Gunsteren, W.F., 1999. The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package. *J. Phys. Chem. A* 103, 3596–3607.
- Senn, H.M., Thiel, W., 2009. QM/MM Methods for Biomolecular Systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 1198–1229.
- Serra, E., Mayoral, Á., Sakamoto, Y., Blanco, R.M., Díaz, I., 2008. Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials: Effect of textural and structural parameters. *Microporous Mesoporous Mater.* 114, 201–213.
- Sheldon, A.R., Pelt, S. van, 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6223–6235.
- Sheldon, R.A., 2007. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): stable and recyclable biocatalysts. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1583–1587.
- Sheldon, R.A., Lau, R.M., Sorgedraeger, M.J., van Rantwijk, F., Seddon, K.R., 2002. Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chem.* 4, 147–151.
- Shen, Y., Fan, Y., Dai, H., Fu, Q., Hu, W., Chen, Z., 2007. Neuroprotective effect of carnosine on necrotic cell death in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 414, 145–149.
- Sing, K.S.W., 1985. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984): *Pure and Applied Chemistry* (accessed 10.6.17).
- Skjot, M., De Maria, L., Chatterjee, R., Svendsen, A., Patkar, S.A., Ostergaard, P.R., Brask, J., 2009. Understanding the Plasticity of the alpha/beta Hydrolase Fold: Lid Swapping on the *Candida antarctica* Lipase B Results in Chimeras with Interesting Biocatalytic Properties. *Chembiochem* 10, 520–527.
- Smellie, A., Kahn, S.D., Teig, S.L., 1995a. Analysis of Conformational Coverage. 1. Validation and Estimation of Coverage. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 35, 285–294.
- Smellie, A., Kahn, S.D., Teig, S.L., 1995b. Analysis of Conformational Coverage. 2. Applications of Conformational Models. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 35, 295–304.
- Smellie, A., Teig, S.L., Towbin, P., 1995c. Poling: Promoting conformational variation. *J. Comput. Chem.* 16, 171–187.
- Soo, E., Salleh, A., Basri, M., Rahman, R.N.Z., Kamaruddin, K., 2004. Response surface methodological study on lipase-catalyzed synthesis of amino acid surfactants. *Process Biochem.* 39, 1511–1518.
- Spassov, V.Z., Yan, L., Flook, P.K., 2007. The dominant role of side-chain backbone interactions in structural realization of amino acid code. ChiRotor: A side-chain prediction algorithm based on side-chain backbone interactions. *Protein Sci.* 16, 494–506.
- Stauch, B., Fisher, S.J., Cianci, M., 2015. Open and closed states of *Candida antarctica* lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. *J. Lipid Res.* 56, 2348–2358.
- Sun, H., Bao, X.Y., Zhao, X.S., 2009. Immobilization of Penicillin G Acylase on Oxirane-Modified Mesoporous Silicas. *Langmuir* 25, 1807–1812.
- Syren, P.O., Le Joubioux, F., Ben Henda, Y., Maugard, T., Hult, K., Graber, M., 2013. Proton Shuttle Mechanism in the Transition State of Lipase-Catalyzed N-Acylation of Amino Alcohols. *Chemcatchem* 5, 1842–1853.
- Szymańska, K., Bryjak, J., Mrowiec-Białoń, J., Jarzębski, A.B., 2007. Application and properties of siliceous mesostructured cellular foams as enzymes carriers to obtain efficient biocatalysts. *Microporous Mesoporous Mater.* 99, 167–175.

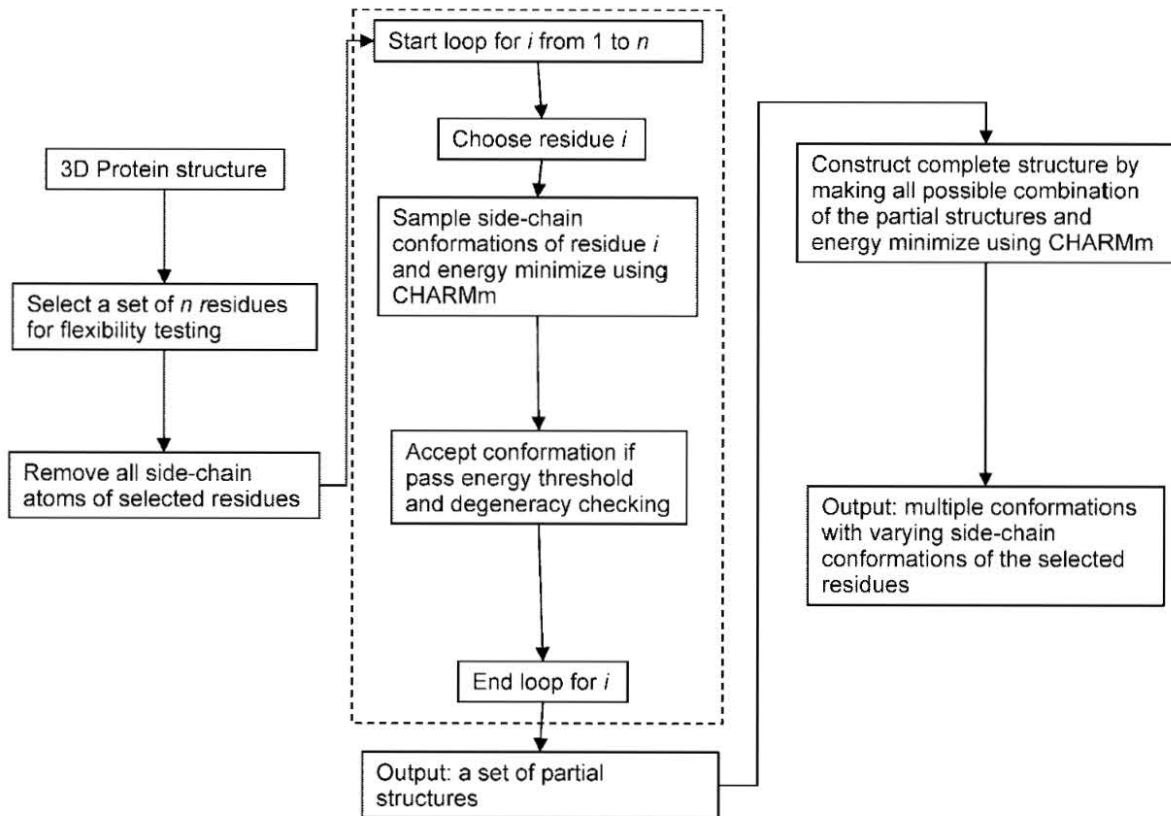
- Talekar, S., Ghodake, V., Ghotage, T., Rathod, P., Deshmukh, P., Nadar, S., Mulla, M., Ladole, M., 2012. Novel magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of alpha amylase. *Bioresour. Technol.* 123, 542–547.
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., Wang, F., 2010. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnol. Adv.* 28, 628–634.
- Ferrari, Étude de la sélectivité d'acylation enzymatique de peptides : prédiction de la sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* par modélisation moléculaire et recherche de nouvelles enzymes spécifiques de type aminoacylases (2014).
- Thibessard, A., Haas, D., Gerbaud, C., Aigle, B., Lautru, S., Pernodet, J.-L., Leblond, P., 2015. Complete genome sequence of *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877, the spiramycin producer. *J. Biotechnol.* 214, 117–118.
- Tirado-Rives, J., Jorgensen, W.L., 2006. Contribution of Conformer Focusing to the Uncertainty in Predicting Free Energies for Protein–Ligand Binding. *J. Med. Chem.* 49, 5880–5884.
- Tufvesson, P., Annerling, A., Hatti-Kaul, R., Adlercreutz, D., 2007. Solvent-free enzymatic synthesis of fatty alkanolamides. *Biotechnol. Bioeng.* 97, 447–453.
- Turner, N.A., Vulfson, E.N., 2000. At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity? *Enzyme Microb. Technol.* 27, 108–113.
- Ueda, S., Kinoshita, M., Tanaka, F., Tsuboi, M., Shimizu, S., Oohata, N., Hino, M., Yamada, M., Isogai, Y., Hashimoto, S., 2011. Strain selection and scale-up fermentation for FR901379 acylase production by *Streptomyces* sp. no. 6907. *J. Biosci. Bioeng.* 112, 409–414.
- Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S., Jones, T.A., 1994a. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2, 293–308.
- Uppenberg, J., Öhrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G.J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T., Alwyn Jones, T., 1995. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry (Mosc.)* 34, 16838–16851.
- Uppenberg, J., Patkar, S., Bergfors, T., Jones, T.A., 1994. Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *J. Mol. Biol.* 235, 790–792.
- Urabe, Y., Shiomi, T., Itoh, T., Kawai, A., Tsunoda, T., Mizukami, F., Sakaguchi, K., 2007. Encapsulation of Hemoglobin in Mesoporous Silica (FSM)—Enhanced Thermal Stability and Resistance to Denaturants. *ChemBioChem* 8, 668–674.
- Vaidya, B.K., Kuwar, S.S., Golegaonkar, S.B., Nene, S.N., 2012. Preparation of cross-linked enzyme aggregates of l-aminoacylase via co-aggregation with polyethyleneimine. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 74, 184–191.
- Valivety, R., Jauregi, P., Gill, I., Vulfson, E., 1997. Chemo-enzymatic synthesis of amino acid-based surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 879–886.
- Valivety, R.H., Halling, P.J., Macrae, A.R., 1993. Water as a competitive inhibitor of lipase-catalysed esterification in organic media. *Biotechnol. Lett.* 15, 1133–1138.
- Valivety, R.H., Halling, P.J., Macrae, A.R., 1992. Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1118, 218–222.
- van Langen, L.M., Janssen, M.H.A., Oosthoek, N.H.P., Pereira, S.R.M., Švedas, V.K., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., 2002. Active site titration as a tool for the evaluation of immobilization procedures of penicillin acylase. *Biotechnol. Bioeng.* 79, 224–228.
- van Rantwijk, F., Madeira Lau, R., Sheldon, R.A., 2003. Biocatalytic transformations in ionic liquids. *Trends Biotechnol.* 21, 131–138.

- Varghese, S., Halling, P.J., Häussinger, D., Wimperis, S., 2016. High-Resolution Structural Characterization of a Heterogeneous Biocatalyst Using Solid-State NMR. *J. Phys. Chem. C* 120, 28717–28726. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b11575>
- Vaysse, L., Ly, A., Moulin, G., Dubreucq, E., 2002. Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 648–655.
- Venkatachalam, C.M., Jiang, X., Oldfield, T., Waldman, M., 2003. LigandFit: a novel method for the shape-directed rapid docking of ligands to protein active sites. *J. Mol. Graph. Model.* 21, 289–307.
- Verheyen, A., Peeraer, E., Lambrechts, D., Poesen, K., Carmeliet, P., Shibuya, M., Pintelon, I., Timmermans, J.-P., Nuydens, R., Meert, T., 2013. Therapeutic potential of VEGF and VEGF-derived peptide in peripheral neuropathies. *Neuroscience* 244, 77–89.
- Villeneuve, P., 2007. Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnol. Adv.* 25, 515–536.
- Vinardell, M.P., Benavides, T., Mitjans, M., Infante, M.R., Clapés, P., Clothier, R., 2008. Comparative evaluation of cytotoxicity and phototoxicity of mono and diacylglycerol amino acid-based surfactants. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3837–3841.
- Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J., Khrestchatisky, M., 2010. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov. Today* 15, 40–56.
- Wada, E., Handa, M., Imamura, K., Sakiyama, T., Adachi, S., Matsuno, R., Nakanishi, K., 2002. Enzymatic synthesis of N-acyl-L-amino acids in a glycerol-water system using acylase I from pig kidney. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79, 41–46.
- Wang, H., Jiang, Y., Zhou, L., He, Y., Gao, J., 2013. Immobilization of penicillin G acylase on macrocellular heterogeneous silica-based monoliths. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 96, 1–5.
- Warren, G.L., Andrews, C.W., Capelli, A.-M., Clarke, B., LaLonde, J., Lambert, M.H., Lindvall, M., Nevins, N., Semus, S.F., Senger, S., Tedesco, G., Wall, I.D., Woolven, J.M., Peishoff, C.E., Head, M.S., 2006. A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions. *J. Med. Chem.* 49, 5912–5931.
- Wehtje, E., Costes, D., Adlercreutz, P., 1997. Enantioselectivity of lipases: effects of water activity. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 3, 221–230.
- Weiner, S.J., Kollman, P.A., Case, D.A., Singh, U.C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S., Weiner, P., 1984. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 765–784.
- Wescott, C.R., Klibanov, A.M., 1994. The solvent dependence of enzyme specificity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1206, 1–9.
- Witt, K.A., Gillespie, T.J., Huber, J.D., Egleton, R.D., Davis, T.P., 2001. Peptide drug modifications to enhance bioavailability and blood-brain barrier permeability. *Peptides* 22, 2329–2343.
- Wu, G., Robertson, D.H., Brooks, C.L., Vieth, M., 2003. Detailed analysis of grid-based molecular docking: A case study of CDOCKER—A CHARMM-based MD docking algorithm. *J. Comput. Chem.* 24, 1549–1562.
- Wu, J.M., Jan, P.S., Yu, H.C., Haung, H.Y., Fang, H.J., Chang, Y.I., Cheng, J.W., Chen, H.M., 2009. Structure and function of a custom anticancer peptide, CB1a. *Peptides* 30, 839–848.
- Yadav, G.D., Borkar, I.V., 2009. Kinetic and Mechanistic Investigation of Microwave-Assisted Lipase Catalyzed Synthesis of Citronellyl Acetate. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 7915–7922.
- Yadav, G.D., Hude, M.P., Talpade, A.D., 2015. Microwave assisted process intensification of lipase catalyzed transesterification of 1,2 propanediol with dimethyl carbonate for the

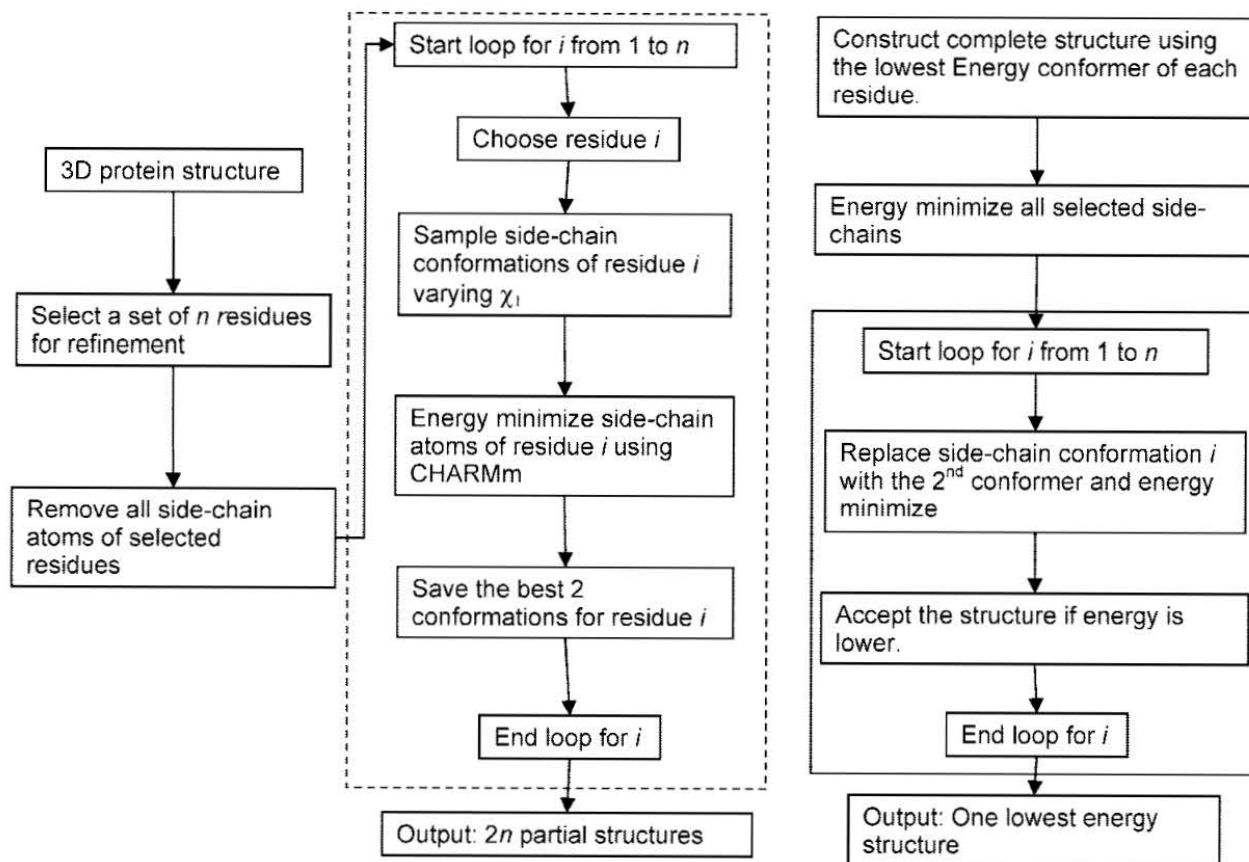
- green synthesis of propylene carbonate: Novelties of kinetics and mechanism of consecutive reactions. *Chem. Eng. J.* 281, 199–208.
- Yasmin, T., Jiang, T., Han, B., 2007. Novozym 435 catalyzed regioselective acylation of ethane-1,2-diol in the presence of ionic liquids. *Catal. Lett.* 116, 46–49.
- Yasmin, T., Jiang, T., Han, B., Zhang, J., Ma, X., 2006. Transesterification reaction catalysed by Novozym 435 in supercritical carbon dioxide. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 41, 27–31.
- Ye, J., Zhao, H., Wang, H., Bian, J., Zheng, R., 2010. A defensin antimicrobial peptide from the venoms of *Nasonia vitripennis*. *Toxicon* 56, 101–106.
- Yuriev, E., Ramsland, P.A., 2013. Latest developments in molecular docking: 2010-2011 in review. *J. Mol. Recognit. JMR* 26, 215–239.
- Yusof, F., Khanahmadi, S., Amid, A., Mahmud, S.S., 2016. Cocoa pod husk, a new source of hydrolase enzymes for preparation of cross-linked enzyme aggregate. *SpringerPlus* 5.
- Zaks, A., Klibanov, A.M., 1988. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.* 263, 3194–3201.
- Zaks, A., Klibanov, A.M., 1985. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82.
- Zaks, A., Klibanov, A.M., 1984. Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. *Science* 224.
- Zhang, B., Wang, J., Chen, J., Zhang, H., Yin, D., Zhang, Q., 2017. Magnetic mesoporous microspheres modified with hyperbranched amine for the immobilization of penicillin G acylase. *Biochem. Eng. J.* 127, 43–52.
- Zhang, D., Koreishi, M., Imanaka, H., Imamura, K., Nakanishi, K., 2007. Cloning and characterization of penicillin V acylase from *Streptomyces mobaraensis*. *J. Biotechnol.* 128, 788–800.
- Zhang, H., Dunphy, D.R., Jiang, X., Meng, H., Sun, B., Tarn, D., Xue, M., Wang, X., Lin, S., Ji, Z., Li, R., Garcia, F.L., Yang, J., Kirk, M.L., Xia, T., Zink, J.I., Nel, A., Brinker, C.J., 2012. Processing pathway dependence of amorphous silica nanoparticle toxicity - colloidal versus pyrolytic. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 15790.
- Zhang, L., Robertson, C.R., Green, B.R., Pruess, T.H., White, H.S., Bulaj, G., 2009. Structural Requirements for a Lipoamino Acid in Modulating the Anticonvulsant Activities of Systemically Active Galanin Analogues. *J. Med. Chem.* 52, 1310–1316.
- Zhang, X., Adachi, S., Watanabe, Y., Matsuno, R., 2005. Lipase-catalyzed synthesis of O-lauroyl l-serinamide and O-lauroyl l-threoninamide. *Food Res. Int., Food of the 21st Century: Safety & Health* 38, 297–300.
- Zhao, H., 2010. Microwave-assisted enzymatic reactions in aqueous media, in: *Aqueous Microwave Assisted Chemistry*. pp. 123–144.
- Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Zhang, X., Li, H., Gao, M., 2006. The effect of microwave irradiation on enzymatic hydrolysis of rice straw. *Bioresour. Technol.* 97, 1964–1968.

Annexes

Annexe 1: Schéma résumé de l'algorithme ChiFlex (Koska et al., 2008)



Annexe 2 : Schéma résumé de l'algorithme ChiRotor (Koska et al., 2008)



Approche multi-échelle pour l'étude de la réaction de N-acylation enzymatique d'acides aminés

La réaction de N-acylation d'acides aminés ou de peptides permet l'obtention de dérivés de ces molécules présentant des propriétés bioactives et/ou techno-fonctionnelles, avec une biodisponibilité, une hydrophobie et une stabilité accrue. Les acides aminés acylés ont été largement décrits comme constituant une classe d'agents tensioactifs avec d'excellentes propriétés de surface, des activités biologiques intéressantes, un faible potentiel de toxicité et un faible impact environnemental. Actuellement réalisée de manière chimique à l'échelle industrielle, l'acylation de ces acides aminés ou peptides présente des contraintes en termes de sélectivité réactionnelle et d'innocuité vis-à-vis de l'environnement ainsi qu'en termes de coût de retraitement des effluents polluants. Une alternative à cette voie chimique est l'utilisation d'enzymes capables de catalyser ces réactions d'acylation. Dans la littérature, différents couples d'enzymes et de solvants ont déjà été décrits. Néanmoins, les performances réactionnelles de ces systèmes demeurent parfois limitées. L'objectif de cette thèse a donc été l'amélioration du procédé d'acylation par une approche à différentes échelles. À l'échelle moléculaire, une étude a été réalisée avec la lipase B de *Candida antarctica* (CALB). Une approche de modélisation moléculaire a été utilisée afin de mettre au point une méthodologie associant des simulations de docking et des calculs d'interaction permettant d'améliorer la compréhension et permettre la prédiction de la régiosélectivité de CALB lors de l'acylation de la lysine par différents acides gras. Des études ont également été conduites à l'échelle réactionnelle, notamment avec la recherche de nouveaux biocatalyseurs de type aminoacylases dans l'extrait brut de *Streptomyces ambofaciens*. La régiosélectivité et les performances de la réaction catalysée par ces enzymes ont été comparés à celles de CALB. Les résultats ont mis en évidence un potentiel très prometteur des aminoacylases de *S. ambofaciens* concernant la synthèse d'acide aminés/peptides acylés. En effet, en plus de leur aptitude à réaliser la réaction d'acylation en milieu aqueux, ces enzymes possèdent une régio-sélectivité qui diffère de celle de CALB. Cette régio-sélectivité orientée vers les groupements N-terminaux est un atout très peu décrit à ce jour, car elle permet d'acyler ces molécules sans modifier les chaînes latérales des acides aminés ou des peptides et donc leurs fonctionnalités. Dans la dernière partie de ces travaux, des études à l'échelle procédée ont été menées. Tout d'abord, l'immobilisation des aminoacylases sur des matériaux mésoporeux silicatés a été réalisée et différentes méthodes d'immobilisation ont pu être comparées. Cette étude a permis de proposer une méthode d'immobilisation des aminoacylases de *S. ambofaciens* par physisorption, permettant de conserver l'activité spécifique pendant au moins 3 cycles. Puis, dans une dernière partie, l'intensification de la réaction d'acylation en réacteur microondes ou microstructurés a été abordée. Les expérimentations réalisées dans un réacteur chauffé par irradiation micro-onde ont montré que ce type de réacteur était adapté à la réaction d'acylation catalysé par CALB sous sa forme immobilisée commerciale (Novozym435®) en solvant organique, ce qui n'est pas le cas avec des aminoacylases de *S. ambofaciens* libres, en milieux aqueux. Pour cette réaction, d'autres méthodes d'intensification ont été envisagées, notamment en réacteur microstructuré de type microfluidique. L'efficacité du mélange étant primordiale notamment en milieu biphasique, celle-ci a pu être améliorée avec un taux de conversion supérieur dans ce réacteur comparativement à un réacteur classique agité mécaniquement.

Mots clés : N-acylation, catalyse enzymatique, modélisation moléculaire, lipase, aminoacylase, immobilisation d'enzyme

Multi-scale approach for the study of enzymatic N-acylation reaction of amino acids

N-acylation of amino acids or peptides results in bioactive and/or functional molecules showing increased bioavailability, hydrophobicity and stability. Acylated amino acids have been broadly described as being a kind of surfactant with great surface chemistry properties, interesting biological activities, weak toxicity and low environmental impact. Acylation of amino acids or peptides is being performed chemically at industrial scale. It creates constraints in term of reaction selectivity, environmental safety and cost of polluted wastewater treatment. Enzymatic catalysis is an alternative to chemical acylation reaction. Several enzyme/solvent pairs have already been described in the literature. Their performance are however somewhat limited. The objective of this thesis work was thus to improve the capacity of acylation processes at different scales. At the molecular scale, a study was performed using *Candida antarctica*'s (CALB) lipase B. Molecular modeling was used to create a methodology coupling docking simulation and interaction calculus that would allow for a better understanding of CALB regioselectivity during lysine acylation by different fatty acids. Studies were also conducted at the reaction level, especially by searching for new aminoacylase-type of biocatalysts in *Streptomyces ambofaciens* raw extract. Regioselectivity and performance of these enzyme's catalytic reactions were compared to those of CALB. Results brought into light a promising potential from *S. ambofaciens*' aminoacylases in synthesizing acylated amino acids/peptides. Indeed, on top of their ability to catalyse acylation reaction in aqueous solution, these enzymes have a different regioselectivity compared to CALB's. Regioselectivity targeting N-terminal groups is a rarely researched phenomenon allowing acylation to be performed without modifying amino acids or peptides lateral chains and hence their functionality. In the last part part of this work, studies at process scale were performed. Aminoacylase were first immobilized on mesoporous silicates and several immobilisation methods were compared. Using physisorption, a method for the immobilisation of *S. ambofaciens*' aminoacylases was developed to reach a conserved specific activity during 3 cycles. Finally, intensification of acylation reaction was examined in microwave or microstructured reactors. First, an experimental set up was performed in an heated reactor using microwaves irradiation. This kind of reactor was demonstrated as being adapted to acylation reaction using a commercial immobilized form of CALB (Novozym435®) as catalyst in organic solvent. The microwave reactor was however not suited for free *S. ambofaciens* aminoacylase in aqueous solution. For that latter reaction, intensification had to be approached through other aspects of the process. Hydrodynamic appeared indeed as an important aspect for this reaction occurring in a biphasic medium composed of fatty acids and aqueous solution. A microstructured microfluidic reactor was hence tested. Conversion yield were increased with this system. This study demonstrated how mixing quality was an important factor for acylation reaction and could be a way to intensify the enzymatic process at larger scale.

Keywords: N-acylation, enzymatic catalysis, molecular modelisation, lipase, aminoacylase, enzyme immobilisation