

**UNIVERSITÉ D'EVRY VAL D'ESSONNE**

**THÈSE**

En vue d'obtenir le grade de

**DOCTEUR EN SCIENCE DE L'UNIVERSITÉ D'EVRY VAL  
D'ESSONNE**

Spécialité : CHIMIE ORGANIQUE

Par

**Damien BAUD**

**Oxydation biocatalytique de liaison C-H non activée pour la  
synthèse de dérivés  $\beta$ -hydroxylamines : application à la synthèse  
d'acides aminés non protéinogènes**

Devant la Commission d'examen formée de :

Pr. Marielle Lemaire (rapporteur)

Pr. Marius Réglie (rapporteur)

Pr. Soizic Prado (examineur)

Dr. Pierre-Loïc Saaidi (co-encadrant, examineur)

Pr. Anne Zaparucha (directrice de thèse)



CONFIDENTIEL



## Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'institut de génomique (CEA) d'Evry. Je remercie Jean Weissenbach de m'avoir permis de disposer de moyens techniques remarquables ainsi que d'un soutien financier permanent à la hauteur des projets scientifiques auxquels j'ai pris part.

Je remercie vivement Marielle Lemaire, Professeur à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, de l'université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, Marius Réglie, Professeur à l'Institut des Sciences Moléculaires de Marseille (Aix-Marseille Université), et Soizic Prado, Professeur au Muséum National d'Histoire Naturelle, d'avoir accepté de juger mon travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Pr Anne Zapparucha, qui m'a accueilli dans son équipe, m'a encadré pendant cette thèse et a élaboré un sujet original et passionnant. Sa gentillesse, sa disponibilité et son soutien sans faille m'ont permis de m'épanouir scientifiquement et humainement.

Mes remerciements vont également au Dr Pierre-Loïc Saaidi, pour son aide au quotidien, son encadrement, son sens du détail, son sens du détail ou encore son sens du détail.

Je remercie également Carine Vergne Vaxelaire, docteur ingénieur, et Aurélie Fossey, technicienne supérieur, pour leur bonne humeur, leur gentillesse mais aussi pour l'aide qu'elles ont pu m'apporter au cours de ma thèse. Pour Aurélie, je rajouterai merci pour les encouragements et les coups de stress des deux derniers mois.

Un grand merci à Marine et Adam, stagiaires M1 et M2, qui se sont laissés exploiter par mes soins pour faire avancer le projet.

J'adresse également mes remerciements à tous les gens qui ont participé au projet, que ce soit de près ou de loin : Marcel, Véronique, Alain, Christine, Marielle, Aline, Lucille, Ekatarina, Jean-Louis, Adrien, Virginie, Arthur, Karine.

Un merci particulier à Jean-Louis pour les apéros improvisés, à Christine pour ses remarques toujours originales et inattendues et à Lucille pour les pauses cafés, les discussions sympas mais surtout pour avoir si bien appuyé, à ma demande, sur le bouton de l'ORBITRAP et de m'avoir prêté tous les « sexy dance ».

Je remercie également remercier les collègues du Genoscope et de l'INRA (Damien, Stephan ...) pour les parties de foot même si j'avoue que j'ai lâchement capitulé lors de ma troisième année de thèse.

Je souhaite remercier tout particulièrement Olek de l'université d'Evry, pour son aide sur l'interprétation de spectres RMN étranges ainsi que pour sa gentillesse.

Mes remerciements vont également aux autres membres de l'université d'Evry avec qui j'ai eu l'honneur de travailler que ce soit pendant mes enseignements, pour la fête de la science : Julien, Cécile (\*2), Anna, Kahina, Jean-François, Florence, Myriam, Emilie ... Et tous ceux que j'ai pu oublier.

Je tiens à remercier une célèbre marque de boisson gazeuse pour son soutien sans faille durant ces trois années passées ici.

Tous les membres de mon petit zoo, Bô, Dudu, Holly, Kitoune, Mookie et Sirkis BouBou, ont toujours su quoi faire pour me reconforter dans les mauvais jours. Je leur adresse donc un grand merci.

Mille mercis pour mes amis non chimistes qui ont toujours été là pour moi et m'ont offert sans compter leur bonne humeur malgré mon manque criant de disponibilité pour les voir : Bobo, Ed, Jeremy, Vincent, Clément et Julien.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner ma compagne Bérengère, pour ses petites attentions quotidiennes, son soutien et sa patience des dernières semaines qui m'ont permis de tenir le coup. Un merci également à toute ma belle-famille. Je finirai par remercier ma mère et mon père ainsi que tout le reste de la famille qui grâce à un soutien sans faille ont rendu cela possible. Une dernière pensée pour ma grand-mère, qui a toujours été là pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments et que je remercie pour tout.

## Subject

Biocatalytic oxidation of unactivated C-H bond for the synthesis of  $\beta$ -hydroxylamine derivatives: application to the synthesis of non proteinogenic amino acids.

## Abstract

The work described in this manuscript deals with the search of new members of the  $\alpha$ -ketoglutarate and Iron-dependent dioxygenases family ( $\alpha$ -KAO) and their applications in organic synthesis. The first part of this work presents the search of new enzymes through a genomic approach based on sequence homology and InterPro motif sharing.

Two high-throughput screenings with 79 and 127 candidate enzymes have been performed on 23 and 36 substrates more or less structurally close to known metabolic substrates. 8 new  $\alpha$ -KAOs have been discovered.

Among these new enzymes, four were studied in more details. After optimization of the enzymatic reaction conditions for each enzyme, scale-up allowed to obtain compounds for isolation and characterization. With these four enzymes, (3*S*)-3-hydroxy-L-lysine, (4*R*)-4-hydroxy-L-lysine as its cyclic derivative, (3*S*)-3-hydroxy-L-ornithine and a derivative of (3*S*)-3-hydroxy-L-arginine were produced.

Two of the new  $\alpha$ -KAO were combined in a cascade process to afford the (3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxy-L-lysine as its cyclic derivative.

We proposed a biocatalytic synthesis of mono and hydroxydiamines by coupling one or two  $\alpha$ -KAO with a decarboxylase enzyme. (2*S*)-1,5-diamino-2-pentanol, 1,5-diamino-3-pentanol, (2*S*)-1,4-diamino-2-butanol and (2*S*,3*S*)-1,5-diamino-2,3-pentanediol were obtained with good overall conversions.

## Keywords

$\alpha$ -KAO, biocatalytic hydroxylation, unactivated C-H bond, high-throughput screening, genomic approach, biocatalytic cascade.



## Sujet

Oxydation biocatalytique de liaison C-H non activée pour la synthèse de dérivés  $\beta$ -hydroxylamines : application à la synthèse d'acides aminés non protéinogènes.

## Résumé

Le travail présenté dans ce manuscrit porte sur la recherche de nouveaux membres de la famille des dioxygénases  $\alpha$ -cétoglutarate et fer dépendantes ( $\alpha$ -KAO) et leur application en synthèse organique. Dans un premier, ce travail a consisté à chercher de nouvelles enzymes selon une approche génomique basée sur l'homologie de séquence et le partage d'un motif InterPro.

Deux criblages haut débit avec 79 et 127 enzymes candidates ont ensuite été effectués sur des panels constitués respectivement de 23 et 36 substrats, structurellement plus ou moins proches des substrats métaboliques. Huit nouvelles  $\alpha$ -KAO ont ainsi pu être découvertes.

Parmi ces huit nouvelles  $\alpha$ -KAO, quatre ont été étudiées plus en détail. Après optimisation des conditions de réaction pour chaque enzyme, des montées en échelle ont été réalisées pour caractériser les produits formés. A partir de ces quatre enzymes, la (3*S*)-3-hydroxy-L-lysine, un dérivé cyclisé de la (4*R*)-4-hydroxy-L-lysine, (3*S*)-3-hydroxy-L-ornithine et un dérivé de la (3*S*)-3-hydroxy-L-arginine ont pu être produits.

Nous avons proposé une synthèse biocatalytique de mono et dihydroxydiamines en couplant une ou deux  $\alpha$ KAO avec une décarboxylase. Les (2*S*)-1,5-diamino-2-pentanol, 1,5-diamino-3-pentanol, (2*S*)-1,4-diamino-2-butanol et (2*S*,3*S*)-1,5-diamino-2,3-pentane-2,3-diol ont ainsi été obtenus avec de bonnes conversions.

## Mots Clés

$\alpha$ -KAO, hydroxylation biocatalytique, liaison Csp<sup>3</sup>-H non activée, criblage haut débit, approche génomique, cascade biocatalytique.



# Sommaire

<b>ABREVIATIONS</b> .....	17
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	21
<b>CHAPITRE I</b>	
<b>Présentation du sujet de recherche et de son contexte</b> .....	25
I.1- Introduction .....	25
I.2- Halogénéation d'alcanes .....	25
I.2.1- Dichlore .....	26
I.2.2- Hypohalogénite .....	26
I.2.3- Catalyseurs métalliques .....	28
I.2.4- Catalyseurs biomimétiques .....	29
I.3- Insertion d'un atome d'azote dans une liaison C-H non activée .....	31
I.4- Insertion d'un atome d'oxygène dans une liaison C-H non activée .....	32
I.4.1- Diméthyl-dioxiranes et méthyl(trifluorométhyl)dioxiranes .....	33
I.4.2- Perfluorodialkyloxaziridine .....	35
I.4.3- Catalyseurs métalliques .....	36
I.4.4- Catalyseurs biomimétiques .....	40
I.4.5- - Insertion de silicium comme oxygène masqué .....	43
I.5- Oxydation d'une liaison C-H non activée par voie biocatalytique .....	44
I.5.1- Monooxygénase cofacteur indépendante .....	45
I.5.2- Monooxygénase fer non héminique dépendante .....	47
I.5.3- Monooxygénase cuivre dépendante .....	48
I.5.4- Flavoprotéine monooxygénase .....	49
I.5.5- Cytochrome P450 monooxygénase .....	52
I.5.5.a - Présentation générale .....	52
I.5.5.b - Classification des P450 .....	53
I.5.5.c - Structure .....	54

I.5.5.d - Mécanisme .....	55
I.5.5.e - Diversité des réactions catalysées par les P450.....	56
I.5.5.f - Diversité de substrats des enzymes natives .....	57
I.5.5.g - Utilisation des P450 en biocatalyse.....	58
I.5.5.g.1- Intérêts et stratégies possibles .....	58
I.5.5.g.2- Limitations et applications .....	62
I.6- Conclusion .....	63

## CHAPITRE II

<b>Dioxygénases <math>\alpha</math>-cétoglutarate et fer dépendantes .....</b>	<b>67</b>
II.1- Présentation générale .....	67
II .2- Rôle biologique.....	69
II.2.1- Réparation d'ADN .....	69
II.2.2- Biosynthèse de la L-carnitine .....	70
II.2.3- Collagène .....	71
II.2.4- Biosynthèse des gibbérellines .....	71
II.2.5- Biosynthèse d'alcaloïdes.....	73
II.2.6- Biosynthèse d'antibiotiques.....	73
II.2.6.a- Peptides non ribosomiaux .....	73
II.2.6.a.1- Antibiotiques calcium-dépendant .....	74
II.2.6.a.2- Viomycine .....	74
II.2.6.a.3- Mannopeptimycines .....	75
II.2.6.a.4- Syringomycines.....	75
II.2.6.b- Acide clavulanique .....	76
II.2.6.c- Carbapénème.....	76
II.2.6.d- Pénicillines et céphalosporines .....	77
II .3- Diversité de substrats .....	77
II .4- Structures .....	83
II.4.1- Séquence nucléotidique .....	83
II.4.2- Structure 3D .....	83
II .5- Mécanisme.....	85
II .6- Les $\alpha$ -KAO en biocatalyse .....	86

II .7- Les enjeux et les axes d'études .....	90
--	----

## CHAPITRE III

<b>Criblage haut débit pour la recherche de nouvelles <math>\alpha</math>-KAO.....</b>	<b>93</b>
III.1- Introduction .....	93
III.2- Sélection et production des enzymes candidates.....	95
III.2.1- Approche génomique.....	95
III.2.1.a- Présentation.....	95
III.2.1b- Sélection des enzymes candidates .....	96
III.2.1.b.1- Sélection des enzymes pour le premier criblage .....	96
III.2.1.b.2- Sélection des enzymes pour le second criblage .....	97
III.2.2- Production des enzymes candidates .....	98
III.3- Choix et mise au point d'un test de détection applicable à un criblage haut débit ....	99
III.3.1- Tests déjà utilisés dans la littérature pour le dosage de l'activité dioxygénase .	100
III.3.1.a- Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	100
III.3.1.b- MS ou LC-MS .....	100
III.3.1.c- Utilisation de substrats ou produits radioactifs.....	100
III.3.1.d- Dérivatisation pour suivi colorimétrique ou UV .....	101
III.3.1.e- Dosage du succinate.....	101
III.3.1.f- Dosage de l' $\alpha$ -cétoglutarate .....	102
III.3.2- Mise au point du test à la GDH pour la détection de l'activité $\alpha$ -KAO .....	103
III.4- Sélection des substrats.....	104
III.4.1- Sélection de substrats pour le premier criblage .....	104
III.4.2- Sélection de substrats pour le second criblage .....	106
III.4.3- Synthèse des substrats non commerciaux .....	107
III.4.3.a- Synthèse du L-aspartyl-SNAC .....	108
III.4.3.b- Synthèse des ammoniums quaternaires .....	108
III.4.3.c- Synthèse de la $\beta$ -lactame L-ornithine .....	109
III .5- Réalisation des criblages haut débit .....	109
III.5.1- Premier criblage.....	109
III.5.1.a- Conditions de réaction .....	109

III.5.1.b- Protocole.....	110
III.5.1.c- Méthode d'analyse des résultats .....	111
III.5.1.d- Résultats du premier criblage .....	113
III.5.1.e- Vérification des activités enzymatiques .....	114
III.5.2- Second criblage .....	115
III.5.2.a- Conditions de réaction et protocole .....	115
III.5.2.b- Résultats du second criblage .....	116
III.5.2.c- Vérification des activités enzymatiques .....	118
III.6- Conclusion.....	118

## CHAPITRE IV

<b>Etude des nouvelles <math>\alpha</math>-KAO .....</b>	<b>123</b>
IV.1- Introduction .....	123
IV.2- Conditions de dérivatisation.....	124
IV.3- Optimisation des conditions.....	124
IV.4- Montée en échelle .....	127
IV.5- Isolement et caractérisation des produits .....	129
IV.5.1- Purification directe .....	130
IV.5.2- Purification après dérivatisation et caractérisation des produits formés .....	130
IV.5.2.a- Purification du produit formé par LDO1 .....	132
IV.5.2.b- Caractérisation du produit formé par LDO1 .....	136
IV.5.2.c- Purification du produit formé par LDO2.....	137
IV.5.2.d- Caractérisation du produit formé par LDO2 .....	138
IV.5.2.e- Purification et caractérisation du produit formé par LDO3.....	138
IV.5.2.f- Purification du produit formé par OADO .....	138
IV.5.2.f.1- Purification du produit formé par OADO avec la L-ornithine.....	139
IV.5.2.f.2- Caractérisation du produit formé par OADO avec la L-ornithine .....	139
IV.5.2.f.3- Purification du produit formé par OADO avec la L-arginine.....	139
IV.5.2.f.4- Caractérisation du produit formé par OADO avec la L-arginine .....	140
IV.6- Etude de la promiscuité de substrats de LDO1, LDO2, LDO3 et OADO .....	141
IV.7- Modélisation moléculaire.....	144
IV.8- Conclusion .....	148

## CHAPITRE V

<b>Applications</b> .....	153
V.1- Introduction .....	153
V.2- (3,5)-dihydroxy-L-lysine et (4,5)-dihydroxy-L-lysine .....	154
V.3- Synthèse de la (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> )-3,4-dihydroxy-L-lysine sous forme cyclique .....	154
V.3.1- Etudes des conditions réactionnelles de la cascade .....	154
V.3.2- Montée en échelle .....	155
V.3.2.a- Purification du produit avec la cascade LDO1/LDO3 .....	156
V.3.2.b- Caractérisation du produit formé avec la cascade LDO1/LDO3 .....	157
V.4- Diamines hydroxylées .....	157
V.4.1- Intérêts .....	157
V.4.2- Recherche de décarboxylases .....	159
V.4.3- Test des décarboxylase sur la L-lysine et L-ornithine .....	160
V.4.4- Réactions en cascade .....	160
V.5- Conclusion .....	162
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	167
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b> .....	171
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	225
<b>ANNEXES</b> .....	237
<b>Annexe 1 : Noms des <math>\alpha</math>-KAO</b> .....	237
<b>Annexe 2 : Liste des enzymes candidates du premier criblage</b> .....	243
<b>Annexe 3 : Liste des enzymes candidates du second criblage</b> .....	251
<b>Annexe 4 : Résultats du premier criblage</b> .....	257
<b>Annexe 5 : Résultats du second criblage</b> .....	259



## Abréviations

$\delta$  : déplacement chimique  
 $\lambda$  : longueur d'onde  
 $\alpha$ -KAO : dioxygénase  $\alpha$ -cétoglutarate et fer dépendante  
Ac : acétyle  
AcOH : acide acétique  
Ac<sub>2</sub>O : anhydride acétique  
ADN : acide deoxyribonucléique  
ADP : adenosine diphosphate  
ATP : adénosine-5'-triphosphate  
Anh. : anhydre  
Bn : benzyle  
Boc : *tert*-butyl oxycarbonyle  
BMO : oxyde de manganèse biogénique  
Cat. : catalytique  
Cbz : benzyloxycarbonyle  
CCM : chromatographie sur couche mince  
CDA : antibiotique calcium dépendant  
Conv : conversion  
CTDD : ethyl acetate/acetone/water/formic acid 5/3/2/2: v/v/v/v  
CTUU : ethyl acetate/acetone/water/formic acid 5/3/1/1/: v/v/v/v  
DDO : diméthylidioxirane  
D.O. : densité optique  
DCC : dicyclohexylcarbodiimide  
DCM : dichlorométhane  
DEDL : détecteur évaporatif à diffusion de lumière  
DIPEA : diisopropyléthylamine  
DMAP : 4-diméthylaminopyridine  
DMF : diméthylformamide  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
DTT : dithiothréitol  
EDC : 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide  
e.e. : excès énantiomérique  
EP : éther de pétrole  
éq : équivalent  
Et : éthyle  
FAD : flavine adénine dinucléotide  
FDAA : *N*<sub>α</sub>-(2,4-Dinitro-5-fluorophenyl)-*L*-alaninamide (réactif de Marfey)  
FDNB : dinitrofluorobenzène  
FMN : flavine mononucléotide  
Fmoc-Cl : chloroformiate de (9-fluorénylméthyle)  
FPLC : fast protein liquid chromatography  
GA : gibbérelline  
GDH : glutamate deshydrogénase

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique  
HPLC : chromatographie liquide haute performance  
Hz : hertz  
IPNS : Isopénicilline N synthase  
IPTG : isopropylthio-b-D-galactoside  
*J* : constante de couplage  
LABIS : laboratoire d'analyses bioinformatiques des séquences  
LCAB : laboratoire de clonage et de criblage des activités de bioconversion  
LCOB : laboratoire de chimie organique et de biocatalyse  
MeCN : acétonitrile  
MeOH : méthanol  
MMO : méthanol monooxygénase  
Mp : Melting point / point de fusion  
MS : spectrométrie de masse  
MTPA : acide  $\alpha$ -methoxy- $\alpha$ -trifluorométhylphenylacetic (acide de Mosher)  
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide  
NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
NOESY : nuclear overhauser effect spectroscopy  
NRPS : peptides non ribosomaux  
PCR : réaction en chaîne par polymérase  
PTC : catalyseur de transfert de phase  
Ph : phényle  
PLC : preparative liquid chromatography  
PLP : pyridoxal phosphate  
Ppm : parti par million  
Rf : rapport frontal  
RMN : résonance magnétique nucléaire  
ROESY : rotating-frame nuclear overhauser effect correlation spectroscopy  
tBu : tert-butyle  
TA : température ambiante  
TDFO : méthyl(trifluorométhyl)dioxirane  
TFA : acide trifluoroacétique  
TFP : 1,1,1-trifluoropropanone  
THF : tétrahydrofurane  
TLC : thin-layer chromatography  
TRIS : trishydroxyméthylaminométhane  
Ts : tosyle  
UV : ultraviolet

# **Introduction générale**



## Introduction générale

La biocatalyse est, par définition, l'utilisation d'enzymes et de microorganismes en chimie de synthèse. Ces catalyseurs du vivant (biocatalyseurs) sont le plus souvent utilisés dans un but précis : les détourner leur rôle initial (métabolique) vers une utilisation pour laquelle ils n'ont pas évolué.

La biocatalyse permet la catalyse de réactions variées et présente de nombreux avantages comparée à la chimie organique de synthèse notamment parce que les réactions biocatalysées sont le plus souvent très régio- et stéréosélectives. Les réactions se font souvent à température modérée (<100°C) et sous pression atmosphérique, en milieu aqueux, évitant les conditions drastiques entraînant la formation de produits secondaires non désirés. De plus, parce ce sont des catalyseurs, qu'ils sont biodégradables, les enzymes sont une « option verte » pour la chimie de synthèse. Ainsi il est naturel que durant la dernière décennie, de nombreux chimistes, tant académiques qu'industriels, se soient tournés vers la biocatalyse. De nombreuses synthèses, incluant une ou plusieurs étapes biocatalytiques, ont ainsi pu être réalisées comme la synthèse de la Sitagliptine, composé aux propriétés antidiabétiques<sup>1</sup>.

La biocatalyse est également très intéressante parce qu'elle permet la catalyse de réactions « impossibles » ou très difficiles, comme par exemple, l'oxydation d'une liaison C-H non activée. Cela permet de redessiner des voies de synthèses plus courtes, moins onéreuses et surtout plus écologiques.

C'est dans cette optique, qu'en 2008, le Laboratoire de Chimie Organique et Biocatalyse (LCOB) a été créé au sein de l'UMR 8030 du Genoscope (CEA)-Université Evry Val d'Essonne (CNRS). Ce laboratoire, dirigé par le Pr. Anne Zapparucha, participe à une approche pluridisciplinaire d'identification de nouvelles réactions enzymatiques en s'appuyant sur des analyses génomiques. L'équipe concentre son activité sur la recherche de nouvelles activités enzymatiques pour des applications en synthèse organique.

---

<sup>1</sup>Savile, C. K.; Janey, J. M.; Mundorff, E. C.; Moore, J. C.; Tam, S.; Jarvis, W. R.; Colbeck, J. C.; Krebber, A.; Fleitz, F. J.; Brands, J.; Devine, P. N.; Huisman, G. W.; Hughes, G. J., *Science* **2010**, 329 (5989), 305-9.

Deux activités enzymatiques sont principalement étudiées au sein du laboratoire, en collaboration avec le Laboratoire de Clonage et de Criblage des Activités de Bioconversions (LCAB), dirigé par le Dr. Véronique de Berardinis : les nitrilases et les dioxygénases  $\alpha$ -cétoglutarate et fer dépendantes. La première permet l'hydrolyse d'un nitrile en acide et la seconde l'oxydation d'une liaison C-H non activée. Mon sujet de thèse est basé sur la découverte et l'exploitation de nouveaux membres de cette seconde famille.

Après une introduction sur les oxydations de liaison C-H non activée par voie chimique et biocatalytique, la famille des dioxygénases  $\alpha$ -cétoglutarate et fer dépendantes sera présentée plus en détail dans le deuxième chapitre. Les troisième et quatrième chapitres seront consacrés au criblage effectué pour la découverte de nouvelles dioxygénases et à l'étude approfondie des résultats positifs. Enfin, le dernier chapitre sera consacré au développement d'applications à partir des nouvelles enzymes découvertes.

# **Chapitre I**

## **Présentation du sujet de recherche et de son contexte**



# Chapitre I

## Présentation du sujet de recherche et de son contexte

### I.1- Introduction

La fonctionnalisation de la liaison Csp<sup>3</sup>-H a fait l'objet de très nombreux travaux en chimie. La fonctionnalisation de liaison Csp<sup>3</sup>-H non activée, c'est-à-dire en absence de groupe fonctionnel voisin, est un véritable défi pour le chimiste organicien de par la nature inerte de cette liaison. Plusieurs réactions de formation de liaison C-hétéroatome ont été mises au point comme l'halogénéation, *i.e.* formation d'une liaison C-X, et la formation de liaisons C-N et C-O. De nombreux travaux décrivent l'halogénéation d'alcanes mais les exemples de fonctionnalisation de liaison Csp<sup>3</sup>-H non activée sur des composés déjà fonctionnalisés sont plus rares. Les principales réactions, qu'elles soient chimique ou biocatalytique, seront présentées dans ce chapitre.

### I.2- Halogénéation d'alcanes

Les alcanes sont des hydrocarbures saturés de formule brute C<sub>n</sub>H<sub>2n+2</sub> pour les non-cycliques et C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub> pour les cycliques (où *n* est nombre entier non nul). Ils peuvent se trouver sous forme linéaire comme le *n*-butane (**1**) ou ramifié comme le 2-méthylhexane (**2**) (Figure 1). Ils sont le plus souvent utilisés comme carburants.



Figure 1 : exemple d'alcanes linéaires et ramifiés

Ces composés ne sont pas fonctionnalisés et leur exploitation en synthèse organique comme bloc de base pour la construction de molécules plus complexes passe donc par l'introduction de fonctions sur la chaîne carbonée. Cependant, à cause de la nature inerte de la liaison C-H, la réactivité des alcanes est très faible, il faut donc utiliser des conditions très souvent drastiques pour introduire un hétéroatome de type halogène. Cette réaction passe par un

mécanisme radicalaire (Schéma 1) induisant une régiosélectivité due à la stabilité des radicaux formés, les plus stables étant les radicaux issus de carbones tertiaires et les moins stables de carbones primaires. Elle n'est pas stéréosélective sauf dans le cas de quelques substrats bien spécifiques. Dans cette partie, seront présentées les réactions les plus significatives.

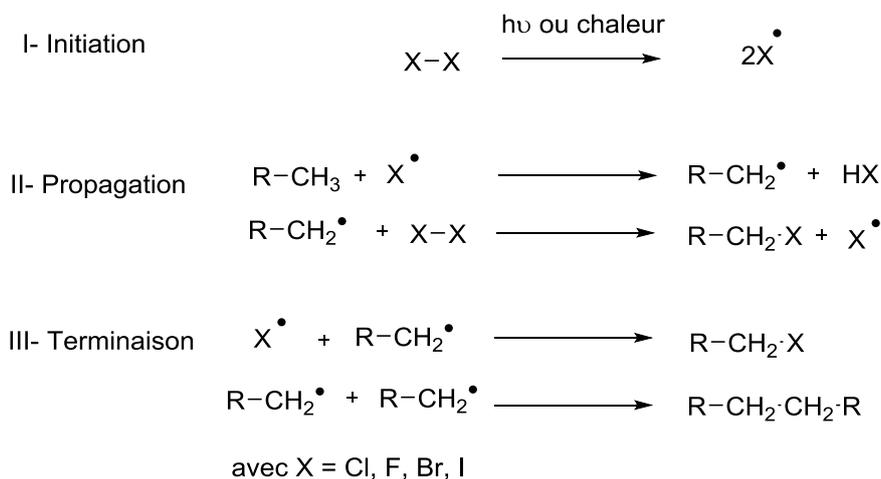


Schéma 1 : mécanisme radicalaire d'halogénéation d'un alcane

### I.2.1- Dichlore

La réaction d'halogénéation est une réaction ancienne puisque c'est en 1840 que Dumas a publié une méthode pour produire du chlorométhane, du dichlorométhane, du chloroforme et du tétrachlorométhane à partir d'acide acétique et de dichlore<sup>2</sup>. Ces travaux seront repris ensuite pour l'halogénéation non régiosélective d'alcane toujours en présence de dichlore.

### I.2.2- Hypohalogénite

En 1960, Walling *et al.*<sup>3</sup> ont synthétisé et étudié le *tert*-butyl hypochlorite, réactif donneur de radical chlore. Ce réactif permet une chloration sélective des carbones secondaires et tertiaires. Par exemple, des alcanes comme le *n*-butane (**1**) et le 2,3-diméthylbutane (**3**), vont être halogénés préférentiellement sur leur carbone secondaire et tertiaire dans un ratio (7:1) et (444:1) pour donner le 2-chloro-*n*-butane (**4**) et du 2-chloro-2,3-diméthylbutane (**5**) comme produits majoritaires (Schéma 2).

<sup>2</sup>Dumas, J., *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1840**, 33 (2), 187-189.

<sup>3</sup>Walling, C.; Jacknow, B. B., *Journal of the American Chemical Society* **1960**, 82 (23), 6108-6112.

La même équipe a également synthétisé en 1962 le *tert*-butyl hypobromite<sup>4</sup> permettant cette fois-ci la bromation d'alcane.

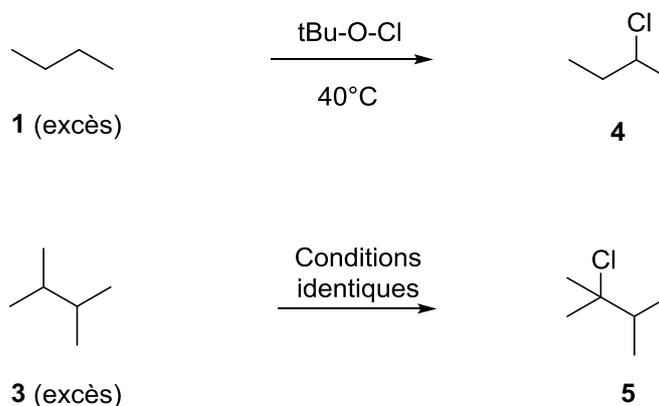


Schéma 2 : Chloration régiosélective d'alcane avec le *tert*-butylhypochlorite

Plus récemment, Fokin *et al.*<sup>5,6</sup> ont publié en 1998 et 2001 un protocole amélioré pour l'halogénéation d'alcane dans un milieu biphasique (dichlorométhane/NaOH aq 50%) en présence d'un catalyseur de transfert de phase avec génération *in situ* d'hypobromite ou d'hypochlorite. L'halogénéation régiosélective des carbones secondaires et tertiaires de substrats possédant une structure contrainte comme l'adamantane (6) et le cubane (7) est maintenant possible avec de très bons rendements (Schéma 3).

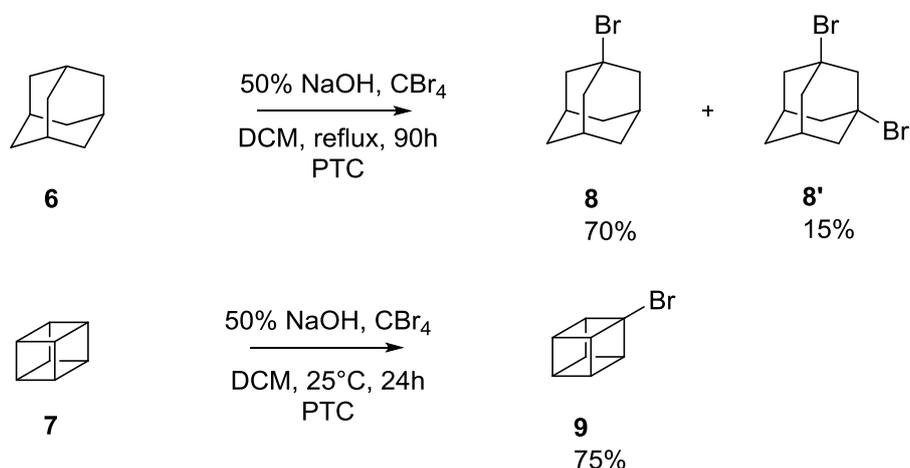


Schéma 3 : variété des substrats pouvant être halogénés

<sup>4</sup>Walling, C.; Padwa, A., *The Journal of organic chemistry* **1962**, 27 (9), 2976-2977.

<sup>5</sup>Schreiner, P. R.; Lauenstein, O.; Kolomitsyn, I. V.; Nadi, S.; Fokin, A. A., *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, 37 (13-14), 1895-1897.

<sup>6</sup>Fokin, A. A.; Lauenstein, O.; Gunchenko, P. A.; Schreiner, P. R., *J Am Chem Soc* **2001**, 123 (9), 1842-1847.

En 2003, Wirth *et al.*<sup>7</sup> ont publié une réaction permettant cette fois l'introduction d'un atome d'iode sur un alcane à partir de *tert*-butyl hypoiodite. Il n'y a toujours pas de contrôle au niveau de la stéréosélectivité et la régiosélectivité y est plus faible, comme par exemple sur le *n*-pentane (**10**) qui conduit à un mélange de 1-iodo-, 2-iodo et 3-iodo-*n*-pentane (**11**), (**11'**) et (**11''**) dans un ratio (1:1:2) (Schéma 4).

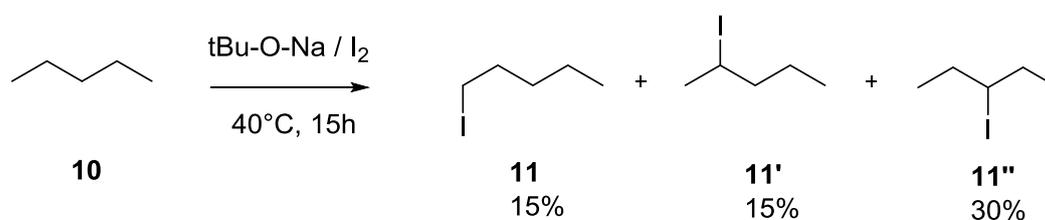


Schéma 2 : iodation du *n*-pentane

### I.2.3- Catalyseurs métalliques

De nombreux catalyseurs à base de métaux (Rh<sup>8</sup>, Ru<sup>9</sup>, Ir<sup>9</sup>...) permettant l'halogénéation de liaisons Csp<sup>3</sup>-H non activées ont été publiés depuis les années 1970. L'exemple le plus intéressant est l'oxyde de manganèse dit "biogénique" produit par des microorganismes oxydant le manganèse, publié en 2012 par Takada *et al.*<sup>10</sup> Ce catalyseur est constitué d'un ensemble de structures amorphes agglomérées contenant du manganèse à différents états d'oxydation. Sous irradiation d'une lampe fluorescente, il permet la monobromation régiosélective d'alcane aliphatiques ou cycliques. Par exemple, l'halogénéation du *n*-hexane (**12**) et du cyclooctane (**13**) permet l'obtention de 2-bromo et 3-bromo-*n*-hexane (**14**) et (**14'**) et de bromocyclooctane (**15**), respectivement, avec de très bons rendements (Schéma 5).

<sup>7</sup>Montoro, R.; Wirth, T., *Organic letters* **2003**, 5 (24), 4729-4731.

<sup>8</sup>Bergamn, R. G., 4,746,760, **1998**.

<sup>9</sup>Stössel, P., 1363 963 B1, **2002**.

<sup>10</sup>Nishina, Y.; Hashimoto, H.; Kimura, N.; Miyata, N.; Fujii, T.; Ohtani, B.; Takada, J., *RSC Advances* **2012**, 2 (16), 6420-6423

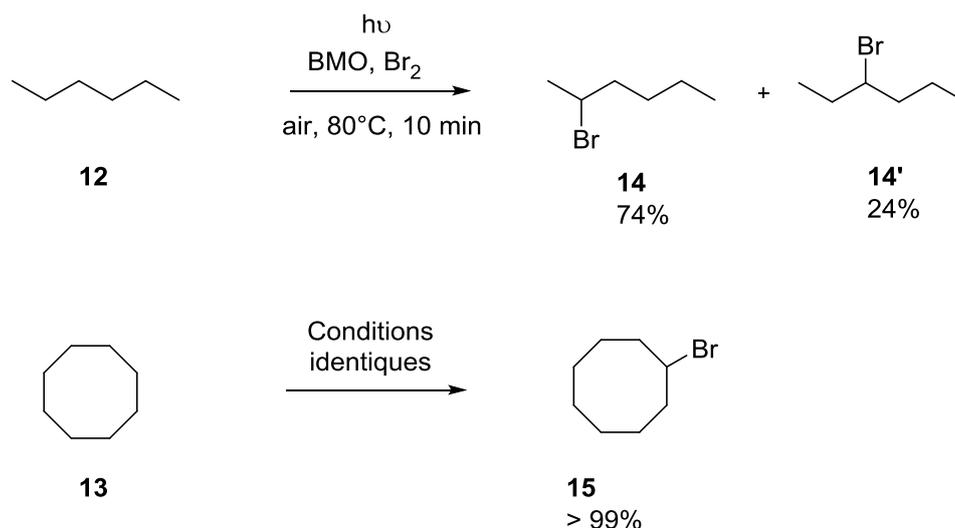


Schéma 3 : bromation régiosélective avec l'oxyde de manganèse « biogénique »

#### I.2.4- Catalyseurs biomimétiques

Au cours de l'évolution, la nature a développé une large diversité d'enzymes d'oxydation. Toutes ces enzymes possèdent un cofacteur métallique, à l'exception de quelques enzymes comme les flavoprotéines monooxygénases, le plus souvent avec un atome de fer héminique ou non. L'atome de fer étant dit héminique lorsque qu'il est contenu dans un hétérocycle appelé porphyrine. L'approche biomimétique consiste à élaborer des complexes métalliques mimant le site actif des métalloenzymes, le plus souvent un hème contenant un atome de fer. Il existe un très fort engouement pour cette approche dans la mesure où l'on cherche à retrouver l'efficacité de l'enzyme sans les difficultés potentielles liées à l'utilisation d'une enzyme (expression, purification, cofacteur ...). Ainsi, de nombreux ligands pouvant être couplés avec différents métaux ont été décrits ces dernières années<sup>11</sup> (Figure 2)

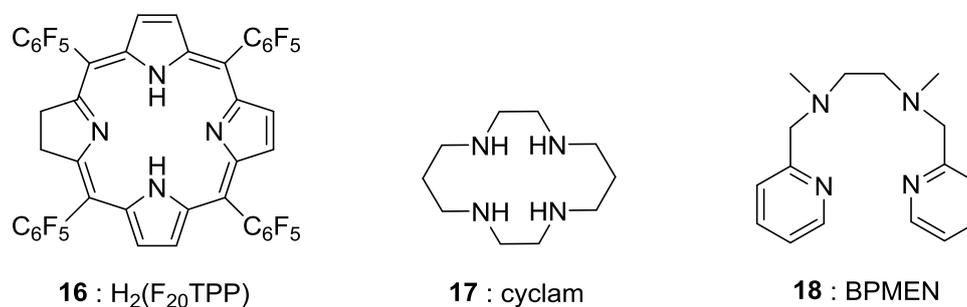


Figure 2 : exemples de ligands pour catalyseurs biomimétiques

<sup>11</sup>Lyakin, O. Y.; Shteinman, A. A., *Kinet Catal* **2012**, 53 (6), 694-713.

Pour l'halogénéation d'alcane, Groves J.T. *et al.*<sup>12</sup> ont développé en 2010 un catalyseur à base d'une porphyrine complexée avec du manganèse. Ce catalyseur, en présence d'un catalyseur de transfert de phase, permet la bromation ou la chloration régiosélective d'alcane cycliques variés selon un mécanisme radicalaire (Schéma 6).

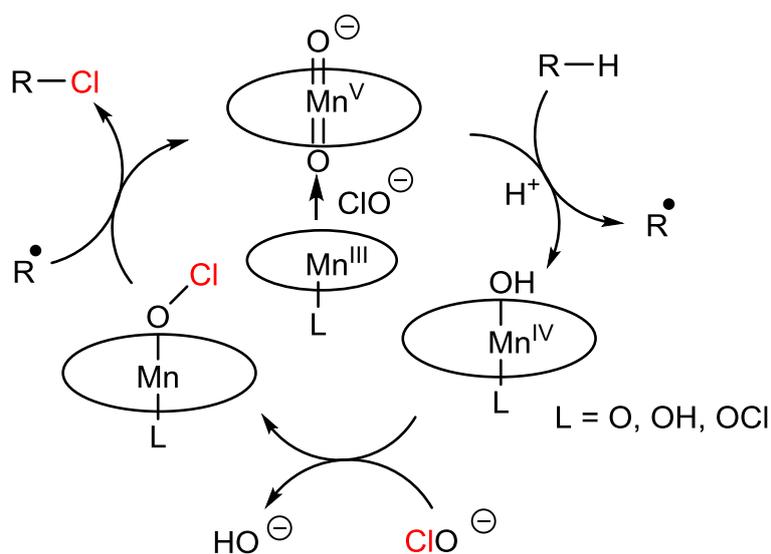
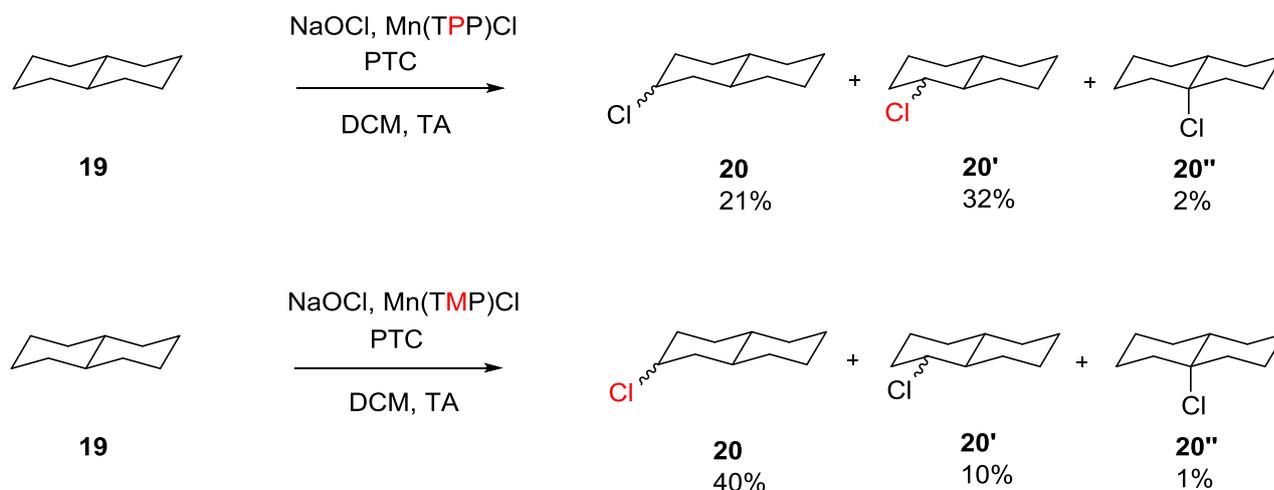


Schéma 6 : mécanisme radicalaire proposé pour la chloration biomimétique

La chloration de la *trans*-décane (**19**) avec le catalyseur Mn(TPP)Cl conduit à un mélange de 3-chloro-*trans*-décane **20**, **20'** et **20''** avec une faible régiosélectivité pour la 1-chlorodécane (**20'**). L'aspect intéressant est le changement de régiosélectivité observé pour la chloration de la *trans*-décane (**19**) avec le changement de structure du catalyseur. En effet, l'utilisation d'un catalyseur plus encombré induit la formation préférentielle de 2-chlorodécane (**20**) (Schéma 7).

<sup>12</sup>Liu, W.; Groves, J. T., *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132 (37), 12847-12849.

Schéma 7 : chloration régiosélective de la *trans*-décالية

## I.3- Insertion d'un atome d'azote dans une liaison C-H non activée

Le développement de catalyseurs permettant la formation de liaison C-N à partir d'une liaison Csp<sup>3</sup>-H non activée est très récent. Zhang *et al* ont par exemple publié en 2012 une étude sur de nombreux catalyseurs biomimétiques pour la formation de cette liaison<sup>13</sup>. L'amination d'alcane cycliques, comme le cycloheptane (**21**), est possible avec des rendements corrects mais cette réaction semble vraiment limitée à quelques substrats de structures très simples (Schéma 8).

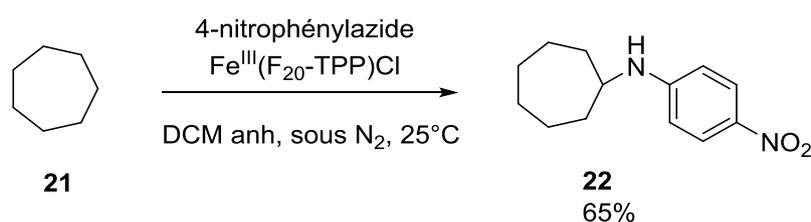


Schéma 8 : amination du cycloheptane

<sup>13</sup>Zhang, L.; Deng, L., *Chin. Sci. Bull.* **2012**, 57 (19), 2352-2360.

Hennessy *et al.*<sup>14</sup> ont récemment décrit deux nouveaux catalyseurs biomimétiques pour la création de la liaison C-N à partir d'une liaison Csp<sup>3</sup>-H non activée (Figure 3).

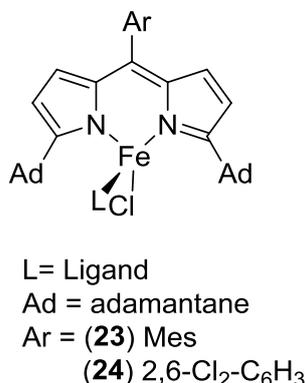


Figure 3 : structure des catalyseurs **23** et **24**

Ils permettent l'obtention d'amines cycliques variées, blocs de base pour la synthèse de produits d'intérêt, comme des azétidines, pyrrolidines et piperidines. Par exemple, la pyrrolidine **26** est obtenu à partir du 1-azido-4-méthylpentane (**25**) avec un rendement de 60% (Schéma 9).

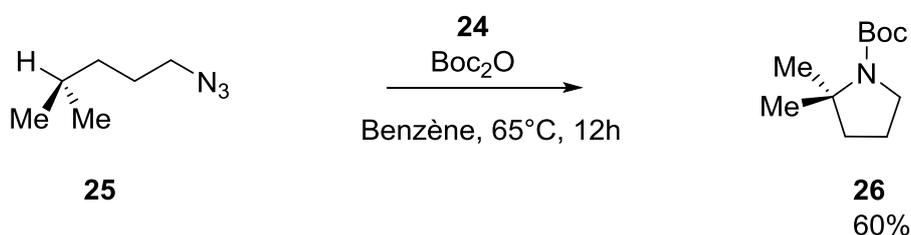


Schéma 9 : synthèse de la pyrrolidine **26**

#### I.4- Insertion d'un atome d'oxygène dans une liaison C-H non activée

L'insertion d'un atome d'oxygène dans une liaison C-H non activée s'est développée au début des années 1980 avec l'apparition des premiers réactifs permettant cette réaction. Dans la partie suivante, seront présentés les différents moyens d'introduire une fonction alcool ou une fonction cétone, allant des diméthyldioxiranes, premier réactif permettant l'introduction d'un atome d'oxygène sur un carbone non activé, aux catalyseurs biomimétiques.

<sup>14</sup>Hennessy, E. T.; Betley, T. A., *Science* **2013**, *340* (6132), 591-595.

## I.4.1- Diméthyl-dioxiranes et méthyl(trifluorométhyl)dioxiranes

En 1985, Murray *et al.*<sup>15</sup> ont décrit une méthode pour l'insertion d'un atome d'oxygène sur une liaison Csp<sup>3</sup>-H non activée par le diméthyl-dioxirane (**27**) (DDO). Ce composé permet l'oxydation de substrats variés de manière régiosélective sur les carbones tertiaires et secondaires comme le diméthylcyclohexane (**28**) pour conduire au dérivé **29** hydroxylé de manière régiosélective et avec rétention de configuration (Schéma 10).

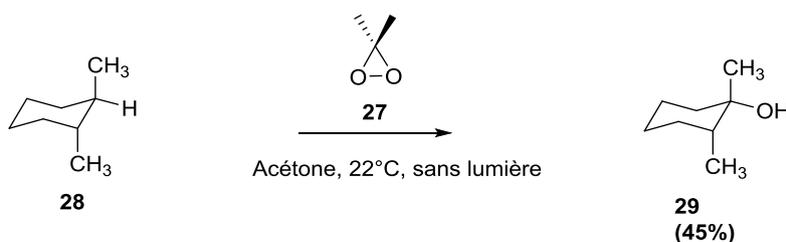


Schéma 10 : oxydation d'alcanes avec le DDO

Curci *et al.*<sup>16</sup> ont publié en 1989 des travaux sur un dioxirane modifié : le méthyl(trifluorométhyl)dioxirane (**30**) (TFDO). Ce composé, beaucoup plus réactif, permet de manière plus rapide et plus efficace l'oxofonctionnalisation de carbones saturés comme dans le *n*-heptane (**31**), le 2,3-diméthyl-*n*-butane (**3**) et le norbornane (**32**) pour donner les dérivés oxydés correspondants **33**, **33'**, **33''**, **34**, **35**, **35'** et **35''** avec des rendements supérieurs à 90%. (Schéma 11). La réaction peut être régiosélective comme pour le composé **31** et stéréosélective pour le composé **32**. Cela s'explique par les contraintes dues à la structure bicyclique du substrat. Les rendements obtenus sont supérieurs à 90%.

<sup>15</sup>Murray, R. W.; Jeyaraman, R.; Mohan, L., *Journal of the American Chemical Society* **1986**, 108 (9), 2470-2472.

<sup>16</sup>Mello, R.; Fiorentino, M.; Fusco, C.; Curci, R., *Journal of the American Chemical Society* **1989**, 111 (17), 6749-6757.

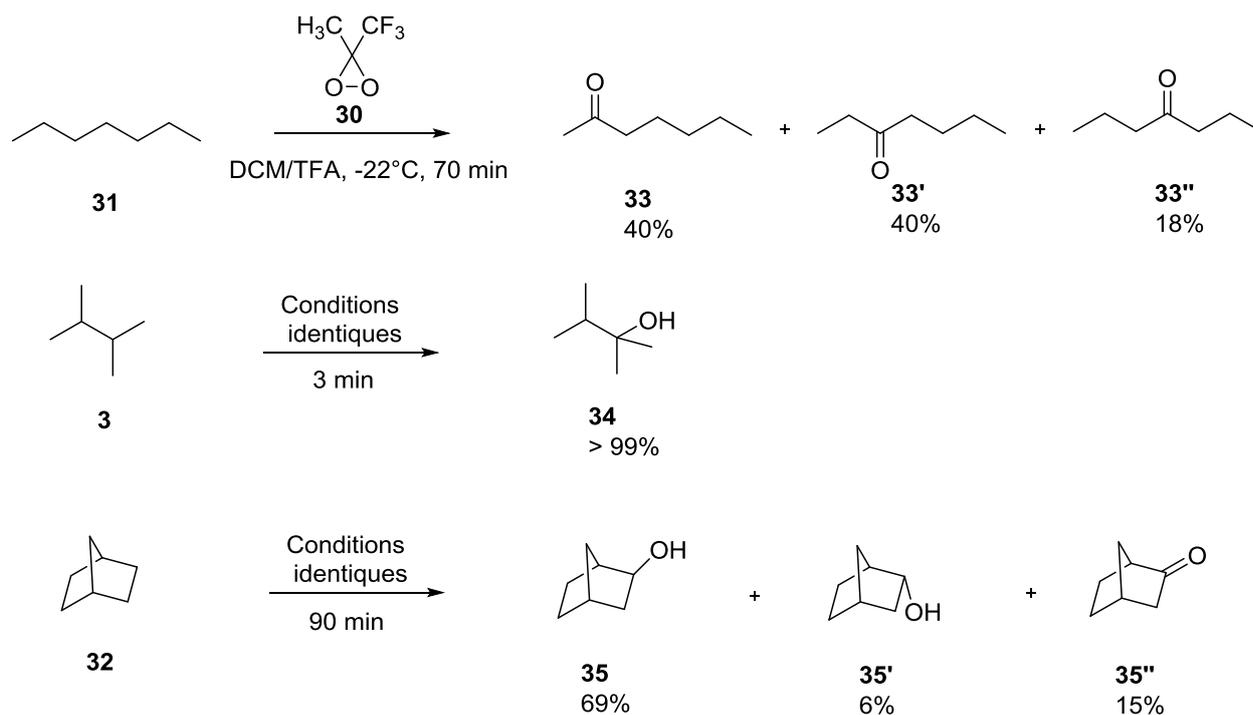


Schéma 11 : oxydation d'alcanes avec le TDFO

Ces réactifs ont notamment permis d'oxyder des molécules beaucoup plus complexes comme par exemple le dérivé de la vitamine D<sub>2</sub> **36**, qui conduit au composé hydroxylé **37** avec une très bonne régiosélectivité et un rendement de 61%<sup>17</sup> (Schéma 12).

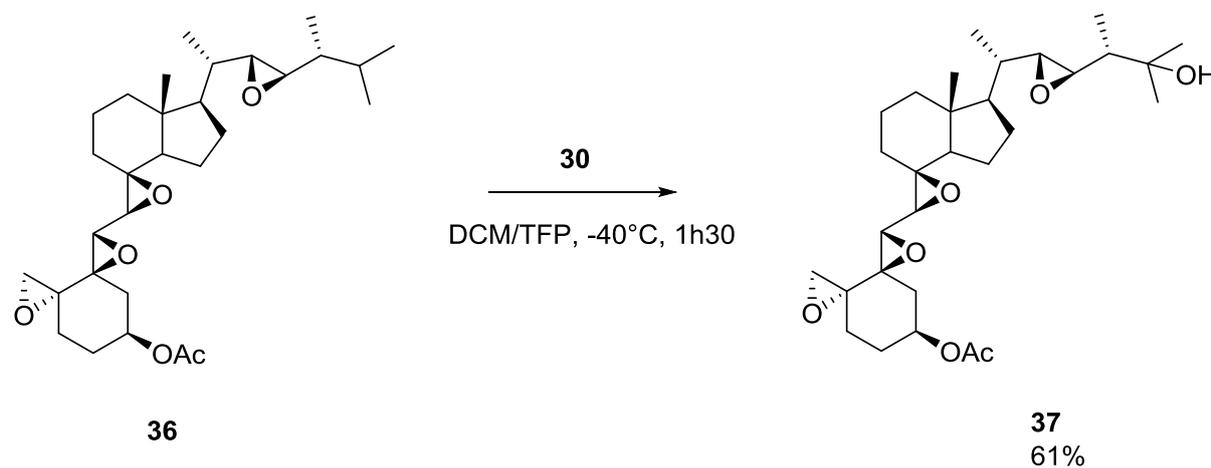


Schéma 12 : hydroxylation d'un carbone tertiaire d'un dérivé de la vitamine D2

<sup>17</sup>Curci, R.; Detomaso, A.; Lattanzio, M. E.; Carpenter, G. B., *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (45), 11089-11092.

Sur des dérivés nucléophiles  $\eta$ - et  $\pi$ - donneurs à deux électrons (sulfure, alcène..), il est bien établi que l'oxydation par le DDO est électrophile de type  $S_N2$ . Dans le cas d'une liaison Csp<sup>3</sup>-H non activée, il est clair que le mécanisme ne peut être celui-là. Deux mécanismes ont été proposés. Le premier est une « insertion concertée d'oxénoïde » (Schéma 13, voie a), et le second est de type radicalaire (schéma 13, voie -b)<sup>18</sup>.

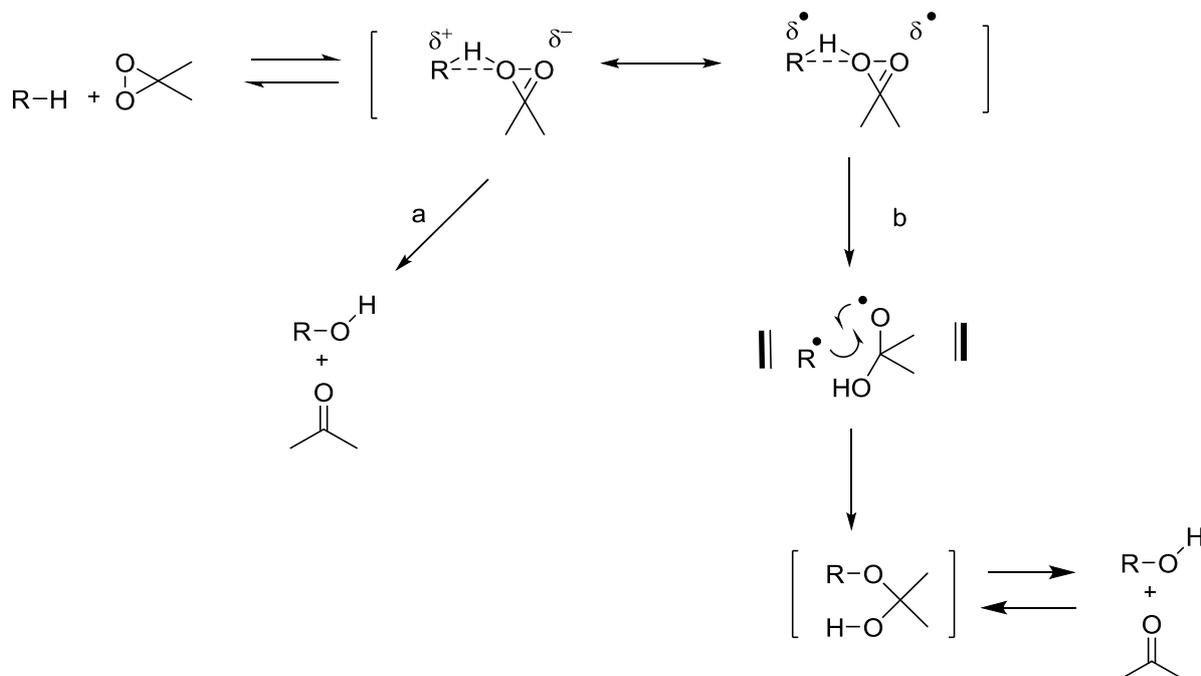


Schéma 13 : mécanismes proposés pour l'oxydation avec le TDO et TDFO

#### I.4.2- Perfluorodialkyloxaziridine

Resnati *et al.*<sup>19</sup> ont publié en 1993 une réaction d'oxydation de la liaison Csp<sup>3</sup>-H à partir des oxaziridines **38** et **39** (Figure 4). Ces composés présentent l'avantage d'être plus stables que les dioxiranes, tout en donnant les mêmes régio- et la stéréo-sélectivité. Comme pour les dioxiranes, deux mécanismes sont proposés.



Figure 4 : structure des perfluorodialkyloxaziridines **38** et **39**

<sup>18</sup>Curci, R.; D'Accolti, L.; Fusco, C., *Acc Chem Res* **2006**, *39* (1), 1-9.

<sup>19</sup>DesMarteau, D. D.; Donadelli, A.; Montanari, V.; Petrov, V. A.; Resnati, G., *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115* (11), 4897-4898.

## I.4.3- Catalyseurs métalliques

En 2010, Du Bois *et al*<sup>20</sup> ont publié un protocole générant *in situ* du tétraoxyde de ruthénium à partir de trichlorure de ruthénium en quantité catalytique et qui permet d'oxyder sélectivement les carbones tertiaires (Schéma 14).

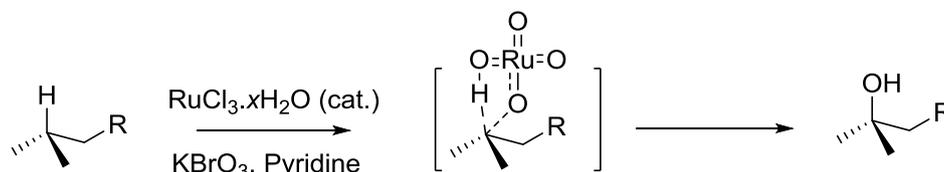


Schéma 14 : intermédiaire formé lors de l'hydroxylation via le tétraoxyde de ruthénium

Contrairement aux travaux précédemment décrits, les substrats testés sont de structures variées et fonctionnalisés notamment par des fonctions alcools, composé **40**, des carbamates, des esters, composé **41** et des sulfones, composé **42** et conduisent aux dérivés hydroxylés correspondants **43**, **44** et **45** (Schéma 15). Les rendements sont compris entre 26 et 73%. Il n'y a pas cependant pas d'exemple, dans cette publication, d'insertion d'atome d'oxygène sur un atome de carbone asymétrique.

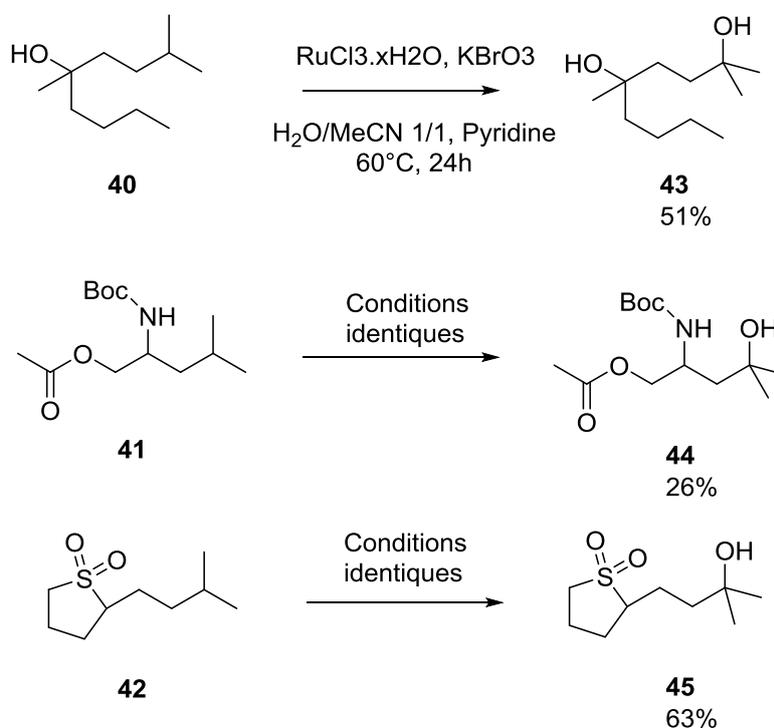


Schéma 15 : hydroxylation via le catalyseur au ruthénium de molécules fonctionnalisées

<sup>20</sup>McNeill, E.; Bois, J. D., *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132 (29), 10202-10204.

Fuchs *et al.*<sup>21</sup> ont décrit en 2002 une oxydation de carbones tertiaires non activés avec un catalyseur au chrome (VI). Cette réaction est stéréosélective avec rétention de configuration pour des substrats de structure contrainte, comme par exemple le 1,2-diméthylcyclohexane *trans* (**46**) conduisant au dérivé hydroxylé **47** (Schéma 16). La gamme de substrats testés est par contre relativement limitée avec essentiellement des dérivés du cyclohexane et peu fonctionnalisés. Les rendements sont compris entre 41 et 95%.

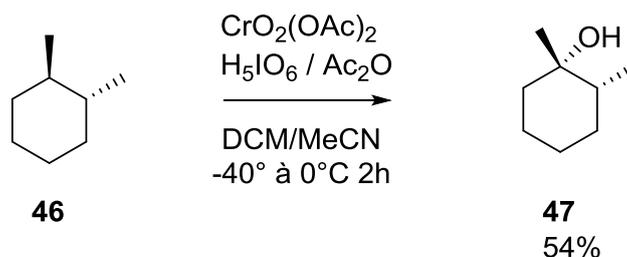


Schéma 16 : hydroxylation stéréosélective du 1,2-diméthylcyclohexane

Chen *et al.*<sup>22</sup> ont publié en 2012 une méthode permettant l'introduction d'une fonction éther sur un carbone non activé Csp<sup>3</sup>, en utilisant un catalyseur au palladium. Cette réaction nécessite une activation préliminaire par la mise en place d'un groupement directeur labile **48** en β du carbone à oxyder et nécessite ensuite une étape de déprotection pour retirer ce groupement (Schéma 17).

<sup>21</sup>Lee, S.; Fuchs, P. L., *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (47), 13978-13979.

<sup>22</sup>Zhang, S.-Y.; He, G.; Zhao, Y.; Wright, K.; Nack, W. A.; Chen, G., *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (17), 7313-7316.

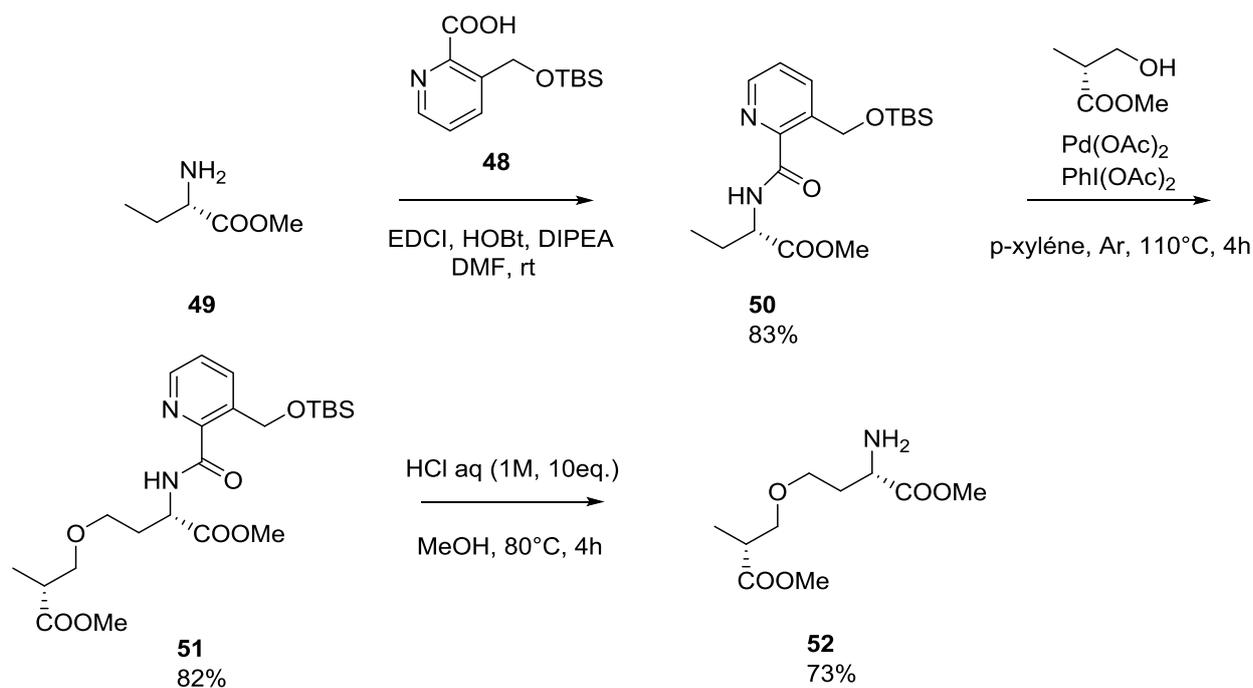


Schéma 17 : exemple de formation de liaison éther avec groupement participatif

La gamme de substrats testés est très restreinte et la nécessité d'avoir une amine sur le carbone  $\gamma$  pour l'introduction du groupement directeur rend difficile l'exploitation de cette méthode. Cependant, la diversité structurale des éthers ainsi formés est intéressante allant du méthoxyéther **53**, au benzyloxyéther **55** (Figure 5).

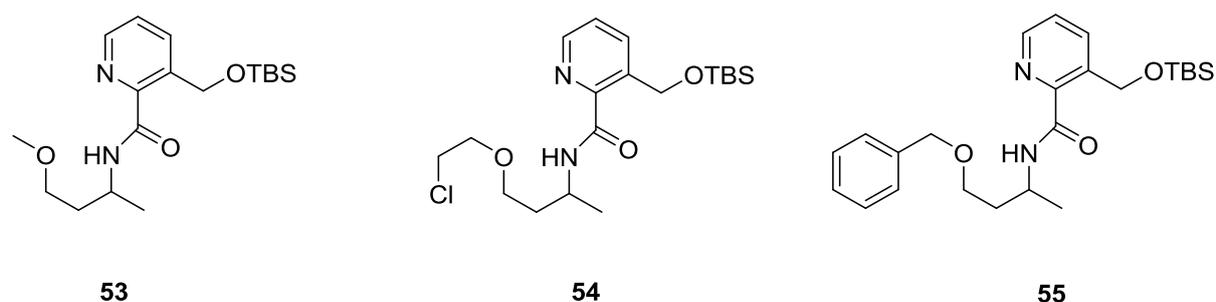


Figure 5 : nature des groupements éthers pouvant être introduits

Le même principe a été utilisé en 2012, Dong *et al.*<sup>23</sup> pour la préparation de 1,2-diols protégés, avec une sélectivité pour les carbones primaires (Schéma 18).

<sup>23</sup>Ren, Z.; Mo, F.; Dong, G., *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134 (41), 16991-16994.

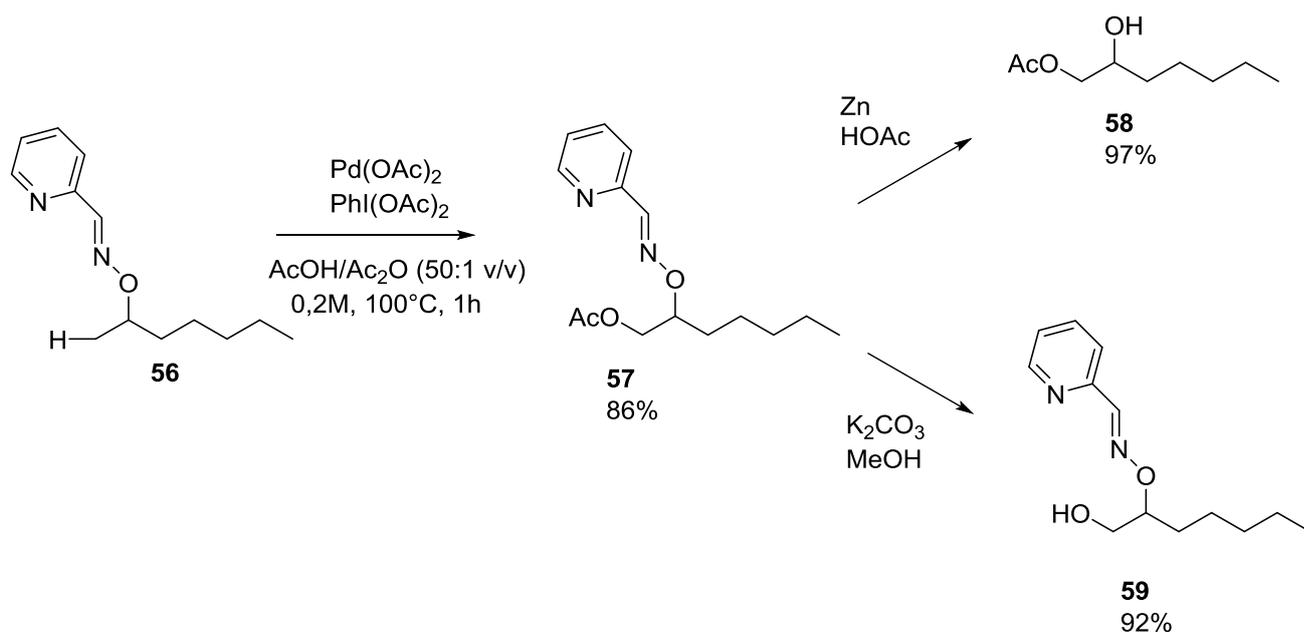


Schéma 18 : formation de diols (1,2) protégés orthogonalement

La gamme de substrats testés est assez variée allant du dérivé protégé de l'éthanol **60** au dérivé du 1-méthylcyclohexanol **61** conduisant aux diols protégés **62** et **63**. Cette méthode est très intéressante dans la mesure où les diols (1,2) protégés de manière orthogonale sont obtenus avec des rendements compris entre 44 et 86% (Schéma 19).

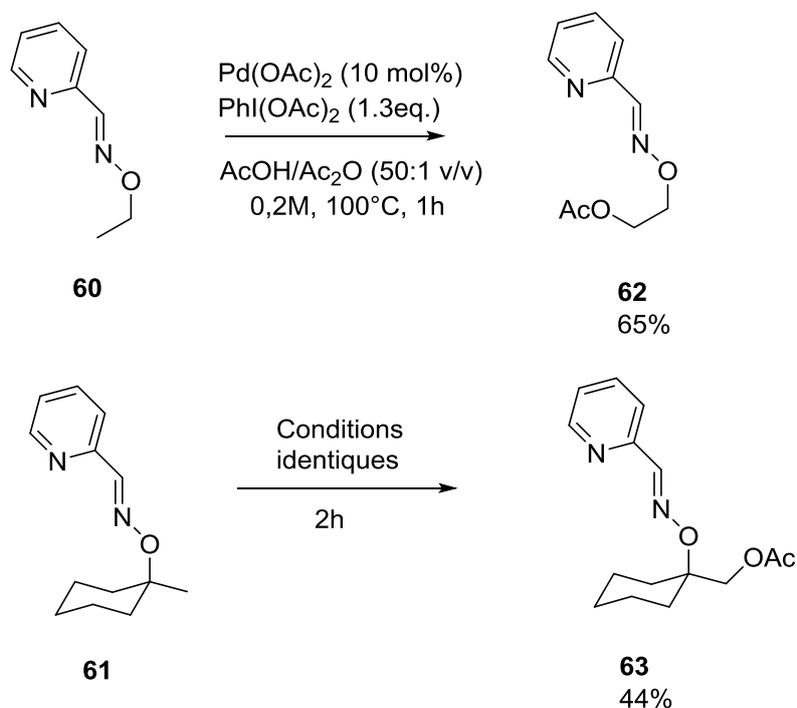
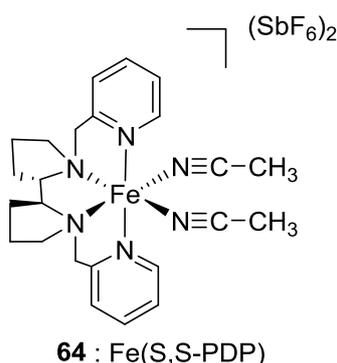


Schéma 19 : variété de substrats et produits obtenus

## I.4.4- Catalyseurs biomimétiques

A l'image des catalyseurs biomimétiques utilisés pour les réactions d'halogénations, des catalyseurs ont été synthétisés pour l'introduction d'un atome d'oxygène sur une liaison Csp<sup>3</sup>-H non activée. En 2007, White *et al.*<sup>24</sup> ont publié l'utilisation d'un catalyseur **64** (Figure 6) à base de fer non hémérique. Il permet l'oxydation d'une liaison C-H non activée de carbones tertiaires et secondaires de manière régiosélective et stéréosélective pour certains substrats.

Figure 6 : structure du catalyseur **64**

Dans cet exemple, il n'est pas besoin de groupe directeur, contrairement à ce qui a été vu dans l'exemple précédent. La sélectivité est prévisible en tenant compte de l'environnement stérique et électronique de la liaison Csp<sup>3</sup>-H. Les substrats sont variés, fonctionnalisés ou non. On trouve par exemple l'hydroxylation d'un ester **65** conduisant aux dérivés **67** et **67'** avec comme produit majoritaire la lactone issue d'une oxydation du carbone tertiaire. L'hydroxylation d'un ester **66** structurellement proche de l'ester **65** conduit aux produits **68** et **68'** avec pour produit majoritaire le composé **68'** issu d'une oxydation du carbone secondaire (Schéma 20). Cette inversion de régiosélectivité peut s'expliquer pour le composé **65** par une réactivité plus forte des carbones tertiaires et pour le composé **66** par un encombrement stérique trop important pour une hydroxylation d'un carbone tertiaire.

<sup>24</sup>Chen, M. S.; White, M. C., *Science* **2007**, 318 (5851), 783-787.

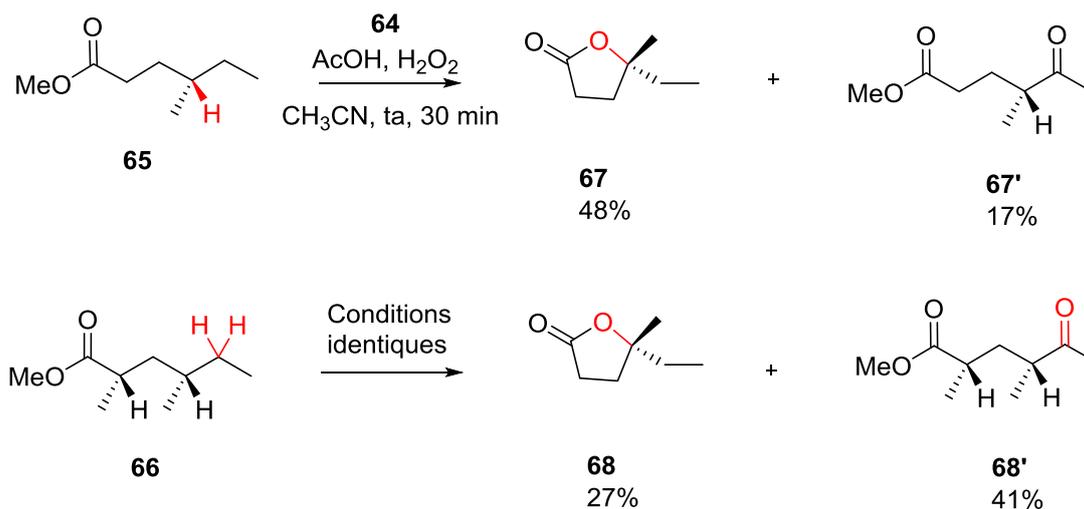


Schéma 20 : exemple de régiosélectivités liées à l'encombrement stérique ou aux effets électroniques

Les auteurs illustrent l'intérêt de leur catalyseur avec la synthèse de la (+)-10 $\beta$ -hydroxyartimisinine (**70**) à partir de la (+)-artimisinine (**69**) (Schéma 21). Le composé **70** est obtenu avec un meilleur rendement et un temps de réaction plus court que par bioconversion selon un procédé décrit en 2002 par Guo *et al.*<sup>25</sup>.

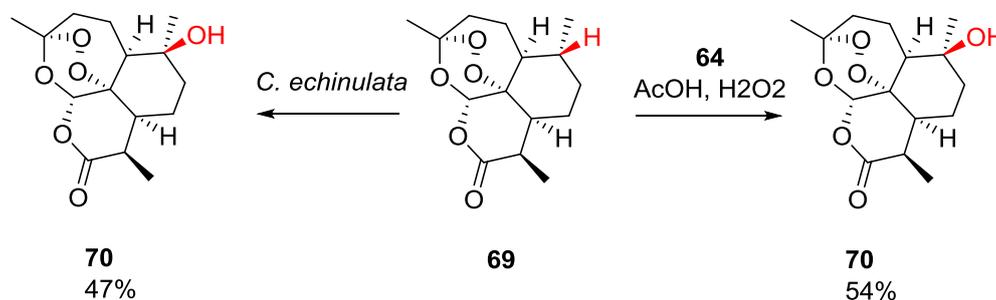


Schéma 21 : comparaison catalyseur/biocatalyseur (*Cunninghamella echinulata*)

En 2011, White *et al.*<sup>26</sup> ont publié une nouvelle étude sur différentes applications du catalyseur **64**. A l'image de certaines enzymes comme les dioxygénases  $\alpha$ -céto-glutarate et fer dépendantes, ce catalyseur semble, en fonction de la nature du substrat, capable d'hydroxyler mais également de créer une liaison alcène. Par exemple, lors de la formation de la lactone **72** à partir de l'acide carboxylique **71** un excès énantiomérique de 13% a été observé (Schéma 22).

<sup>25</sup>Zhan, J.; Guo, H.; Dai, J.; Zhang, Y.; Guo, D., *Tetrahedron Letters* **2002**, 43 (25), 4519-4521.

<sup>26</sup>Bigi, M. A.; Reed, S. A.; White, M. C., *Nat Chem* **2011**, 3 (3), 216-222.

Le même excès énantiomérique est observé lors de la formation de cette même lactone à partir de l'alcène **73** (schéma 22). Cela semble donc confirmer que qu'il s'agit d'un mécanisme identique et donc que ce catalyseur possède bien une activité désaturase en plus de l'activité hydroxylase déjà observée.

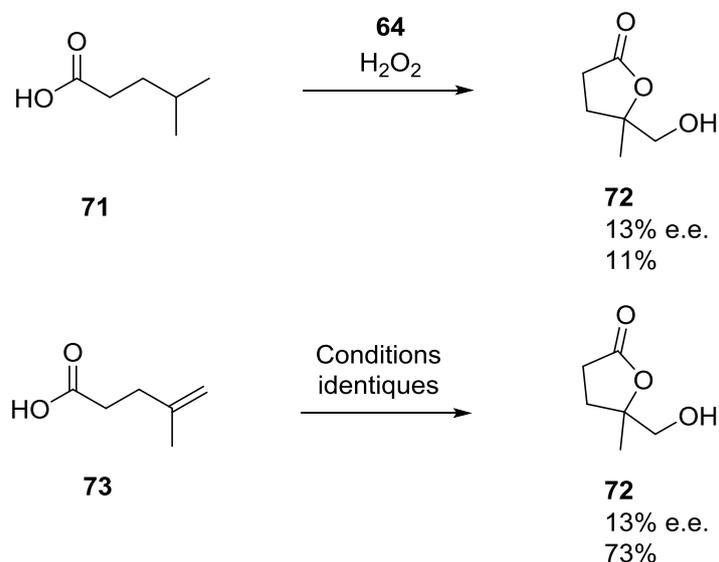


Schéma 22 : formation de lactone

De nouveaux catalyseurs, très proches structuralement du catalyseur publié par White *et al.* en 2007, mais avec du manganèse au lieu du fer, ont été obtenus par Briiliakov *et al.*<sup>27</sup> en 2012. Les catalyseurs **74**, **75** et **76** permettent l'oxydation des carbones tertiaires de manière régiosélective (Figure 7).

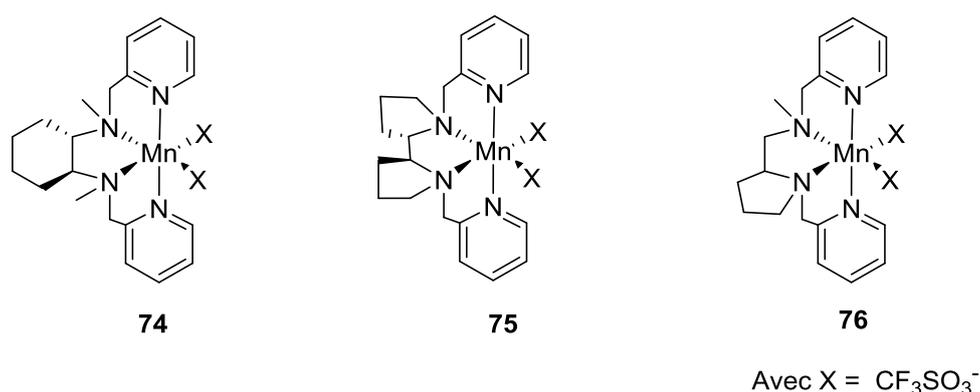


Figure 7 : structure des catalyseurs biomimétiques au manganèse

A l'image du catalyseur **64**, des différences de régiosélectivité liées aux effets électroniques et à l'encombrement stérique sont observées en fonction de la nature du substrat.

<sup>27</sup>Ottenbacher, R. V.; Samsonenko, D. G.; Talsi, E. P.; Briiliakov, K. P., *Org. Lett.* **2012**, *14* (17), 4310-4313.

Par exemple, l'oxydation du 1-bromo-3,7-diméthyl-octane (**77**) en deux dérivés hydroxylés **79** et **79'** dans un ratio (97:1) avec une forte régiosélectivité du carbone tertiaire C7 est expliquée par l'effet désactivant du brome sur le C3. L'oxydation d'un dérivé du cyclohexane **78** donne deux dérivés **80** et **80'** hydroxylés préférentiellement sur un carbone primaire dans un ratio (13:1) (Schéma 23). Cette régiosélectivité s'explique par l'encombrement stérique lié au groupement acétoxy en C1.

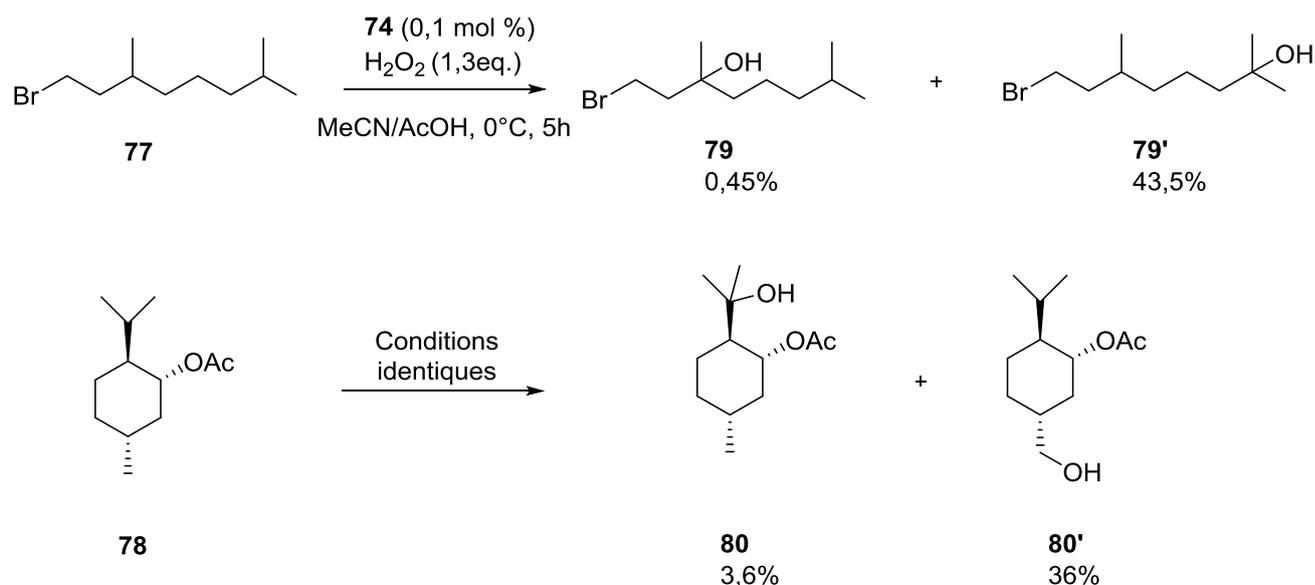


Schéma 23 : exemple d'hydroxylations régiosélectives

#### I.4.5- Insertion de silicium comme oxygène masqué

L'utilisation du silicium comme oxygène masqué peut être une alternative à l'oxydation directe pour la synthèse de produit hydroxylés. Hartwig *et al.*<sup>28</sup> ont, par exemple, publié en 2012 un nouveau catalyseur à l'iridium permettant la synthèse de 1,3-diols. Dans un premier temps, une silylation de l'alcool est effectuée conduisant à la formation d'un silyléther, ensuite le catalyseur permet la formation d'un oxasilolane avec la création d'une liaison C-Si qui, en présence d'eau oxygénée et d'une base, permet la formation du 1,3-diol (Schéma 24). Il ne s'agit pas, à proprement parler, d'une oxydation de liaison Csp<sup>3</sup>-H non activée mais cette méthode permet tout de même l'hydroxylation d'un carbone non activé en  $\gamma$  d'une fonction alcool.

<sup>28</sup>Simmons, E. M.; Hartwig, J. F., *Nature* **2012**, 483 (7387), 70-73.

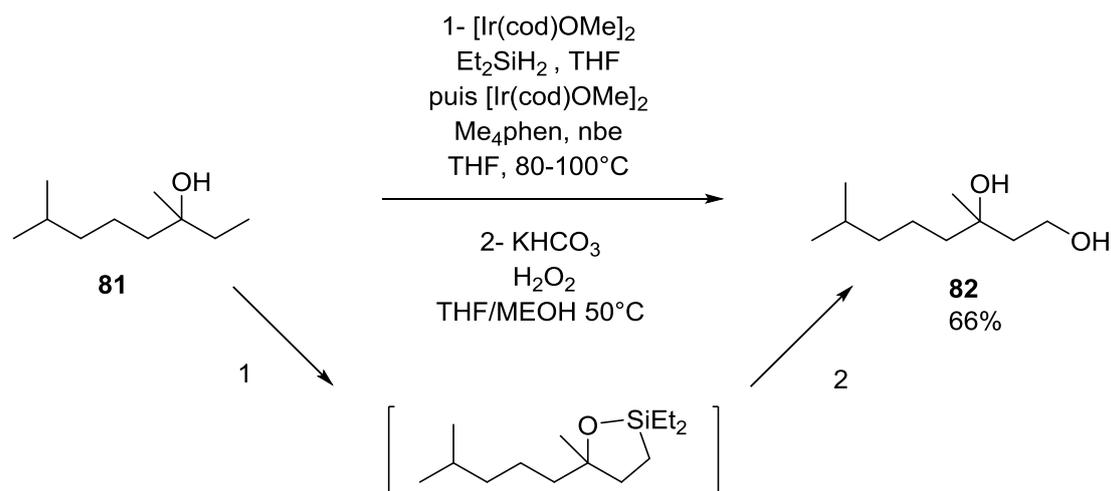
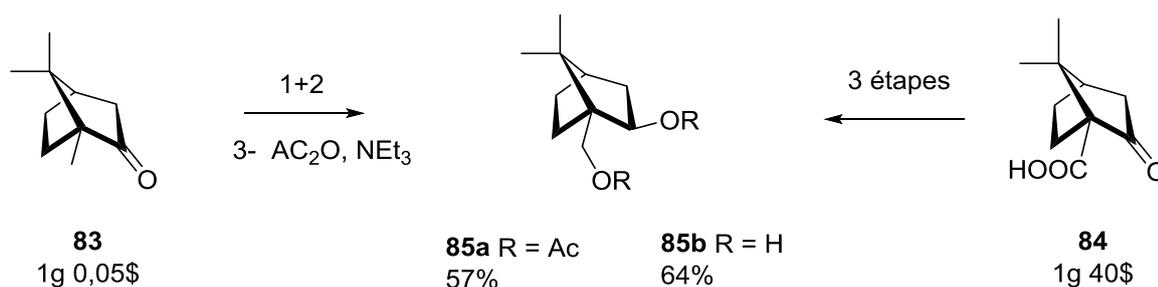


Schéma 24 : formation de l'intermédiaire oxasilolane pour la synthèse de diol (1,3)

Différentes voies de synthèse de produits d'intérêt ont été comparées, comme par exemple le *exo*-2,10-camphanediol (**85**) (Schéma 25). Cet exemple montre les applications potentielles et l'intérêt de ce catalyseur pour la synthèse de molécules complexes.

Schéma 25 : synthèse du *exo*-2,10-camphanediol

### I.5- Oxydation d'une liaison C-H non activée par voie biocatalytique

Parmi les classes d'enzymes catalysant l'oxydation d'une liaison C-H non activée, les monooxygénases sont les plus connues. Elles permettent le transfert d'un atome d'oxygène après une activation préalable de l'oxygène moléculaire par l'enzyme. Il existe plusieurs types de monooxygénases se différenciant par la manière d'activer l'oxygène moléculaire. Les quatre premières, très peu utilisées à l'heure actuelle dans le domaine de la biocatalyse, seront présentées succinctement. Les cytochromes P450 seront présentés plus en détails.

### I.5.1- Monooxygénase cofacteur indépendante

La première monooxygénase cofacteur indépendante a été découverte en 1993 par Shen *et al.*<sup>29</sup> Elle est d'origine bactérienne et ne nécessite pas la présence de cofacteurs. Cette enzyme a besoin uniquement d'oxygène moléculaire et utilise le substrat comme agent réducteur.

Deux mécanismes ont été proposés par Fetzner<sup>30</sup> en 2002 pour l'oxydation de la tétracénomycine F1 (**86**) par la monooxygénase tcmH (Schéma 26). Le premier mécanisme proposé est radicalaire avec l'activation du substrat par l'enzyme pour former un intermédiaire phénol radicalaire qui va permettre l'activation de l'oxygène. Le second est ionique avec une déprotonation du substrat par l'enzyme suivi d'un transfert d'un électron du substrat vers l'oxygène moléculaire et la formation du radical hydroperoxyde.

Ces enzymes, intervenant le plus souvent dans des voies de biosynthèses d'antibiotiques, pourraient à première vue paraître très intéressantes. Cependant, l'absence de cofacteurs nécessite l'activation de l'oxygène moléculaire par le substrat, ce qui implique une nature de substrat bien spécifique et donc restreinte. C'est certainement pour cela qu'à l'heure actuelle, l'utilisation de ce type de monooxygénases dans le domaine de la biocatalyse n'a pas été développée.

---

<sup>29</sup>Shen, B.; Hutchinson, C. R., *Biochemistry* **1993**, 32 (26), 6656-63.

<sup>30</sup>Fetzner, S., *Applied microbiology and biotechnology* **2002**, 60 (3), 243-57.

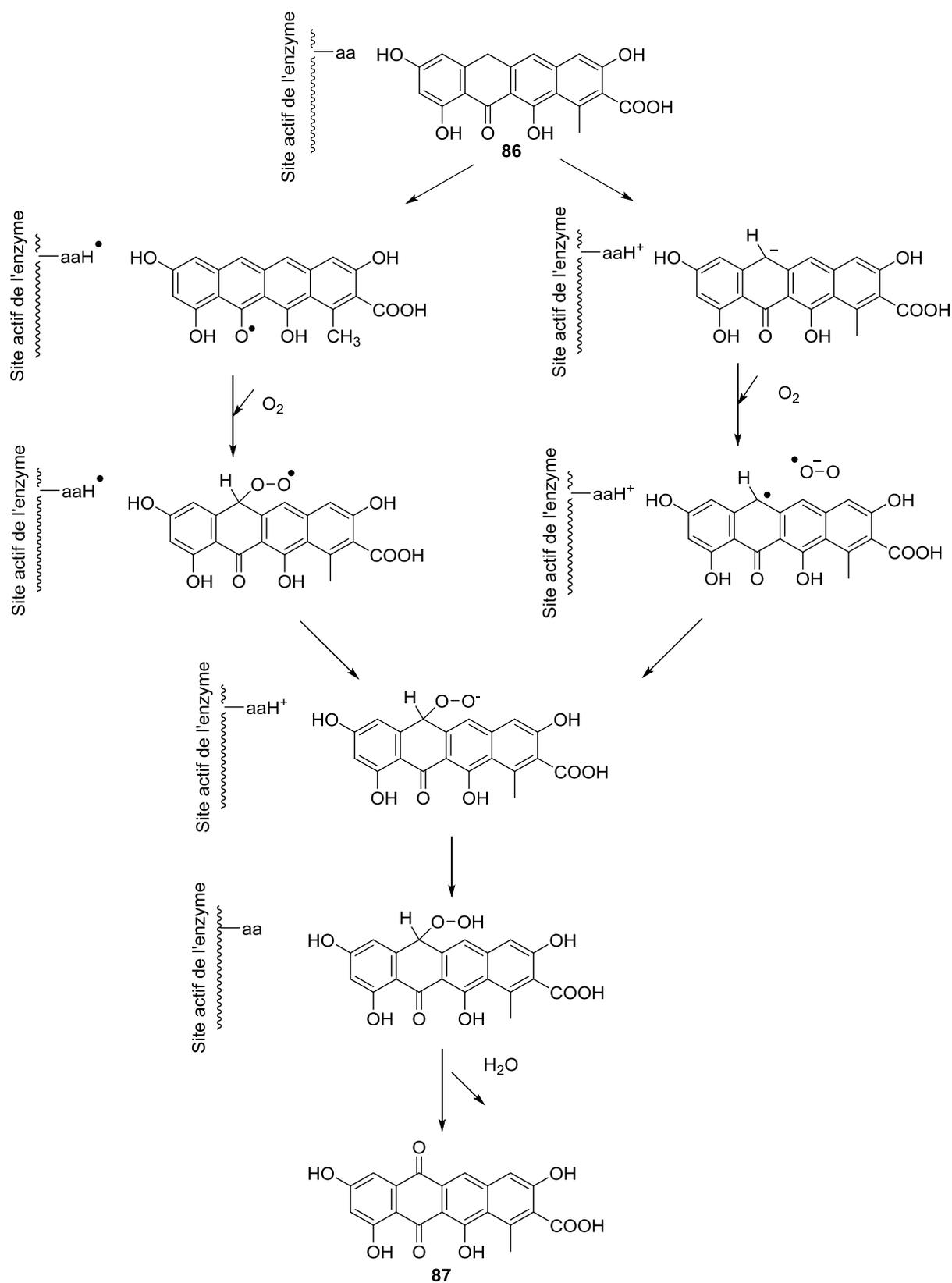


Schéma 26 : mécanisme proposé pour les monooxygénases sans cofacteur

## I.5.2- Monoxygénase fer non hémunique dépendante

Les monoxygénases fer non hémunique dépendantes utilisent deux atomes de fer pour activer l'oxygène moléculaire et qui nécessitent en présence de NADH, catalysent principalement deux types de réaction : l'époxydation et l'hydroxylation, et nécessitent la présence de NADH pour la régénération du fer au bon degré d'oxydation. L'enzyme la plus étudiée de cette famille est la « soluble methane monoxygénase » (sMMO)<sup>31</sup> permettant l'oxydation du méthane (**88**) en méthanol (**89**). Lippard et *al.*<sup>32</sup> en 2001 ont proposé plusieurs mécanismes possibles pour cette enzyme avec par exemple différents complexes fer-oxo formés pour l'activation de l'oxygène moléculaire, des complexes péroxo et des atomes de fer avec des degrés d'oxydations compris entre III et V (Schéma 27). Cette famille d'enzymes n'a pas été très développée en biocatalyse dans la mesure où les activités sont beaucoup plus faibles que pour les P450.

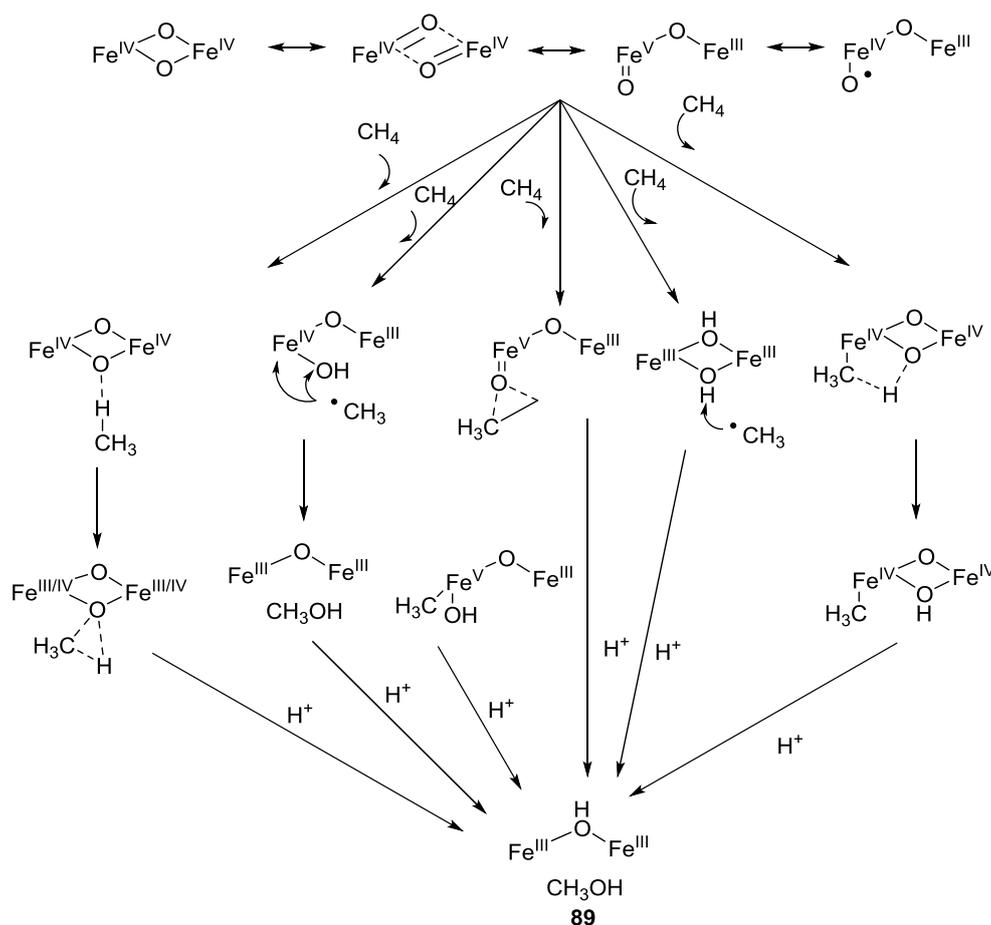


Schéma 27 : mécanisme proposé pour les monoxygénases fer non hémunique dépendantes

<sup>31</sup>Green, J.; Dalton, H., *J Biol Chem* **1989**, 264 (30), 17698-703.

<sup>32</sup>Merkx, M.; Kopp, D. A.; Sazinsky, M. H.; Blazyk, J. L.; Muller, J.; Lippard, S. J., *Angew Chem* **2001**, 40 (15), 2782-2807.

## I.5.3- Monooxygénase cuivre dépendante

Les monooxygénases cuivre dépendantes constituent une petite famille d'enzymes nécessitant deux atomes de cuivre pour catalyser des réactions d'hydroxylation de carbone. Elles sont le plus souvent retrouvées dans des organismes eucaryotes et catalysent l'hydroxylation en  $\beta$  d'amines telles que la dopamine<sup>33</sup>. En 2006, Klinman *et al.*<sup>34</sup> ont publié une étude sur le mécanisme de l'hydroxylation de la dopamine en norépinéphrine. L'oxygène moléculaire est activé par la formation d'un peroxyde de cuivre. La régénération des atomes de cuivre au degré d'oxydation I est réalisée par l'acide ascorbique (Figure 8). Cette famille d'enzymes contient également une méthane monooxygénase<sup>35</sup> (pMMO) catalysant l'oxydation du méthane en méthanol. Deux différences principales existent entre la pMMO (cuivre dépendante) et la sMMO (fer non hémique dépendante), la première étant la présence de deux atomes de cuivre à la place de deux atomes de fer et la seconde le caractère transmembranaire de pMMO. Aucune application dans le domaine de la biocatalyse n'a été développée car ce type d'enzyme ne se surexprime pas correctement dans *E.Coli* ou *S.cerevisiae*.

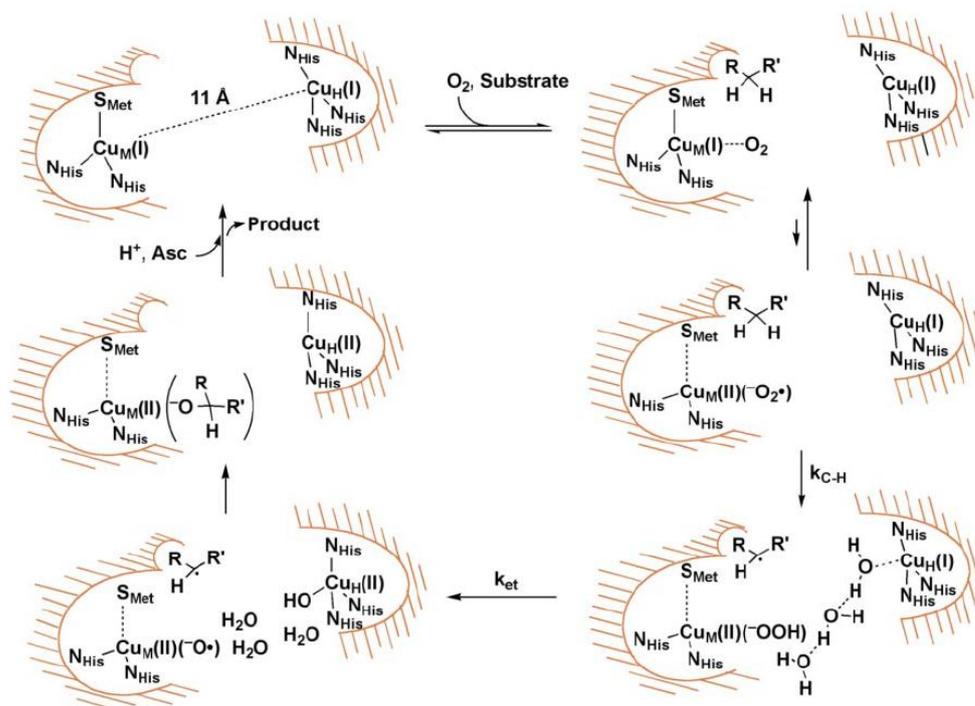


Figure 8 (tirée de ref[34]) : mécanisme proposé pour les monooxygénases cuivre dépendantes

<sup>33</sup>Torres Pazmino, D. E.; Winkler, M.; Glieder, A.; Fraaije, M. W., *J Biotechnol* **2010**, *146* (1-2), 9-24.

<sup>34</sup>Klinman, J. P., *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281* (6), 3013-3016.

<sup>35</sup>Balasubramanian, R.; Rosenzweig, A. C., *Acc Chem Res* **2007**, *40* (7), 573-80

## I.5.4- Flavoprotéine monooxygénase

Les flavoprotéines sont des protéines contenant un groupe prosthétique de type flavine tel la Flavine MonoNucléotide (FMN, **90**) ou bien la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD, **91**). Elles catalysent le transfert d'un oxygène sur un substrat dans diverses réactions d'oxydoréductions telles que l'époxydation de Bayer-Villiger, l'halogénéation, la sulfoxydation ou encore l'hydroxylation<sup>36</sup>. Comme un seul oxygène issu de l'oxygène moléculaire est transféré sur le substrat, en fin de réaction le groupe prosthétique est encore sous forme oxydée, ce qui nécessite une réductase avec des co-facteurs type NADH (**92**) ou NAD(P)H (**93**) pour revenir à la flavine réduite (Figure 9). La plupart des flavoprotéine monooxygénases catalysent les oxydations sur des positions activées, il existe cependant quelques exemples d'oxydations sur des positions non activées comme par exemple LadA, une monooxygénase qui hydroxyle les alcanes avec une chaîne carbonée de 15 à 36 carbones<sup>37,38</sup>.

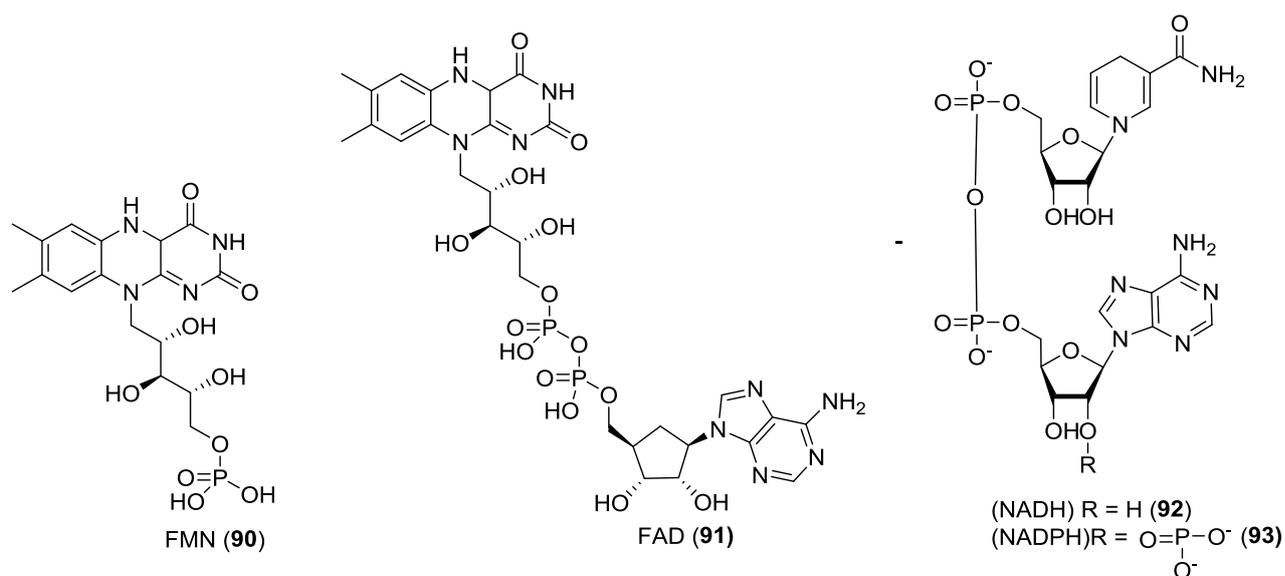


Figure 9 : structures des cofacteurs utilisés par les flavoprotéine monooxygénases

<sup>36</sup>van Berkel, W. J.; Kamerbeek, N. M.; Fraaije, M. W., *J Biotechnol* **2006**, *124* (4), 670-89.

<sup>37</sup>Feng, L.; Wang, W.; Cheng, J.; Ren, Y.; Zhao, G.; Gao, C.; Tang, Y.; Liu, X.; Han, W.; Peng, X.; Liu, R.; Wang, L., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104* (13), 5602-7.

<sup>38</sup>Li, L.; Liu, X.; Yang, W.; Xu, F.; Wang, W.; Feng, L.; Bartlam, M.; Wang, L.; Rao, Z., *J Mol Biol* **2008**, *376* (2), 453-65.

Devant le nombre croissant de flavoprotéine monooxygénases, une classification de cette famille a été proposée selon plusieurs critères (homologie de séquence, topologie 3D, type de réaction chimique catalysée...) (Tableau 1).

Sous-classe	Propriétés	Réactions	Sous-unités	Code PDB	Structure
A	Codé par un seul gène Cofacteur : FAD Coenzyme : NADH / NADPH	Hydroxylation Epoxydation	$\alpha$	1PHH	Fig 9 – a
B	Codé par un seul gène Cofacteur : FAD Coenzyme : NADPH	Baeyer-Villiger N-oxydation	$\alpha$	1W4X	Fig 9 – b
C	Codé par plusieurs gènes Coenzyme : FMN, NADH et/ou NADPH	Baeyer-Villiger S-oxydation	$\alpha + \beta$	1M41	Fig 9 - c
D	Codée par deux gènes Coenzyme : FAD, NADH et/ou NADPH	Hydroxylation	$\alpha + \beta$	/	/
E	Codée par deux gènes Coenzyme : FAD, NADH et/ou NADPH	Epoxydation	$\alpha + \beta$	/	/

F	Codée par deux gènes Coenzyme : FAD, NADH et/ou NADPH	Halogénéation	$\alpha + \beta$	2APG	Fig 9 – d
---	--	---------------	------------------	------	-----------

Tableau 1 : caractéristiques des différentes classes de flavoprotéine monooxygénases



Figure 10 : structure des différentes classes de flavoprotéine monooxygénases

Le mécanisme proposé est présenté dans le schéma 26. L'oxygène réagit avec la flavine **94** pour donner un hydropéroxyde qui peut exister sous deux formes, une anionique nucléophile, et une neutre électrophile. Après transfert d'un oxygène sur le substrat, l'hydroxyflavine résultante est réduite par une réductase associée (Schéma 28).

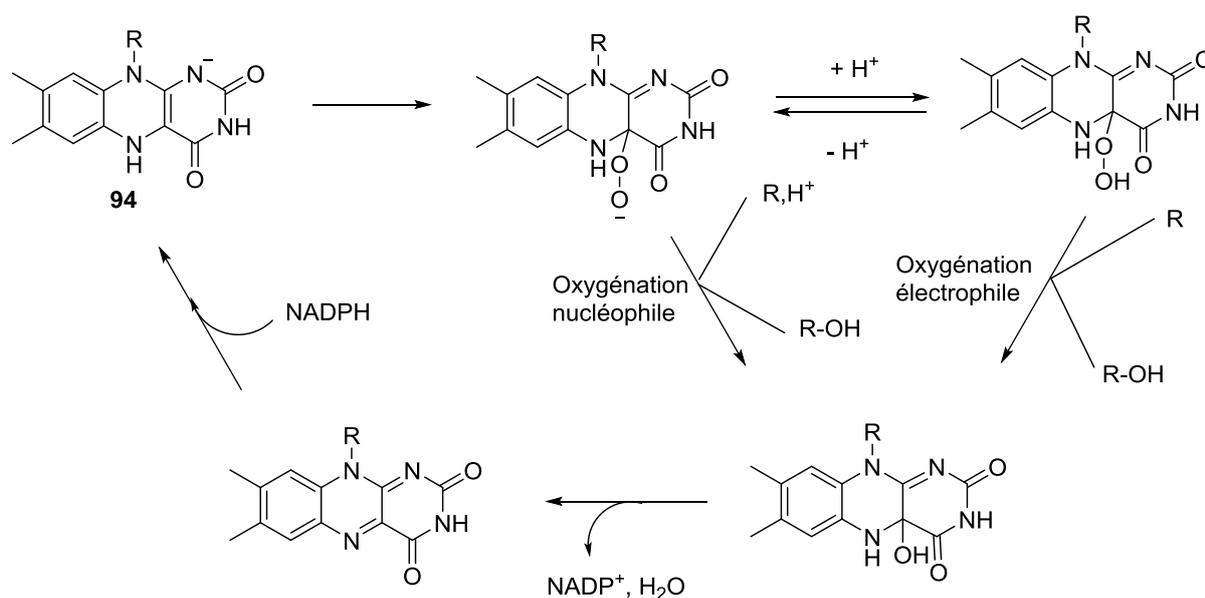
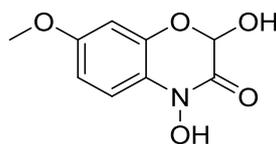


Schéma 28 : mécanisme proposé pour les monooxygénases cuivre dépendantes

### I.5.5- Cytochrome P450 monooxygénase

#### I.5.5.a- Présentation générale

Les P450 monooxygénases sont des enzymes qui nécessitent la présence de NAD(P)H et d'une réductase pour catalyser le transfert d'un atome d'oxygène sur un substrat à partir de l'oxygène moléculaire. Elles possèdent un noyau de fer héminique dont la réduction du Fe(III) en Fe(II) lors du cycle catalytique sera assuré par le transfert d'électrons du NAD(P)H au centre héminique de la P450 par la réductase. Leur nom provient de leur propriété d'absorption préférentielle de la lumière à 450 nm. On les trouve dans de nombreux organismes comme les mammifères, les champignons, les bactéries et les plantes avec des rôles biologiques très importants. Par exemple chez les mammifères, la famille des P450 joue un rôle dans le métabolisme des drogues et des xénobiotiques. En effet, elles permettent l'élimination de ces molécules via plusieurs oxydations successives pour faciliter l'excrétion par les reins<sup>39</sup>. Elles participent également, toujours chez les mammifères, à la synthèse de certaines hormones stéroïdiennes et à la conversion d'acides gras en molécules biologiquement actives<sup>40</sup>. Chez les plantes, elles jouent un rôle également dans la biosynthèse d'hormones, dans la résistance aux attaques diverses. Par exemple, des P450 interviennent dans la biosynthèse du DIMBOA (**95**)<sup>41</sup> (Figure 11) qui inhibe les protéases et les enzymes d'oxydations des champignons, bactéries et insectes.



**95**

Figure 11 : structure du DIMBOA

Entre 2006 et 2010, plus de 14000 gènes codants pour des P450 ont été découverts grâce au développement de nouvelles techniques de séquençage<sup>42</sup>. Certaines plantes peuvent posséder jusqu'à 500 P450<sup>43</sup>.

<sup>39</sup>Danielson, P. B., *Curr Drug Metab* **2002**, 3 (6), 561-97.

<sup>40</sup>Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Schlichting, I., *Chem Rev* **2005**, 105 (6), 2253-77.

<sup>41</sup>Persans, M. W.; Wang, J.; Schuler, M. A., *Plant Physiol* **2001**, 125(2) (12), 1126.

<sup>42</sup>Urlacher, V. B.; Girhard, M., *Trends Biotechnol* **2012**, 30 (1), 26-36.

<sup>43</sup>Nelson, D. R.; Schuler, M. A.; Paquette, S. M.; Werck-Reichhart, D.; Bak, S., *Plant Physiol* **2004**, 135 (2), 756-72.

Chez les mammifères, elles sont moins nombreuses mais la souris grise (*Mus musculus*) possède tout de même 102 gènes codant pour des P450<sup>44</sup>. Chez le poisson zèbre<sup>45</sup>, le séquençage du génome a permis la découverte de 94 gènes codant potentiellement pour des P450. C'est chez les bactéries qu'elles sont le moins présentes, par exemple on en compte 33 chez *Streptomyces avermilitis*<sup>46</sup> et aucune *Escherichia coli* (Tableau 2).

Règne	Organisme	Nombre de gènes	Références
Animal	<i>Mus musculus</i>	102	44
	<i>Homo Sapiens</i>	57	44
	<i>Danio reiro</i> (poisson zèbre)	94	45
Plante	<i>Oryza sativa</i>	455	43
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	272	43
Bactérie	<i>Streptomyces avermilitis</i>	33	46
	<i>Escherichia coli</i>	0	

Tableau 2 : répartition des gènes codant pour des P450 dans divers organismes

#### I.5.5.b- Classification des P450

Les P450 ont été réparties en trois classes en fonction des partenaires d'oxydo-réduction permettant le transfert d'électrons du NAD(P)H au centre héminique de la P450 et la réduction du Fe(III) en Fe(II)<sup>42</sup>.

<sup>42</sup>Urlacher, V. B.; Girhard, M., *Trends Biotechnol* **2012**, *30* (1), 26-36.

<sup>43</sup>Nelson, D. R.; Schuler, M. A.; Paquette, S. M.; Werck-Reichhart, D.; Bak, S., *Plant Physiol* **2004**, *135* (2), 756-72.

<sup>44</sup>Nelson, D. R.; Zeldin, D. C.; Hoffman, S. M.; Maltais, L. J.; Wain, H. M.; Nebert, D. W., **2004**, *14* (1), 1-18.

<sup>45</sup>Goldstone, J. V.; McArthur, A. G.; Kubota, A.; Zanette, J.; Parente, T.; Jonsson, M. E.; Nelson, D. R.; Stegeman, J. J., *BMC Genomics* **2010**, *11* (643), 1471-2164.

<sup>46</sup>Lamb, D. C.; Ikeda, H.; Nelson, D. R.; Ishikawa, J.; Skaug, T.; Jackson, C.; Omura, S.; Waterman, M. R.; Kelly, S. L., *Biochemical and biophysical research communications* **2003**, *307* (3), 610-9.

La classe I est un système constitué de trois protéines, une réductase FAD, une ferrédoxine (Schéma 29-a) et la P450. Les P450 de la classe I sont le plus souvent d'origine bactérienne.

La classe II regroupe les systèmes constitués de deux protéines, un cytochrome P450 réductase (CPR) à FAD et FMN et la P450 (Schéma 29-b).

La classe III regroupe les systèmes composés d'une seule entité formée de deux protéines fusionnées une « CPR-like » et la P450 (Schéma 29-c). Ces deux dernières classes ne sont pas spécifiques d'un type d'organisme en particulier. A noter que certaines P450 peuvent utiliser comme oxydant non pas l'oxygène moléculaire mais le peroxyde d'hydrogène<sup>47</sup>.

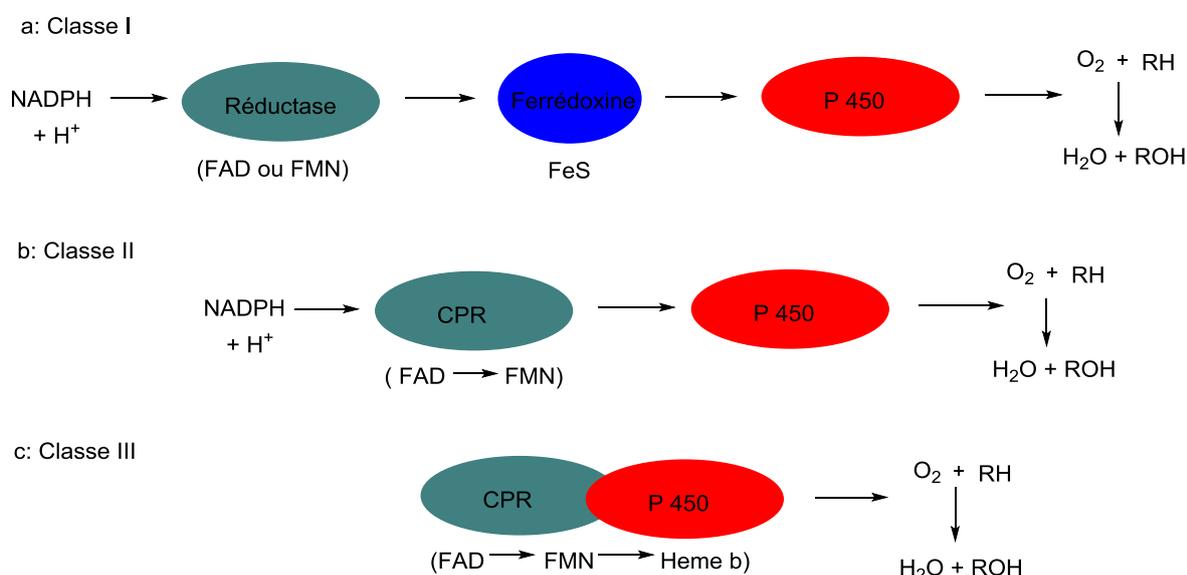


Schéma 29 : les trois classes de P450

### I.5.5.c- Structure

Deisenhoffer *et al.*<sup>48</sup> ont publié en 1995 une analyse comparative de la structure de différentes P450. Au niveau de la structure primaire, une comparaison de 18 P450 issues de divers organismes a permis de montrer une très faible homologie de séquence comprise généralement entre 10 et 30%. Cependant, certains résidus sont retrouvés dans tous les P450 comme par exemple la triade catalytique Glu-Arg-Arg ou la Cys-pocket avec une cystéine liée de manière covalente à l'hème. Dans cette étude, trois structures cristallographiques de P450 ont été comparées.

<sup>47</sup>Kumar, S.; Liu, H.; Halpert, J. R., *Drug Metab Dispos* **2006**, *34* (12), 1958-65.

<sup>48</sup>Hasemann, C. A.; Kurumbail, R. G.; Boddupalli, S. S.; Peterson, J. A.; Deisenhofer, J., *Structure* **1995**, *3* (1), 41-62.

Les deux premières, P450<sub>terp</sub> et P450<sub>cam</sub>, appartenant à la classe I et le troisième, P450<sub>Bm-3</sub>, appartenant à la classe II. Elles possèdent des structures tertiaires similaires (Figure 12) avec de nombreux éléments de structure secondaire en commun ce qui permet aux auteurs d'affirmer que toutes les P450, en dépit d'une faible homologie de séquence, possèdent une structure tertiaire identique.



Figure 12 (tirée de ref[48]) : comparaison des structures tertiaires de trois P450

#### I.5.5.d- Mécanisme

Le mécanisme des P450 a fait l'objet de nombreuses études et est aujourd'hui encore l'objet de discussions notamment sur le mode d'activation de l'oxygène moléculaire par le fer. Meunier *et al.*<sup>49</sup> ont publié un mécanisme (Schéma 30) dans lequel la réaction est initiée par le déplacement du ligand H<sub>2</sub>O par le substrat et la réduction du fer hémique au degré d'oxydation II. L'oxygène moléculaire est ensuite activé par la formation du complexe Fer(III)-hydropéroxo. La coupure de la liaison oxygène-oxygène avec formation d'une molécule d'eau conduit à la formation du complexe Fer(V)-oxo et permet l'hydroxylation du substrat.

<sup>48</sup>Hasemann, C. A.; Kurumbail, R. G.; Boddupalli, S. S.; Peterson, J. A.; Deisenhofer, J., *Structure* **1995**, 3 (1), 41-62.

<sup>49</sup>Meunier, B.; de Visser, S. P.; Shaik, S., *Chem Rev* **2004**, 104 (9), 3947-80.

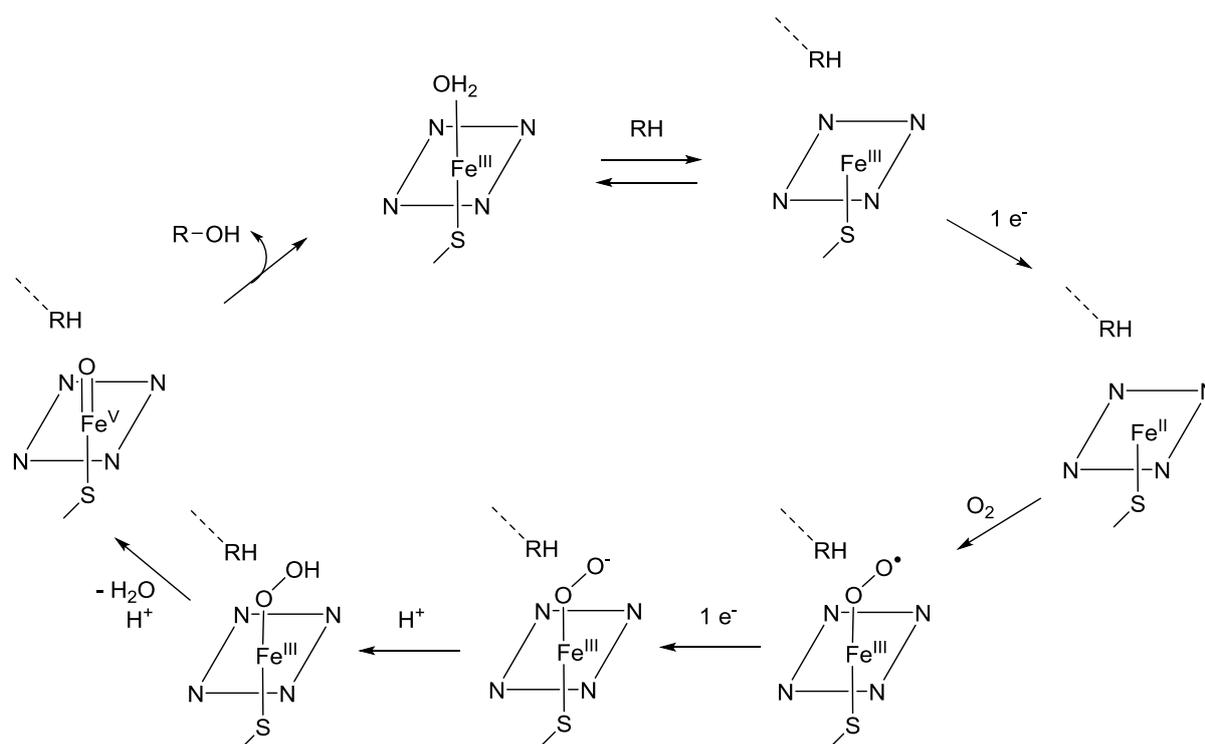


Schéma 30 : mécanisme proposé pour les P450

#### I.5.5.e- Diversité des réactions catalysées par les P450

Bien que l'hydroxylation d'une liaison C-H non activée soit la réaction la plus souvent catalysée par les P450, on retrouve dans la littérature d'autres exemples de réactions comme la création de liaison C-C<sup>50</sup> lors de la biosynthèse d'un précurseur de la vancomycine (Schéma 31-a), la déméthylation par coupure de liaison C-C<sup>51</sup> (Schéma 31-b), l'époxydation d'alcènes<sup>52</sup> (Schéma 31-c), l'oxydation de type Baeyer-Villiger<sup>53</sup> (Schéma 31-d) et, des extensions de cycle par réarrangement<sup>54</sup> (Schéma 31-e).

<sup>50</sup>Woithe, K.; Geib, N.; Zerbe, K.; Li, D. B.; Heck, M.; Fournier-Rousset, S.; Meyer, O.; Vitali, F.; Matoba, N.; Abou-Hadeed, K.; Robinson, J. A., *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (21), 6887-6895.

<sup>51</sup>Shyadehi, A. Z.; Lamb, D. C.; Kelly, S. L.; Kelly, D. E.; Schunck, W. H.; Wright, J. N.; Corina, D.; Akhtar, M., *J Biol Chem* **1996**, 271 (21), 12445-50.

<sup>52</sup>Vaz, A. D.; McGinnity, D. F.; Coon, M. J., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, 95 (7), 3555-60.

<sup>53</sup>Kim, T.-W.; Hwang, J.-Y.; Kim, Y.-S.; Joo, S.-H.; Chang, S. C.; Lee, J. S.; Takatsuto, S.; Kim, S.-K., *The Plant Cell Online* **2005**, 17 (8), 2397-2412.

<sup>54</sup>Newcomb, M.; Shen, R.; Lu, Y.; Coon, M. J.; Hollenberg, P. F.; Kopp, D. A.; Lippard, S. J., *J Am Chem Soc* **2002**, 124 (24), 6879-86.

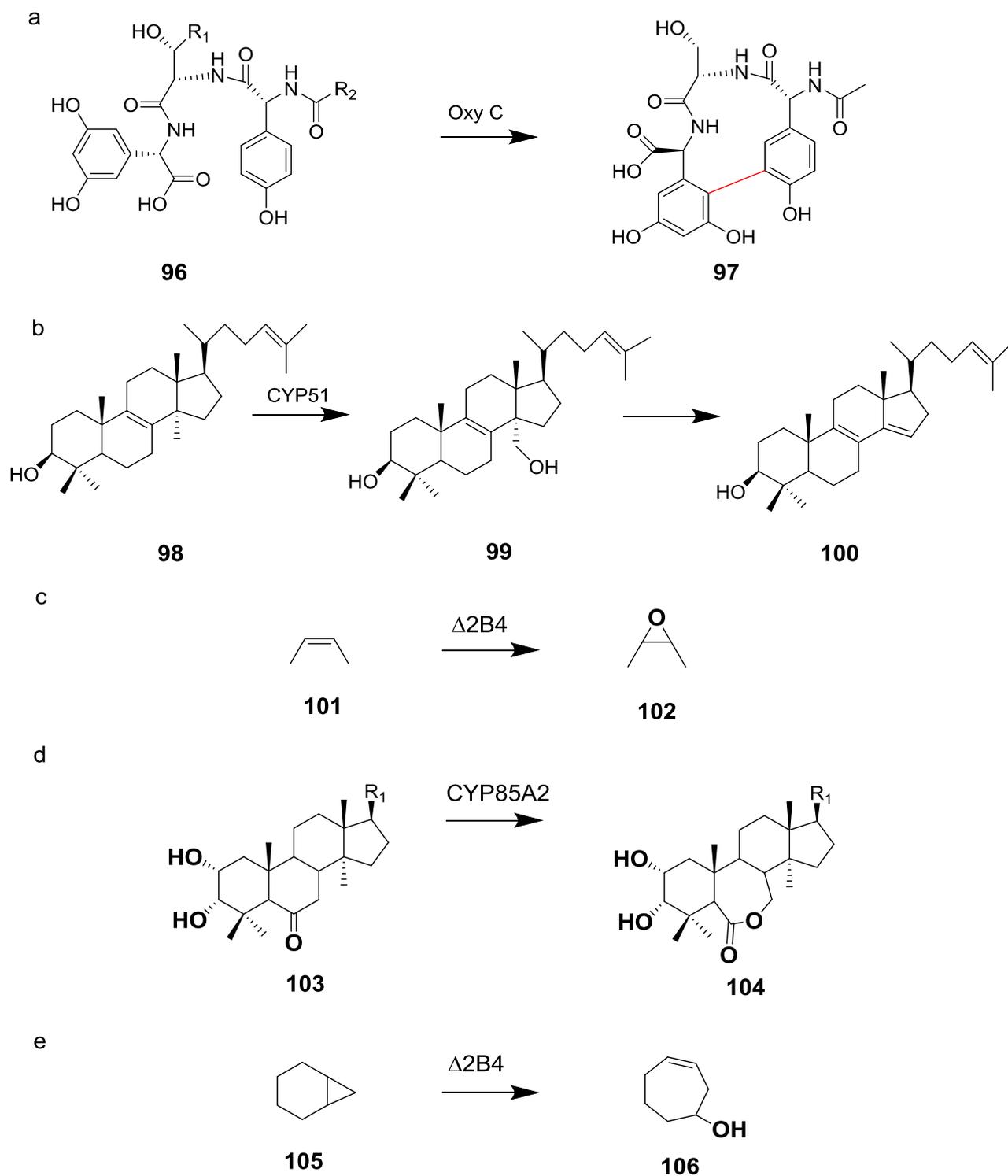


Schéma 31 : exemples d'autres réactions catalysées par les P450

## I.5.5.f- Diversité de substrats des enzymes natives

A l'inverse de nombreuses enzymes, les P450 possèdent une promiscuité de substrats assez importante. Cela peut s'expliquer par le rôle joué par les P450. Par exemple, chez les mammifères elles interviennent dans le processus d'élimination de molécules exogènes et

doivent donc accepter des substrats de structures variées. De plus, les P450 des mammifères étant transmembranaires elles acceptent des substrats globalement hydrophobes tels que le benzopyrène (**107**), la caféine (**108**) et le tolbutamide (**109**)<sup>55</sup> (Figure 13).

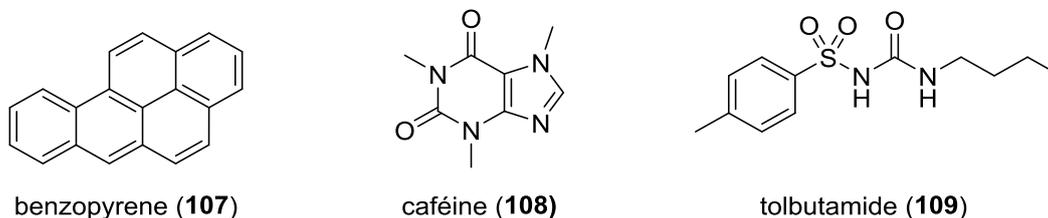


Figure 13 : exemple de substrats apolaires de structures variées

#### I.5.5.g- Utilisation des P450 en biocatalyse

##### I.5.5.g.1- Intérêts et stratégies possibles

Le nombre important de P450, la promiscuité de substrats de cette famille d'enzymes et les difficultés de la chimie conventionnelle pour l'oxydation de liaison C-H non activée ont provoqué un grand intérêt pour le développement d'applications à l'échelle industrielle dans des domaines tels que la chimie pharmaceutique<sup>56</sup> ou la bioremédiation<sup>57</sup>. Ces dernières années, l'ingénierie des P450 déjà connues, que ce soit par design rationnel, semi rationnel ou par évolution dirigée, ainsi que des approches plus originales (docking/protection du substrat, utilisation d'une molécule « leurre ») ont en effet permis de mettre en évidence la puissance des P450 dans la synthèse de produits d'intérêt<sup>58,59</sup>.

De nombreux exemples de mutation de P450 ont ainsi été publiés pour la modification de l'activité enzymatique. Arnold *et al.*<sup>60</sup>, groupe leader dans le domaine des P450, ont publié l'obtention d'un mutant de la P450 BM-3, hydroxylant la buspirone (**110**) de manière stéréospécifique pour conduire à la (*R*)-6-hydroxybuspirone (**111**), composé aux propriétés anxiolitique<sup>61</sup> (Schéma 32).

<sup>55</sup>Lewis, D. F.; Eddershaw, P. J.; Dickins, M.; Tarbit, M. H.; Goldfarb, P. S., *Chem Biol Interact* **1998**, *115* (3), 175-99.

<sup>56</sup>Demian, A. L., WO96/40863, **1997**.

<sup>57</sup>Abhilash, P. C.; Jamil, S.; Singh, N., *Biotechnol Adv* **2009**, *27* (4), 474-88.

<sup>58</sup>Kumar, S., *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2010**, *6* (2), 115-31.

<sup>59</sup>Fasan, R., *ACS Catalysis* **2012**, *2* (4), 647-666.

<sup>60</sup>Landwehr, M.; Hochrein, L.; Otey, C. R.; Kasrayan, A.; Backvall, J. E.; Arnold, F. H., *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (18), 6058-9.

<sup>61</sup>Hanson, R. L.; Parker, W. L.; Brzozowski, D. B.; Tully, T. P.; Liu, M.; Kotnis, A.; Patel, R. N., *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16* (16), 2711-2716.

Les 14 mutations de la P450 BM-3 permettent un changement de sélectivité de substrat, la P450 BM-3 n'hydroxylant que les acides gras.

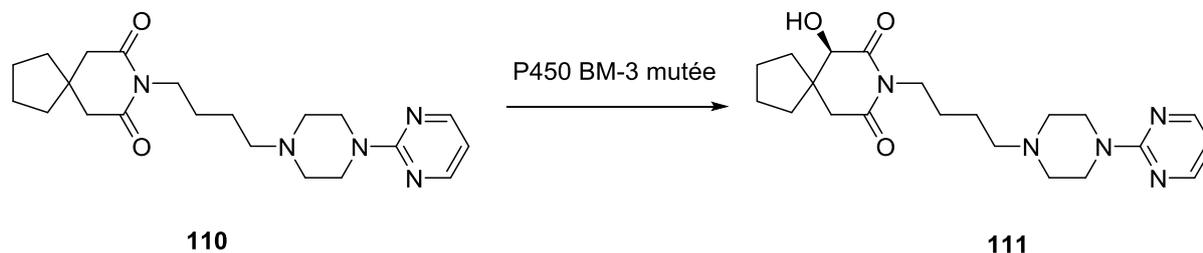


Schéma 32 : synthèse d'un dérivé de la buspironne par une P450 BM-3 mutée

En 2009, la même équipe<sup>62</sup> a publié, toujours avec des mutants de la BM-3, la synthèse de nombreux métabolites hydroxylés de plusieurs médicaments tels que le vérapamil (**112**) ou encore l'astémizole (**113**) (Figure 14), ce qui permettra d'effectuer des tests toxicologiques et pharmacologiques de ces métabolites.

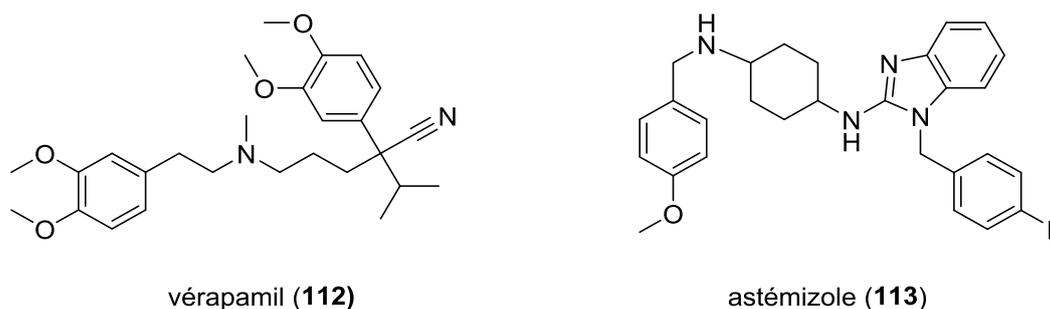


Figure 14 : substrats acceptés par des variants de la P450 BM-3

Girhard *et al.*<sup>42</sup> ont publié en 2012 un tableau récapitulant la diversité des substrats acceptés par les mutants de la P450 BM-3 obtenus par évolution dirigée (Figure 15). A partir d'une seule enzyme native et sélective ses acides gras, on peut voir que de nombreux substrats de structures très variées peuvent être hydroxylés.

<sup>42</sup>Urlacher, V. B.; Girhard, M., *Trends Biotechnol.* **2012**, *30* (1), 26-36.

<sup>62</sup>Sawayama, A. M.; Chen, M. M.; Kulanthaivel, P.; Kuo, M. S.; Hemmerle, H.; Arnold, F. H., *Chemistry* **2009**, *15* (43), 11723-9.

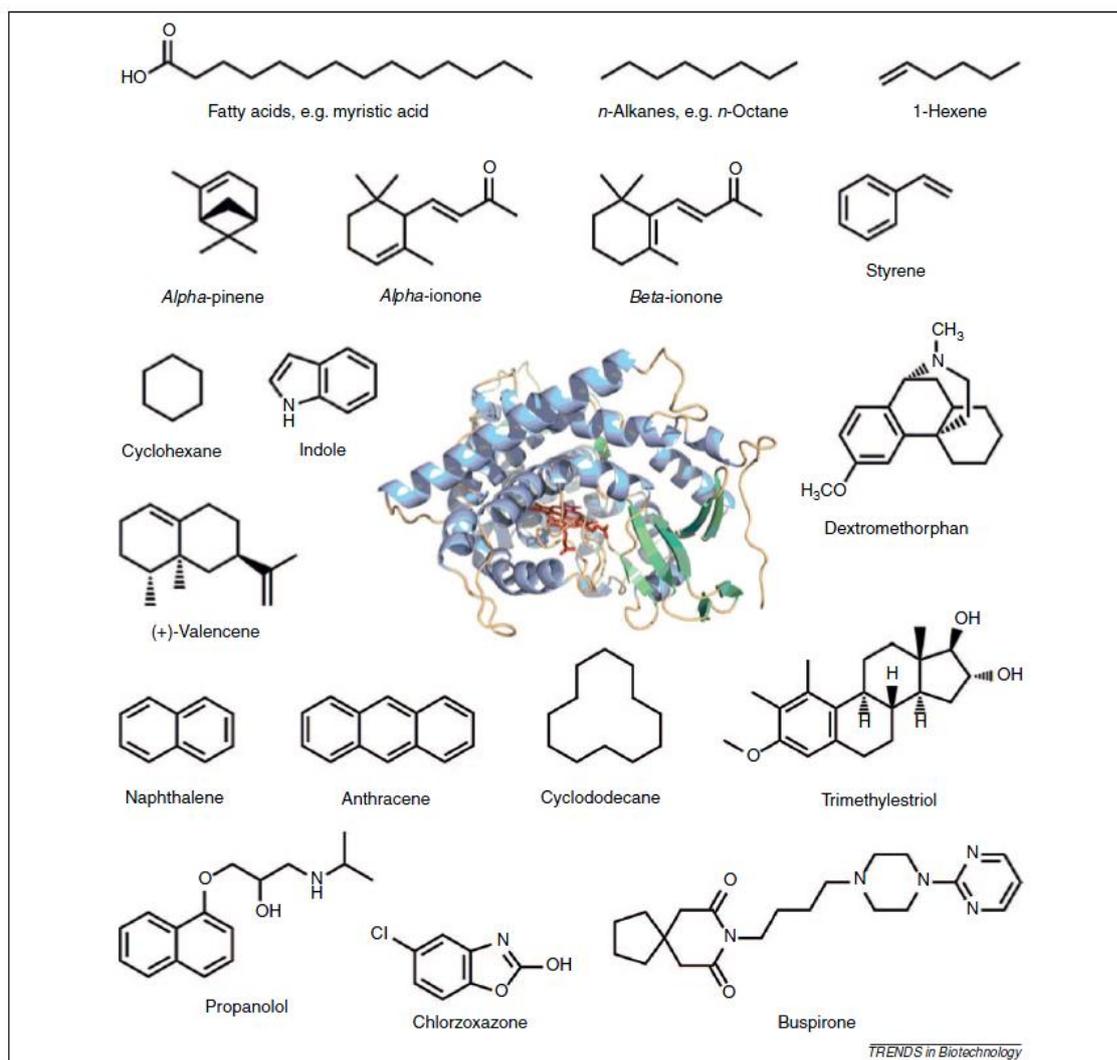


Figure 15 (tirée de ref [42]) : Exemples de substrats acceptés par la P450 BM-3 et ses mutants

Une approche originale a été développée par l'équipe de Watanabe sur la P450<sub>BD $\beta$</sub>  de *Bacillus subtilis*<sup>63</sup>. Cette enzyme est extrêmement intéressante pour plusieurs raisons : elle utilise l'eau oxygénée comme oxydant, est soluble et ne nécessite pas de co-facteurs. On voit ainsi qu'elle pourrait être un bon candidat pour une application industrielle. Seulement les substrats de P450<sub>BD $\beta$</sub>  sont uniquement des acides gras à longue chaîne. L'idée de l'équipe a alors été d'utiliser une molécule « leurre » possédant une fonction carboxylate interagissant avec un résidu de reconnaissance du substrat dans le site actif, occupant de la place et laissant ainsi une place réduite au substrat non naturel (Schéma 33). L'oxydation de l'éthylbenzène a ainsi été possible avec cependant une stéréosélectivité moyenne.

<sup>42</sup>Urlacher, V. B.; Girhard, M., *Trends Biotechnol.* **2012**, *30* (1), 26-36.

<sup>63</sup>Shoji, O.; Fujishiro, T.; Nakajima, H.; Kim, M.; Nagano, S.; Shiro, Y.; Watanabe, Y., *Angewandte Chemie* **2007**, *119* (20), 3730-3733.

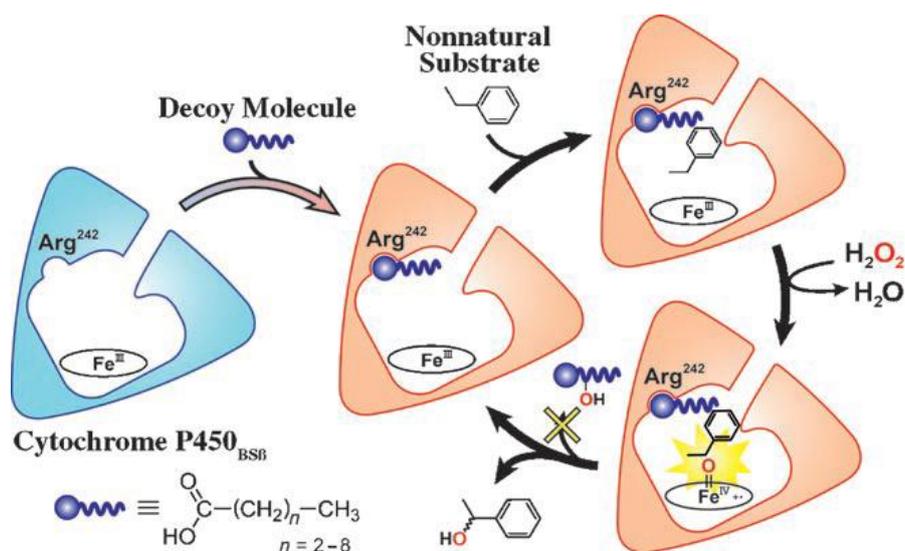


Schéma 33 (tiré de [63]) : stratégie d'hydroxylation avec l'utilisation d'une molécule « leurre »

Le concept de « docking/protection » est également très intéressant mais plus limité dans la mesure où il faut que le substrat modifié interagisse avec le site actif de l'enzyme et nécessite une étape de « protection » puis une étape de « déprotection ». De Raadt *et al.*<sup>64</sup> ont publié une hydroxylation de l'acide cyclopentanoïque (**115**) avec deux mutants de la P450 BM-3 qui conduit à l'obtention des deux énantiomères (*S,S*)**116** et (*R,R*)**117** de l'acide 3-hydroxypentanoïque pouvant être utilisés comme bloc de construction chiral par le chimiste organicien (Schéma 34).

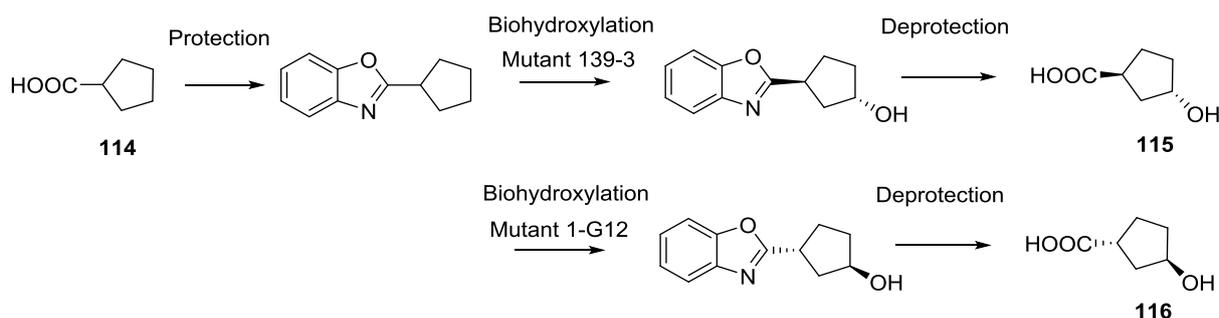


Schéma 34 : exemple de l'utilisation d'un groupe protecteur

<sup>64</sup>Munzer, D. F.; Meinhold, P.; Peters, M. W.; Feichtenhofer, S.; Griengl, H.; Arnold, F. H.; Glieder, A.; de Raadt, A., *Chem Commun* **2005**, 28 (20), 2597-9.

<sup>63</sup>Shoji, O.; Fujishiro, T.; Nakajima, H.; Kim, M.; Nagano, S.; Shiro, Y.; Watanabe, Y., *Angewandte Chemie* **2007**, 119 (20), 3730-3733.

## I.5.5.g.2- Limitations et applications

Les P450 semblent être les candidats idéaux pour des applications en biocatalyse. Cependant, le développement industriel des P450 peut s'avérer compliqué dans la mesure où ils peuvent être instables avec la perte de l'hème dans certaines conditions de purification, ce qui induit un changement de conformation non souhaitée du P450 et la perte de l'activité. A quelques exceptions près, ces enzymes ont également besoin de cofacteurs onéreux et d'une réductase associée<sup>65</sup>. C'est pour cela que la plupart des transformations sont réalisées avec des cellules entières et non des enzymes isolées.

Plusieurs utilisations de P450 dans des procédés industriels ont été développées ces dernières années, comme par exemple dans la synthèse de la pravastatine (**117**), un dislipidémiant<sup>56</sup>(Figure 16-a). Pour la synthèse de composés de type cortisol et dérivés, les P450 sont très souvent utilisés pour catalyser les étapes d'oxydations (Figure 16-b)<sup>66</sup>.

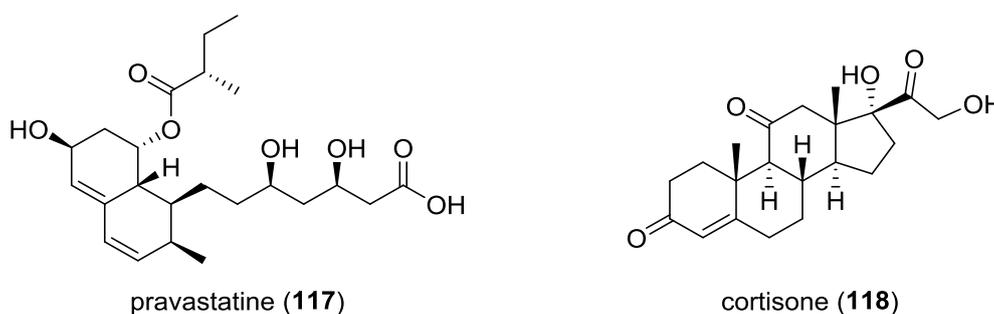


Figure 16 : exemple de produits d'intérêt obtenus avec des P450

Un autre exemple intéressant, relevant de l'ingénierie métabolique, a été publié en 2006 par Keasling *et al.*, avec la synthèse de l'acide artémisinique<sup>67</sup>. Une voie métabolique incluant trois étapes avec un P450 issu d'*Artemisia annua* (Schéma 35) a été reconstituée dans *Saccharomyces cerevisiae* pour la production de l'acide artémisinique (**122**), précurseur de l'artémisine, un antipaludique que Sanofi commercialise depuis 2013.

<sup>65</sup>Yoshida, Y., Foreword. *Biol Pharm Bull* **2012**, *35* (6), 811.

<sup>56</sup>Demian, A. L., WO96/40863, **1997**.

<sup>66</sup>Bureik, M.; Schiffler, B.; Hiraoka, Y.; Vogel, F.; Bernhardt, R., *Biochemistry* **2002**, *41* (7), 2311-21.

<sup>67</sup>Ro, D.-K.; Paradise, E. M.; Ouellet, M.; Fisher, K. J.; Newman, K. L.; Ndungu, J. M.; Ho, K. A.; Eachus, R. A.; Ham, T. S.; Kirby, J.; Chang, M. C. Y.; Withers, S. T.; Shiba, Y.; Sarpong, R.; Keasling, J. D., *Nature* **2006**, *440* (7086), 940-943.

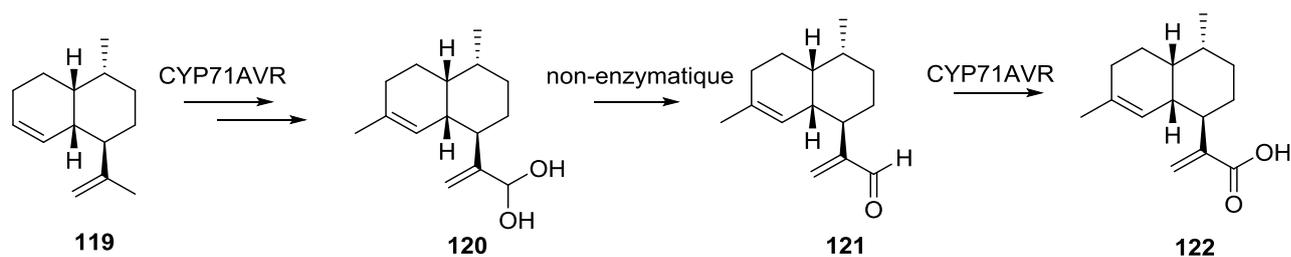


Schéma 35 : synthèse du précurseur de l'artémisine par ingénierie métabolique

## I.6- Conclusion

Comme nous avons pu le voir au cours de ce chapitre, la fonctionnalisation d'une liaison Csp<sup>3</sup>-H non activée en chimie conventionnelle est encore très compliquée et le plus souvent réalisée sur des molécules de structures très simples. La biocatalyse apparaît comme une solution très intéressante et notamment les monooxygénases de type P450 qui permettent l'hydroxylation d'une liaison Csp<sup>3</sup>-H non activée dans des conditions douces et de manière régio- et stéréosélective. Les P450 nécessitent tout de même la présence de cofacteurs onéreux et d'une réductase associée, ce qui implique le plus souvent un travail sur cellule entière. C'est pour cette raison que l'étude d'autres familles d'oxydation telles que les dioxygénases  $\alpha$ -cétoglutarate et fer dépendantes est primordial pour le développement de nouveaux biocatalyseurs d'oxydation.



## **Chapitre II**

# **Dioxygénases $\alpha$ -cétoglutarate et fer dépendantes**



## Chapitre II

### Dioxygénases $\alpha$ -cétoglutarate et fer dépendantes

#### II.1- Présentation générale

Les dioxygénases  $\alpha$ -cétoglutarate et fer dépendantes (notées  $\alpha$ -KAO) catalysent, comme les P450, principalement la réaction d'hydroxylation d'une liaison Csp<sup>3</sup>-H non activée. Cependant, leurs caractéristiques sont très différentes : le fer est non hémique ; elles fonctionnent avec un trio de substrats, l'oxygène moléculaire, un  $\beta$ -cétodiacide (le plus souvent l' $\alpha$ -cétoglutarate) et une espèce R-H spécifique à l'enzyme; les deux oxygènes de l'oxygène moléculaire sont transférés, un sur l' $\alpha$ -cétoglutarate qui subit une décarboxylation oxydative pour conduire au succinate avec libération de dioxyde de carbone, et l'autre sur le substrat R-H pour donner le dérivé hydroxylé R-OH (Schéma 36).

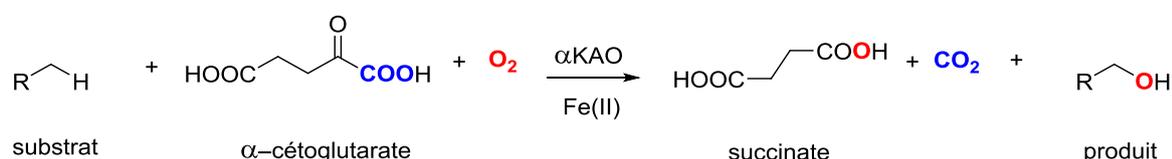
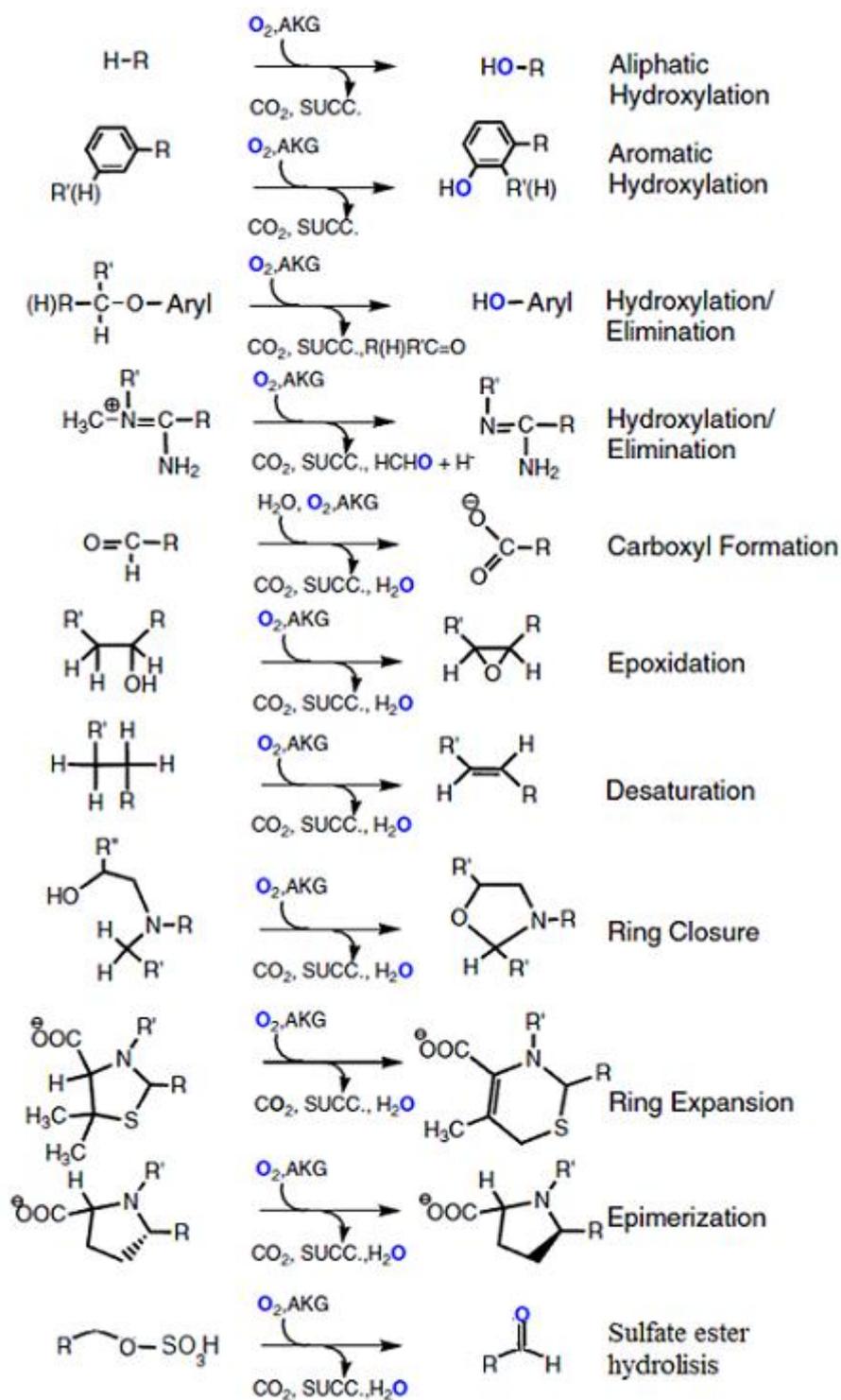


Schéma 36 : réaction d'hydroxylation catalysée par une  $\alpha$ -KAO

A l'image des P450, les  $\alpha$ -KAO ne catalysent pas uniquement des réactions d'hydroxylation d'une liaison Csp<sup>3</sup>-H non activée mais une multitude de réactions qui ont été découvertes ces dix dernières années, telles que l'époxydation, la désaturation, la fermeture ou encore l'extension de cycle. L'intégralité des réactions catalysées par les  $\alpha$ -KAO, connues à ce jour, sont représentées dans le schéma 37<sup>68</sup>.

<sup>68</sup>Purpero, V.; Moran, G. R., *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **2007**, 12 (5), 587-601.

Schéma 37 (tiré de ref[68]) : diversité des réactions catalysées par les  $\alpha$ -KAO

<sup>68</sup>Purpero, V.; Moran, G. R., *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **2007**, 12 (5), 587-601.

## II.2- Rôle biologique

Les  $\alpha$ -KAO sont retrouvées dans divers organismes tels que les mammifères<sup>69</sup>, les plantes<sup>70</sup>, les champignons<sup>71</sup> et les bactéries<sup>72</sup> et possèdent des rôles biologiques très variés. On trouve des  $\alpha$ -KAO dans le métabolisme primaire, par exemple dans la biosynthèse de la carnithine, et aussi de nombreux exemples dans les voies de biosynthèse des métabolites secondaires notamment dans des voies impliquant les synthèses de peptides non ribosomiaux (NRPS). Les principaux rôles biologiques des  $\alpha$ -KAO seront présentés dans la partie suivante.

### II.2.1- Réparation d'ADN

Des  $\alpha$ -KAO sont impliquées dans la réparation d'ADN chez l'homme<sup>73</sup>, les plantes<sup>74</sup> et les bactéries<sup>75</sup>. Par exemple, chez l'homme, deux  $\alpha$ -KAO, ABH2 et ABH3, permettent la réparation des bases azotées en catalysant la déméthylation de la 1-méthyladénine (**123**) et la 3-méthylcytosine (**124**), qui sont des composés cytotoxiques, pour revenir à l'adénine (**125**) et la cytosine (**126**) (Schéma 38).

---

<sup>69</sup>Tahiliani, M.; Koh, K. P.; Shen, Y.; Pastor, W. A.; Bandukwala, H.; Brudno, Y.; Agarwal, S.; Iyer, L. M.; Liu, D. R.; Aravind, L.; Rao, A., *Science (New York, N.Y.)* **2009**, *324* (5929), 930-5.

<sup>70</sup>Griffin, S. L.; Godbey, J. A.; Oman, T. J.; Embrey, S. K.; Karnoup, A.; Kuppannan, K.; Barnett, B. W.; Lin, G.; Harpham, N. V. J.; Juba, A. N.; Schafer, B. W.; Cicchillo, R. M., *J. of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61* (27), 6589-6596.

<sup>71</sup>Cultrone, A.; Scazzocchio, C.; Rochet, M.; Montero-Moran, G.; Drevet, C.; Fernandez-Martin, R., *Molecular microbiology* **2005**, *57* (1), 276-90.

<sup>72</sup>Gazitua, M. C.; Slater, A. W.; Melo, F.; Gonzalez, B., *Environ Microbiol* **2010**, *12* (9), 2411-25.

<sup>73</sup>Duncan, T.; Trewick, S. C.; Koivisto, P.; Bates, P. A.; Lindahl, T.; Sedgwick, B., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99* (26), 16660-5.

<sup>74</sup>Meza, T. J.; Moen, M. N.; Vagbo, C. B.; Krokkan, H. E.; Klungland, A.; Grini, P. E.; Falnes, P. O., *Nucleic Acids Res* **2012**, *40* (14), 6620-31.

<sup>75</sup>Sedgwick, B.; Robins, P.; Lindahl, T., *Methods Enzymol* **2006**, *408*, 108-20.

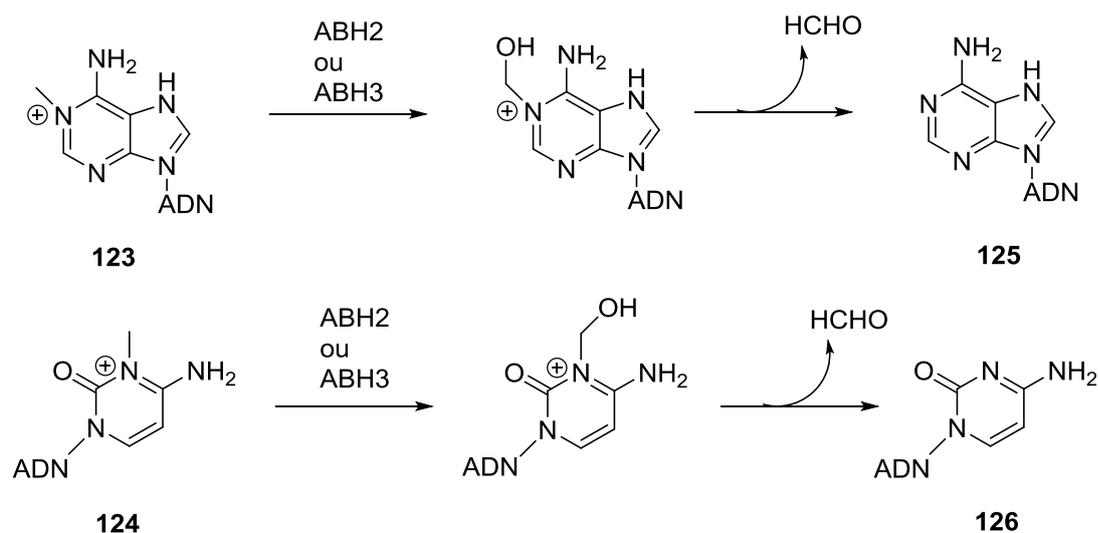
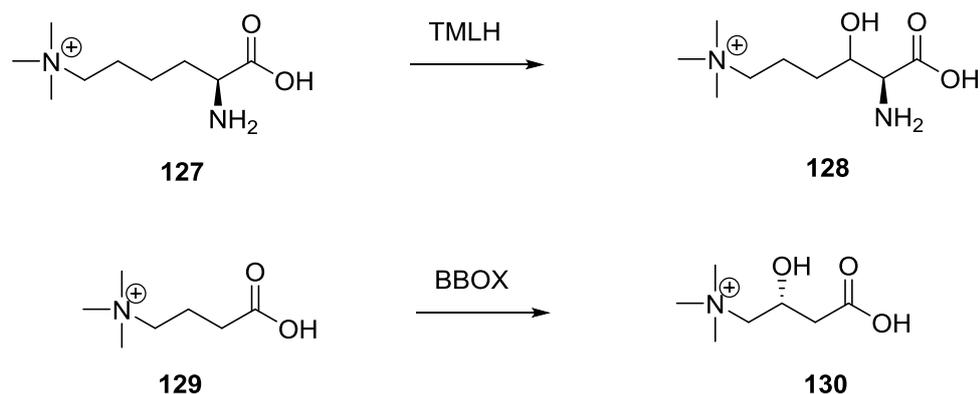


Schéma 38 : réparation d'ADN par ABH2 et ABH3

### II.2.2- Biosynthèse de la L-carnitine

La L-carnitine (**130**) est une molécule intervenant dans le transport des acides gras lors du catabolisme des lipides dans le métabolisme énergétique. Chez l'homme, deux  $\alpha$ -KAO interviennent pour la biosynthèse la L-carnitine<sup>76</sup> : TMLH et BBOX, la première pour l'hydroxylation de la  $N^{\epsilon}$ -triméthyl-L-lysine (**127**) et la seconde pour la formation de la L-carnitine (**130**) (Schéma 39). Ces deux  $\alpha$ -KAO sont également retrouvés chez les plantes<sup>77</sup>, les champignons<sup>78</sup> et les bactéries<sup>79</sup>.



<sup>76</sup>Leung, I. K. H.; Krojer, T. J.; Kochan, G. T.; Henry, L.; von Delft, F.; Claridge, T. D. W.; Oppermann, U.; McDonough, M. A.; Schofield, C. J., *Chemistry & biology* **2010**, *17* (12), 1316-1324.

<sup>77</sup>Rippa, S.; Zhao, Y.; Merlier, F.; Charrier, A.; Perrin, Y., *Plant Physiol Biochem* **2012**, *60*, 109-14.

<sup>78</sup>Rebouche, C. J.; Broquist, H. P., *J Bacteriol* **1976**, *126* (3), 1207-14.

<sup>79</sup>Lindstedt, G.; Lindstedt, S.; Nordin, I., *Biochemistry* **1977**, *16* (10), 2181-8.

## II.2.3- Collagène

Chez l'homme, trois  $\alpha$ -KAO interviennent pour le maintien de la stabilité de la triple hélice du collagène<sup>80,81</sup>. P3H et P4H hydroxylent les résidus prolyl respectivement en position 3 et 4 et LH hydroxyle les résidus lysil en position 5 (Schéma 40). Des mutations sur l'enzyme LH provoquent les syndromes d'Ehlers-Danlos avec pour conséquences notables l'hypermobilité articulaire, l'hyper-élasticité de la peau, de nombreux hématomes spontanés et une fragilité oculaire<sup>82</sup>.

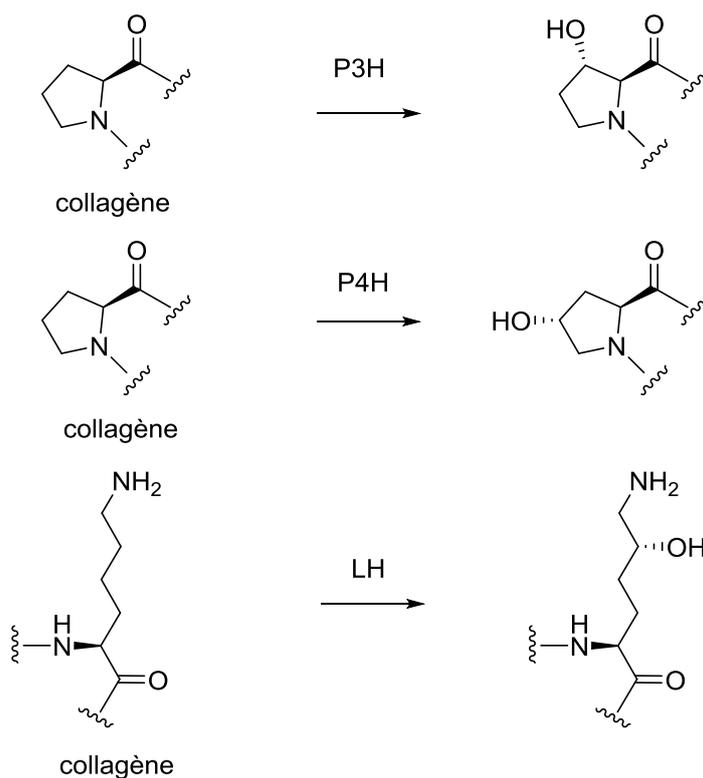


Schéma 40 : hydroxylation des résidues prolyl et lysil dans le collagène

## II.2.4- Biosynthèse des gibbérellines

Les gibbérellines (GAs) sont des phytohormones qui contrôlent de nombreux paramètres dans le cycle de la vie des plantes supérieures, tels que la germination, la croissance et le développement des fruits.

<sup>80</sup>Myllyharju, J., *Matrix Biol* **2003**, 22 (1), 15-24.

<sup>81</sup>Suokas, M.; Lampela, O.; Juffer, A. H.; Myllyla, R.; Kellokumpu, S., *Biochem J* **2003**, 370 (Pt 3), 913-20.

<sup>82</sup>Mizuno, M.; Kitafima, T.; Tomita, M.; Kuboki, Y., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1996**, 1310 (1), 97-102.

De nombreuses  $\alpha$ -KAO interviennent pour la biosynthèse des différentes gibbérellines et catalysent des réactions variées telles que l'hydroxylation (GA-12a hydroxylase, GA-13 hydroxylase, GA-3 $\beta$  hydroxylase), l'oxydation d'alcool en aldéhyde (GA-2 oxydase, GA-20 oxydase), et l'oxydation d'aldéhyde en acide (GA-7 oxydase) (Schéma 41)<sup>83</sup>.

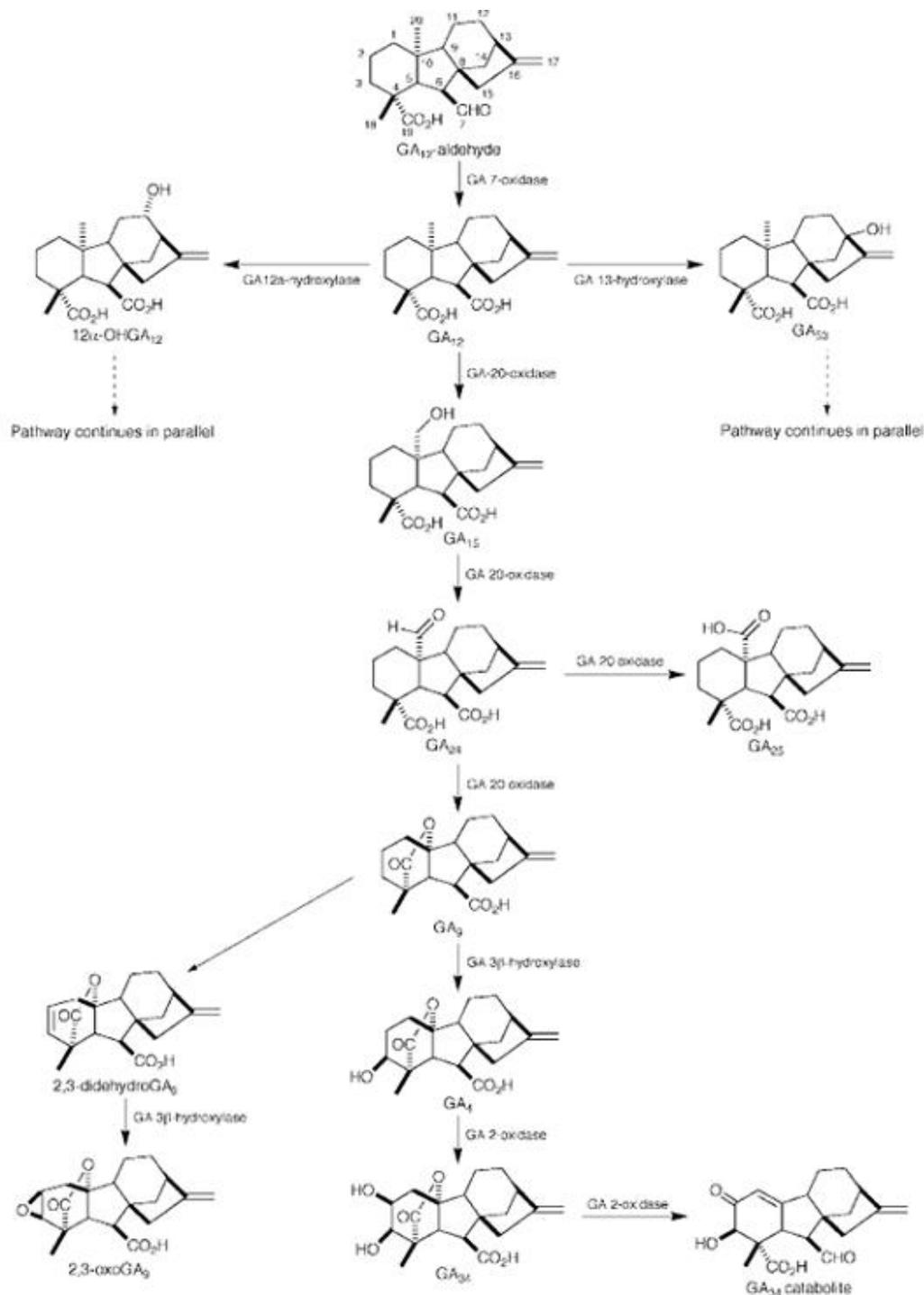


Schéma 41 (tiré de ref[83]) : biosynthèse des gibbérellines

<sup>83</sup>Prescott, A. G.; Lloyd, M. D., *Natural product reports* **2000**, *17* (4), 367-83

### II.2.5- Biosynthèse d'alcaloïdes

Les  $\alpha$ -KAO sont impliquées dans la biosynthèse alcaloïdes de types "tropanes" et "indoles" dans deux nombreuses espèces de plantes. Ces alcaloïdes ont pour rôle de protéger la plante des herbivores. Ils peuvent avoir une action hallucinogène comme la mescaline, d'excitant comme la caféine ou encore de poison comme la coniine ou l'aconitine. La scopolamine (**133**), utilisée chez l'homme comme anticholinergique, est synthétisée en deux étapes, avec en premier une hydroxylation puis une époxydation (Schéma 42), réalisées par une  $\alpha$ -KAO : la 6 $\beta$ -hydroxylase (H6H)<sup>84</sup>.

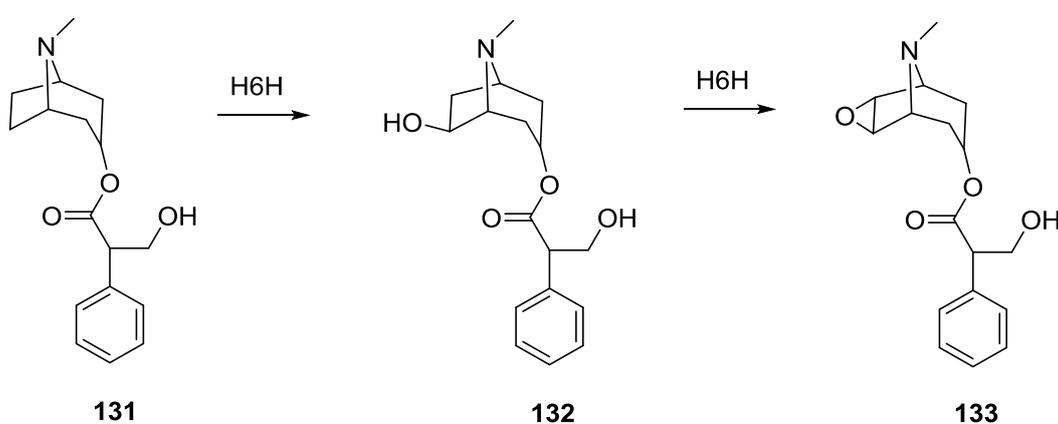


Schéma 42 : biosynthèse de la scopolamine (**133**)

### II.2.6 Biosynthèse d'antibiotiques

On retrouve des  $\alpha$ -KAO dans de nombreuses voies de métabolites secondaires antibiotiques comportant des acides aminés modifiés, comme les peptides non ribosomaux (NRP).

#### II.2.6.a-Peptides non ribosomaux

L'incorporation d'un acide aminé modifié est une des caractéristiques des peptides non ribosomaux. L'acide aminé protéinogène peut, soit être modifié par des enzymes dédiées avant d'être incorporé sur la ligne d'assemblage du système NRPS, soit être modifié après son incorporation par des enzymes du complexe multiprotéique. Ainsi on trouve des  $\alpha$ -KAO ayant une activité sur les acides aminés isolés ou sur les acides aminés liés à la structure multiprotéique.

<sup>84</sup>Yamada, Y., Matsuda, J., Hashimoto, T., *FEBS J* **1993**, 1(2), 35-39.

## II.2.6.a.1- Antibiotiques calcium-dépendant

Pour la biosynthèse des antibiotiques de type calcium-dépendant (CDA), qui sont des peptides composés de 10 acides aminés le plus souvent non protéinogènes<sup>85</sup>. Ces peptides contiennent notamment une hydroxy-L-asparagine **135**, hydroxylée chez *Streptomyces coelicolor* A(3)2 par une  $\alpha$ -KAO : AsnO (Schéma 43).

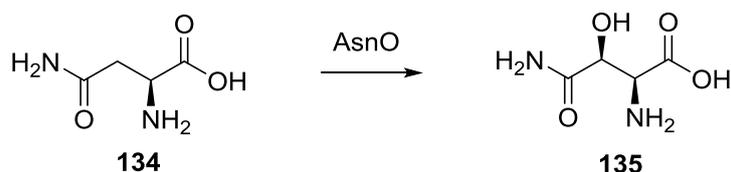
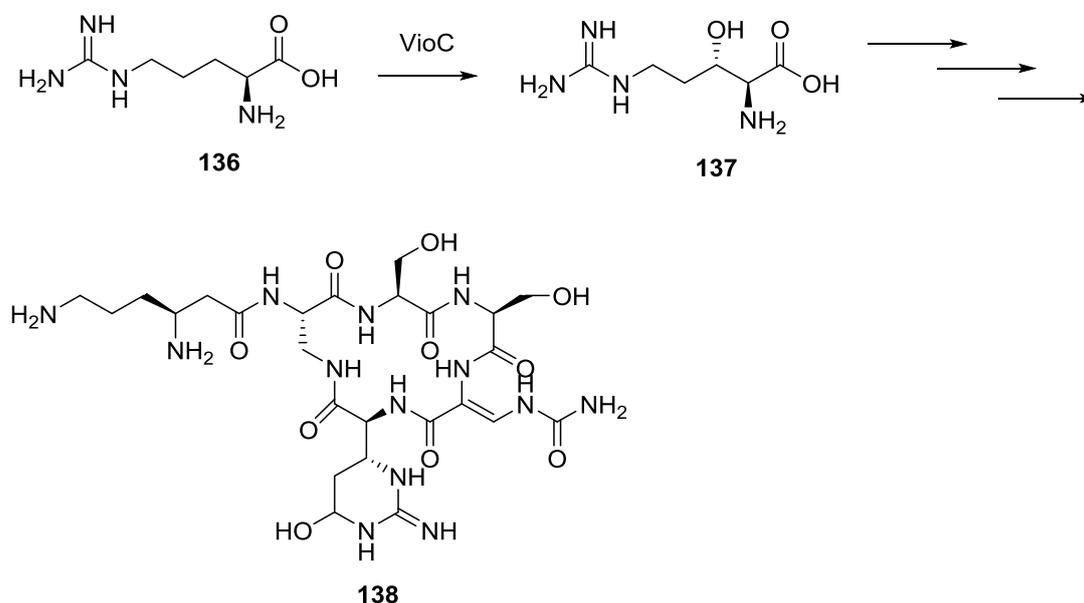


Schéma 43 : hydroxylation de la L-asparagine

## II.2.6.a.2- Viomycine

La viomycine, qui est un antibiotique de la famille des capréomycines, est un pentapeptide cyclique composé d'acides aminés basiques non protéinogènes. La (2*S*,3*S*)-capreomycidine (**137**) présente dans ce peptide est synthétisée à partir de L-arginine (**136**) en deux étapes dont une d'hydroxylation à partir de l' $\alpha$ -KAO VioC<sup>86</sup> (Schéma 44).

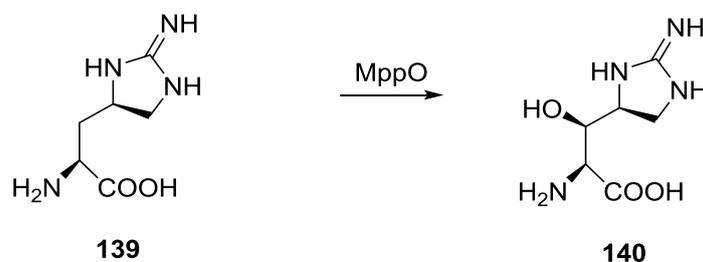
Schéma 44 : biosynthèse de la viomycine (**138**)

<sup>85</sup>Strieker, M.; Kopp, F.; Mahlert, C.; Essen, L. O.; Marahiel, M. A., *ACS Chem Biol* **2007**, 2 (3), 187-96.

<sup>86</sup>Helmetag, V.; Samel, S. A.; Thomas, M. G.; Marahiel, M. A.; Essen, L. O., *Febs J* **2009**, 276 (13), 3669-82.

## II.2.6.a.3- Mannopeptimycines

Les mannopeptimycines (MPP), produit par *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 30439, sont des glycopeptides cycliques qui contiennent un dérivé de l'arginine : la  $\beta$ -hydroxyenduracididine (**140**). Ce dérivé d'acide aminé est obtenu à partir de l'hydroxylation de la L-enduracididine (**129**) par l' $\alpha$ -KAO MppO<sup>87</sup> (Schéma 45).

Schéma 45 : hydroxylation de la L-enduracididine (**129**)

## II.2.6.a.4- Syringomycines

Lors de la biosynthèse de la syringomycine E, un lipocyclodepsipeptide constitué d'acides aminés non protéinogènes, chez *Pseudomonas syringae*, l' $\alpha$ -KAO SyrP catalyse l'hydroxylation en  $\beta$  d'un résidu L-aspartyl<sup>88</sup> lié par une liaison pantetheinyl thioester à la mégasynthase responsable de la biosynthèse de la syringomycine (PCP) (Schéma 46).

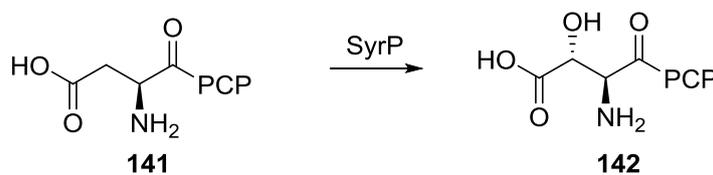


Schéma 46 : hydroxylation des résidus L-aspartyl

## II.2.6.b- Acide clavulanique

L'acide clavulanique (**147**) est un inhibiteur des  $\beta$ -lactamases, principale cause de la résistance des bactéries à la pénicilline.

<sup>87</sup>Haltli, B.; Tan, Y.; Magarvey, N. A.; Wagenaar, M.; Yin, X.; Greenstein, M.; Hucul, J. A.; Zabriskie, T. M., *Chemistry & biology* **2005**, *12* (11), 1163-1168.

<sup>88</sup>Singh, G. M.; Fortin, P. D.; Koglin, A.; Walsh, C. T., *Biochemistry* **2008**, *47* (43), 11310-20.

Une  $\alpha$ -KAO (CAS) intervient dans la biosynthèse de cette molécule chez *Streptomyces clavuligerus* en catalysant trois étapes pour passer de l'acide désoxyguanidinoproclavamique (**143**) à l'acide clavulanique (**147**)<sup>89</sup> (Schéma 47).

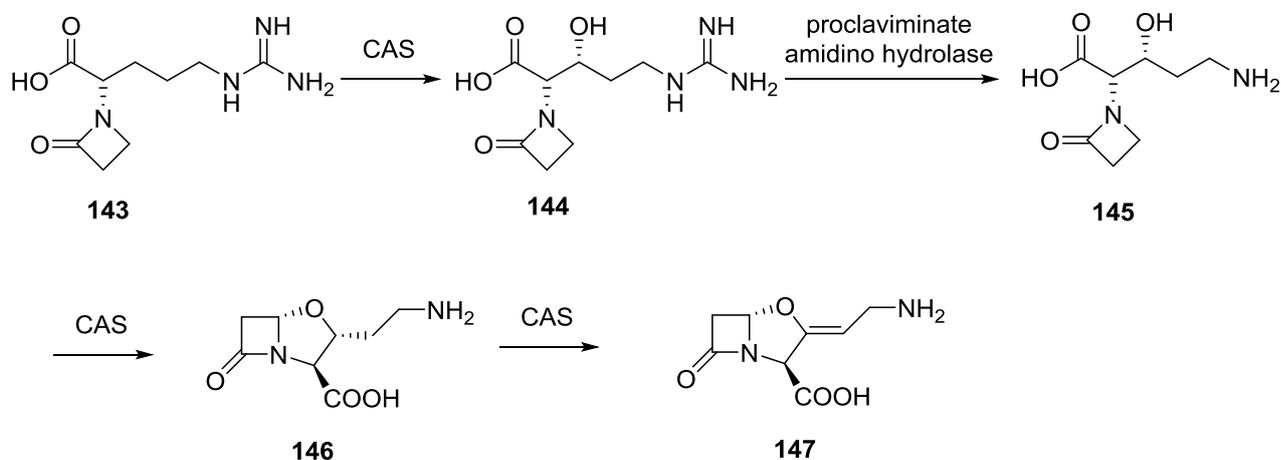


Schéma 47 : biosynthèse de l'acide clavulanique

### II.2.6.c- Carbapénème

Des  $\alpha$ -KAO sont également présentes dans la biosynthèse d'antibiotiques de type carbapénème. Par exemple, pour la biosynthèse (5R)-carbapenem-3-carboxylate (**149**), le plus simple des carbapénèmes, l' $\alpha$ -KAO CarC catalyse une réaction d'épimérisation et de désaturation pour conduire au composé (**149**)<sup>90</sup> (Schéma 48).

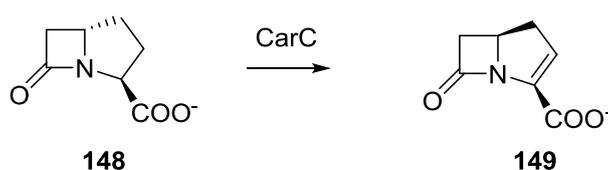


Schéma 48 : biosynthèse du (5R)-carbapenem-3-carboxylate (**149**)

<sup>89</sup>Salowe, S. P.; Marsh, E. N.; Townsend, C. A., *Biochemistry* **1990**, 29 (27), 6499-6508.

<sup>90</sup>Borowski, T.; Broclawik, E.; Schofield, C. J.; Siegbahn, P. E., *J Comput Chem* **2006**, 27 (6), 740-8.

## II.2.6.d- Pénicillines et céphalosporines

Chez les champignons, on trouve de nombreuses voies de biosynthèse, comprenant des étapes catalysées par des  $\alpha$ -KAO, de composés pour la résistance aux attaques diverses tels que des antibiotiques comme les céphalosporines et les pénicillines<sup>91</sup>.

Par exemple, pour la production de la pénicilline N (**151**) et de la désacétoxycéphalosporine C (**153**), issues de la même voie de biosynthèse, deux  $\alpha$ -KAO interviennent : IPNS, qui permet la fermeture de cycle pour conduire à l'isopénicilline N (**151**), et DAOCS, qui permet l'extension de cycle pour conduire à la désacétoxycéphalosporine C (**153**) (Schéma 49).

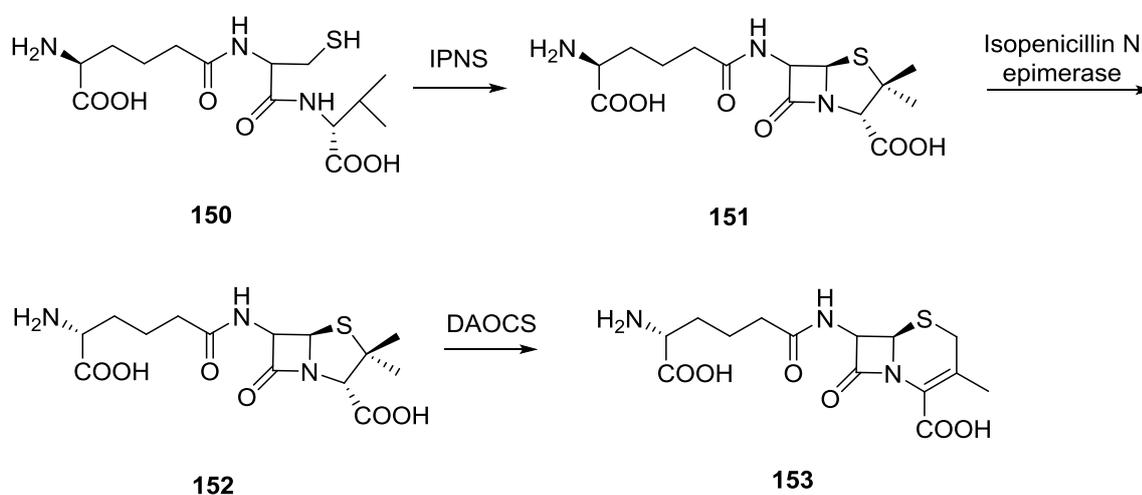
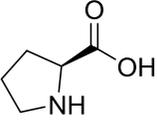
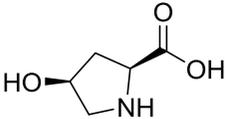
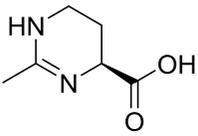
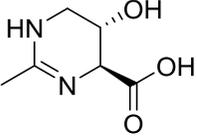
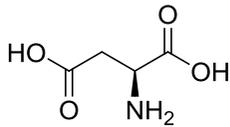
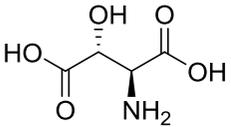


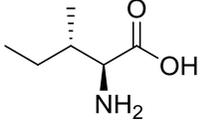
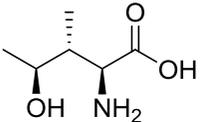
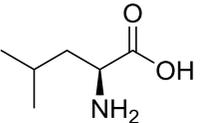
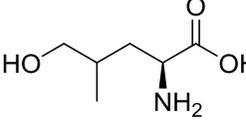
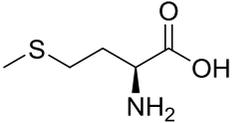
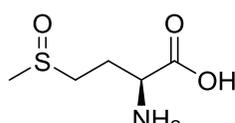
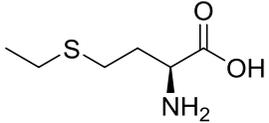
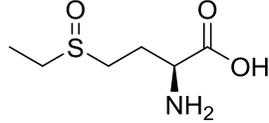
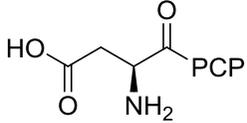
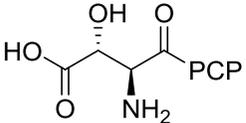
Schéma 49 : biosynthèse de la pénicilline N (**151**) et de la désacétoxycéphalosporine C (**153**)

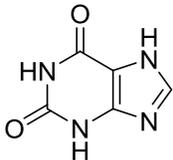
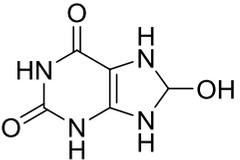
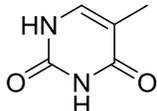
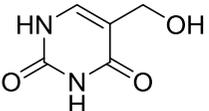
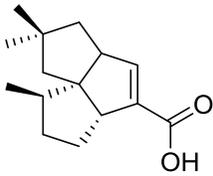
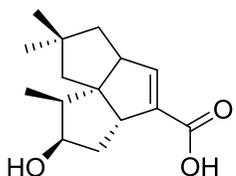
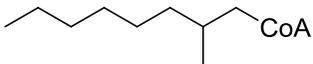
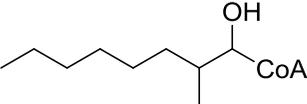
## II.3- Diversité de substrats

Les  $\alpha$ -KAO catalysent la transformation de substrats de structures très variées. Cela s'explique par la grande diversité des rôles biologiques joués par les  $\alpha$ -KAO. Les acides aminés et dérivés sont les substrats le plus souvent retrouvés mais des  $\alpha$ -KAO catalysent également l'hydroxylation de substrats tels que des terpènes, des bases azotés ou encore des polysaccharides. Dans le tableau suivant, seront présentés, de manière non exhaustive, des exemples de chaque type de substrats.

<sup>91</sup>Hamed, R. B.; Gomez-Castellanos, J. R.; Henry, L.; Ducho, C.; McDonough, M. A.; Schofield, C. J., *Natural product reports* **2013**, 30 (1), 21-107.

Enzyme	Substrat	Produit	Code UniprotKB	Organisme	Référence
VioC	L-arginine ( <b>136</b> )	(3 <i>S</i> )-3-hydroxy-L-arginine ( <b>137</b> )	Q6WZB0	<i>Streptomyces vinaceus</i>	86
AsnO	L-asparagine ( <b>134</b> )	(3 <i>S</i> )-3-hydroxy-L-asparagine ( <b>135</b> )	Q9Z4Z5	<i>Streptomyces coelicolor</i> (strain ATCC BAA-471)	85
MppO	L-enduracididine ( <b>139</b> )	(3 <i>R</i> )-3-hydroxy-L-enduracididine ( <b>140</b> )	Q6QUY7	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> NRRL 30439	87
MIP4H	 L-proline ( <b>154</b> )	 (4 <i>S</i> )-4-hydroxy-L-proline ( <b>155</b> )	Q989T9	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	92
EctD/ThpD	 ectoïne ( <b>156</b> )	 (5 <i>S</i> )-5-hydroxyectoïne ( <b>157</b> )	Q6QUY7	<i>Streptomyces anulatus</i> ( <i>Streptomyces chrysomallus</i> )	93
AspH	 acide L-aspartique ( <b>158</b> )	 acide (3 <i>R</i> )-3-hydroxy-L-aspartique ( <b>159</b> )	Q4ZW40	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (strain B728a)	88

Enzyme	Substrat	Produit	Code UniprotKB	Organisme	Référence
IDO	 L-isoleucine ( <b>160</b> )	 (4S)-4-hydroxy-L-isoleucine ( <b>161</b> )	E2GIN1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	94
LdoA	 L-leucine ( <b>162</b> )	 5-hydroxy-L-leucine ( <b>163</b> )	B2J686	<i>Nostoc punctiforme</i>	95
LdoA	 L-methionine ( <b>164</b> )	 L-methionine sulfoxide ( <b>165</b> )	B2J686	<i>Nostoc punctiforme</i>	96
LdoA	 L-ethionine ( <b>166</b> )	 L-ethionine sulfoxide ( <b>167</b> )	B2J686	<i>Nostoc punctiforme</i>	96
P4HA1	L-prolyl	4-hydroxy-L-prolyl	P13674	<i>Homo sapiens</i>	80
LH	L-lysil	5-hydroxy-L-lysil	Q02809	<i>Homo sapiens</i>	81
SyrP	 aspartyl-PCP	 (3R)-hydroxyaspartyl-PCP	Q4ZW40	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (strain B728a)	88

Enzyme	Substrat	Produit	Code UniprotKB	Organisme	Référence
TMLH	<i>N</i> $\epsilon$ -triméthyl-L-lysine (127)	<i>N</i> $\epsilon$ -triméthyl-3-hydroxy-L-lysine (128)	Q91ZW6	Rat	97
XanA	 xanthine (168)	 8-hydroxyanthine (169)	C8VSZ2	<i>Aspergillus nidulans</i>	98
TH	 thymine (170)	 5-hydroxythymine (171)	Q7RYZ9	<i>Neurospora crassa</i> STA-4 (FGSC 262A)	99
PtIH	 acide 1-déoxy-pentalénique (172)	 acide (2 <i>R</i> )-hydroxy-1-déoxypentalénique (173)	Q82IZ1	<i>Streptomyces avermitilis</i>	100
PHAX	 3-methylnonanoylCoA (174)	 2-hydroxy-3-methylnonanoylCoA (175)		<i>Homo sapiens</i>	101

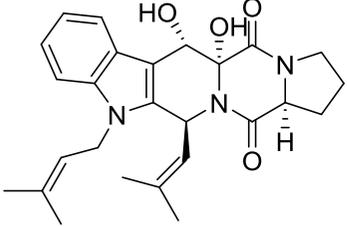
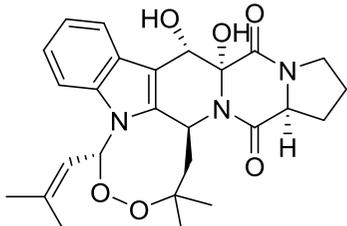
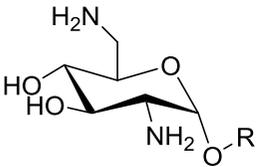
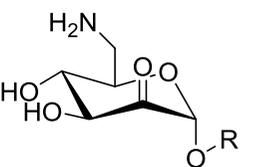
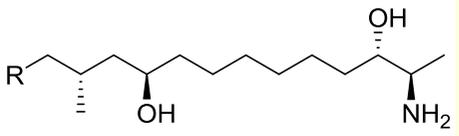
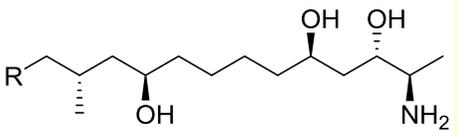
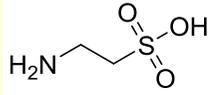
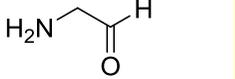
Enzyme	Substrat	Produit	Code UniprotKB	Organisme	Référence
FtmOx1	 <p>fumitremorgin B (176)</p>	 <p>verruculogen (177)</p>		<i>Aspergillus fumigatus</i>	102
KanJ	 <p>kanamycine B (178)</p>	 <p>dérivé de la kanamycine B (179)</p>	Q6L732	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	103
Fum3P	 <p>fumonisine B<sub>3</sub> (180)</p>	 <p>fumonisine B<sub>1</sub> (181)</p>	Q9HGD7	<i>Fusarium verticillioides</i>	104
H6H	3-hydroxyhyoscyamine (132)	scopolamine (133)	Q9XJ43	<i>Atropa belladonna</i>	105
TauD	 <p>taurine (182)</p>	 <p>2-aminoacetaldehyde (183)</p>	P37610	<i>Escherichia Coli</i>	106

Tableau 3 : diversité de substrats des  $\alpha$ -KAO

- <sup>80</sup>Myllyharju, J., *Matrix Biol* **2003**, 22 (1), 15-24.
- <sup>81</sup>Suokas, M.; Lampela, O.; Juffer, A. H.; Myllyla, R.; Kellokumpu, S., *Biochem J* **2003**, 370 (Pt 3), 913-20.
- <sup>85</sup>Strieker, M.; Kopp, F.; Mahlert, C.; Essen, L. O.; Marahiel, M. A., *ACS Chem Biol* **2007**, 2 (3), 187-96.
- <sup>86</sup>Helmetag, V.; Samel, S. A.; Thomas, M. G.; Marahiel, M. A.; Essen, L. O., *Febs J* **2009**, 276 (13), 3669-82.
- <sup>87</sup>Haltli, B.; Tan, Y.; Magarvey, N. A.; Wagenaar, M.; Yin, X.; Greenstein, M.; Hucul, J. A.; Zabriskie, T. M., *Chemistry & biology* **2005**, 12 (11), 1163-1168.
- <sup>88</sup>Singh, G. M.; Fortin, P. D.; Koglin, A.; Walsh, C. T., *Biochemistry* **2008**, 47 (43), 11310-20.
- <sup>92</sup>Hara, R.; Kino, K., *Biochemical and biophysical research communications* **2009**, 379 (4), 882-6.
- <sup>93</sup>Prabhu, J.; Schauwecker, F.; Grammel, N.; Keller, U.; Bernhard, M., *Applied and environmental microbiology* **2004**, 70 (5), 3130-2.
- <sup>94</sup>Hibi, M.; Kawashima, T.; Kodera, T.; Smirnov, S. V.; Sokolov, P. M.; Sugiyama, M.; Shimizu, S.; Yokozeki, K.; Ogawa, J., *Applied and environmental microbiology* **2011**, 77 (19), 6926-30.
- <sup>95</sup>Hibi, M.; Kawashima, T.; Sokolov, P. M.; Smirnov, S. V.; Kodera, T.; Sugiyama, M.; Shimizu, S.; Yokozeki, K.; Ogawa, J., *Applied microbiology and biotechnology* **2013**, 97 (6), 2467-72.
- <sup>96</sup>Hibi, M.; Kawashima, T.; Yajima, H.; Smirnov, S. V.; Kodera, T.; Sugiyama, M.; Shimizu, S.; Yokozeki, K.; Ogawa, J., *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, 24 (17), 990-994.
- <sup>97</sup>Vaz, F. M.; Ofman, R.; Westinga, K.; Back, J. W.; Wanders, R. J., *J Biol Chem* **2001**, 276 (36), 33512-7.
- <sup>98</sup>Montero-Moran, G. M.; Li, M.; Rendon-Huerta, E.; Jourdan, F.; Lowe, D. J.; Stumpff-Kane, A. W.; Feig, M.; Scazzocchio, C.; Hausinger, R. P., *Biochemistry* **2007**, 46 (18), 5293-304.
- <sup>99</sup>Bankel, L.; Holme, E.; Lindstedt, G.; Lindstedt, S., *FEBS Letters* **1972**, 21 (2), 135-138.
- <sup>100</sup>You, Z.; Omura, S.; Ikeda, H.; Cane, D. E.; Jogl, *GJ Biol Chem* **2007**, 282 (50), 36552-60.
- <sup>101</sup>Foulon, V.; Asselberghs, S.; Geens, W.; Mannaerts, G. P.; Casteels, M.; Van Veldhoven, P. P., *J Lipid Res* **2003**, 44 (12), 2349-55.
- <sup>102</sup>Steffan, N.; Grundmann, A.; Afiyatullof, S.; Ruan, H.; Li, S. M., *Org Biomol Chem* **2009**, 7 (19), 4082-7.
- <sup>103</sup>Sucipto, H.; Kudo, F.; Eguchi, T., *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, 51 (14), 3428-31.
- <sup>104</sup>Ding, Y.; Bojja, R. S.; Du, *Applied and environmental microbiology* **2004**, 70 (4), 1931-4.
- <sup>105</sup>Li, J.; van Belkum, M. J.; Vederas, J. C., *Bioorg Med Chem* **2012**, 20 (14), 4356-63.
- <sup>106</sup>Eichhorn, E.; van der Ploeg, J. R.; Kertesz, M. A.; Leisinger, T., *J Biol Chem* **1997**, 272 (37), 23031-6.

## II.4- Structures

### II.4.1- Séquence nucléotidique

En dehors des  $\alpha$ -KAO impliquées dans la synthèse de peptides non ribosomiaux, qui ont des pourcentages d'identité pouvant aller jusqu'à environ 60%, les séquences protéiques des  $\alpha$ -KAO se ressemblent peu. En effet, une étude réalisée avec deux  $\alpha$ -KAO, MppO<sup>87</sup> et XanA<sup>98</sup> comparant la séquence nucléotidique de ces deux enzymes avec les séquences nucléotidiques de 12 autres  $\alpha$ -KAO par Blast® (Tableau 4) a montré que les homologies de séquences sont relativement faibles et toujours inférieures à 30%.

Enzymes	pourcentage d'homologie	
	MppO	XanA
MppO	100%	15%
XanA	15%	100%
TH	11%	12%
GA3 hydroxylase	10%	11%
KanJ	15%	14%
TauD	12%	17%
EctD	15%	10%
P4H	13%	14%
TMLH	15%	13%
H6H	13%	15%
FtmOx1	12%	9%
CAS	25%	16%
AsnO	27%	17%
VioC	27%	15%

Tableau 4 : pourcentage d'identité de 14  $\alpha$ -KAO

### II.4.2- Structure 3D

L'étude cristallographique des  $\alpha$ -KAO cristallisées<sup>85,86,107</sup> a mis en évidence, pour les protéines étudiées, une structure commune de type « jelly-roll core », composée de huit

<sup>85</sup>Strieker, M.; Kopp, F.; Mahlert, C.; Essen, L. O.; Marahiel, M. A., *ACS Chem Biol* **2007**, 2 (3), 187-96.

<sup>86</sup>Helmetag, V.; Samel, S. A.; Thomas, M. G.; Marahiel, M. A.; Essen, L. O., *Febs J* **2009**, 276 (13), 3669-82.

<sup>87</sup>Haltli, B.; Tan, Y.; Magarvey, N. A.; Wagenaar, M.; Yin, X.; Greenstein, M.; Hucul, J. A.; Zabriskie, T. M., *Chemistry & biology* **2005**, 12 (11), 1163-1168.

<sup>98</sup>Montero-Moran, G. M.; Li, M.; Rendon-Huerta, E.; Jourdan, F.; Lowe, D. J.; Stumpff-Kane, A. W.; Feig, M.; Scazzocchio, C.; Hausinger, R. P., *Biochemistry* **2007**, 46 (18), 5293-304.

<sup>107</sup>Zhang, Z.; Ren, J.; Harlos, K.; McKinnon, C. H.; Clifton, I. J.; Schofield, C. J., *FEBS Lett* **2002**, 517 (1-3), 7-12.

feuillet  $\beta$  et d'une triade faciale de deux histidines et d'un carboxylate (glutamate ou aspartate) pour la bonne coordination du fer. Une superposition des enzymes CAS, VioC et AsnO identiques à 33%, montre qu'en dépit d'une faible identité de séquence, ces enzymes possèdent des structures tertiaires très similaires (Figure 17).

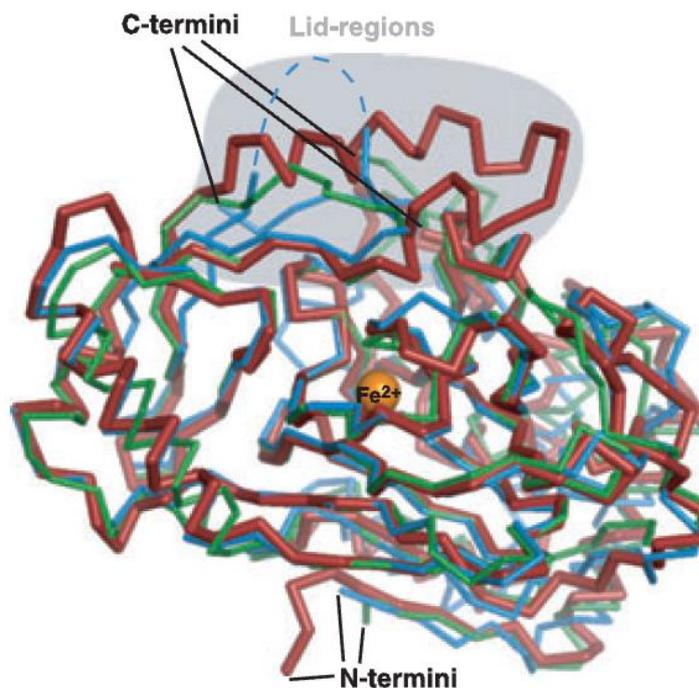


Figure 17 (tirée de ref[86]) : superposition des structures cristallographiques de CAS (bleu), VioC (rouge) et AsnO (vert)

Les sites actifs semblent par contre très spécifiques à chaque enzyme. Par exemple, pour VioC, deux résidus (Gln137 et Glu170) forment une liaison hydrogène et un pont salin avec l'amine  $\alpha$  du substrat, la L-arginine. Pour la fonction acide, un pont salin est établi avec l'Arg334. Le noyau guanidinium est fixé par deux ponts salins avec deux résidus aspartate (Asp268 et Asp270) (Figure 18). La coordination de la L-arginine dans le site actif avec cinq résidus différents explique la très forte sélectivité de substrat observée pour cette enzyme. AnsO possède également de nombreux résidus pour la fixation du substrat, ce que explique que seule la L-asparagine est acceptée.

<sup>86</sup>Helmetag, V.; Samel, S. A.; Thomas, M. G.; Marahiel, M. A.; Essen, L. O., *Febs J* **2009**, 276 (13), 3669-82.

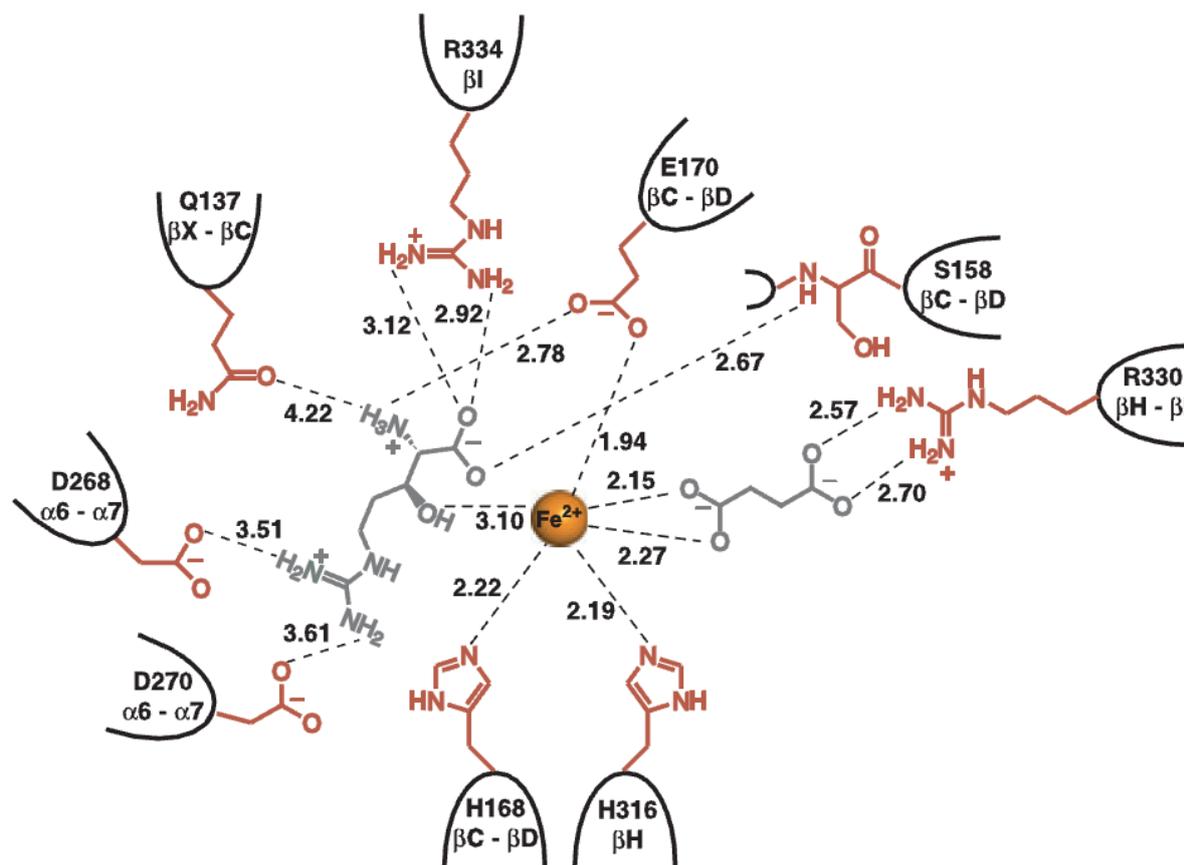


Figure 18 (tirée de ref[86]) : modélisation de la L-arginine dans le site actif de VioC

Pour AsnO et VioC, un phénomène de protection du substrat lors de la catalyse a été observé. En effet, après la fixation du substrat dans le site actif, un changement de conformation de l'enzyme s'effectue pour couvrir et protéger le substrat. Une co-cristallisation avec le produit formé par VioC a permis de montrer que le couvercle se désorganisait une fois la réaction terminée.

## II.5- Mécanisme

Le mécanisme d'oxydation des  $\alpha$ -KAO a été longtemps discuté, notamment sur le mode d'activation de l'oxygène moléculaire. Le mécanisme proposé par Hausinger *et al.* en 2008<sup>108</sup> semble le plus cohérent. En l'absence de substrat, le fer est hexacoordiné par trois molécules d'eau et la triade faciale, généralement deux histidines et un acide aspartique ou glutamique selon un motif His-Asp ou Glu-X<sub>n</sub>-His (A).

<sup>86</sup>Helmetag, V.; Samel, S. A.; Thomas, M. G.; Marahiel, M. A.; Essen, L. O., *Febs J* **2009**, 276 (13), 3669-82.

<sup>108</sup>Simmons, J. M.; Muller, T. A.; Hausinger, R. P., *Dalton Trans* **2008**, 14 (38), 5132-42.

L' $\alpha$ -cétoglutarate déplace deux molécules d'eau et coordine le fer(II) avec les oxygènes des carbones C1 et C2 (B). L'arrivée du substrat provoque le départ de la dernière molécule d'eau et permet la création d'un site de fixation pour l'oxygène moléculaire (C). L'oxygène réagit pour former un complexe Fe(III)-superoxo (D) et la décarboxylation oxydative de l' $\alpha$ -cétoglutarate en succinate (E) permet la formation d'un intermédiaire Fe(IV)-oxo capable d'arracher un proton d'un carbone non activé du substrat (F). Le groupement hydroxyle réagit avec le radical formé, ce qui permet l'hydroxylation du substrat et le retour au fer(II) (A) (Schéma 50).

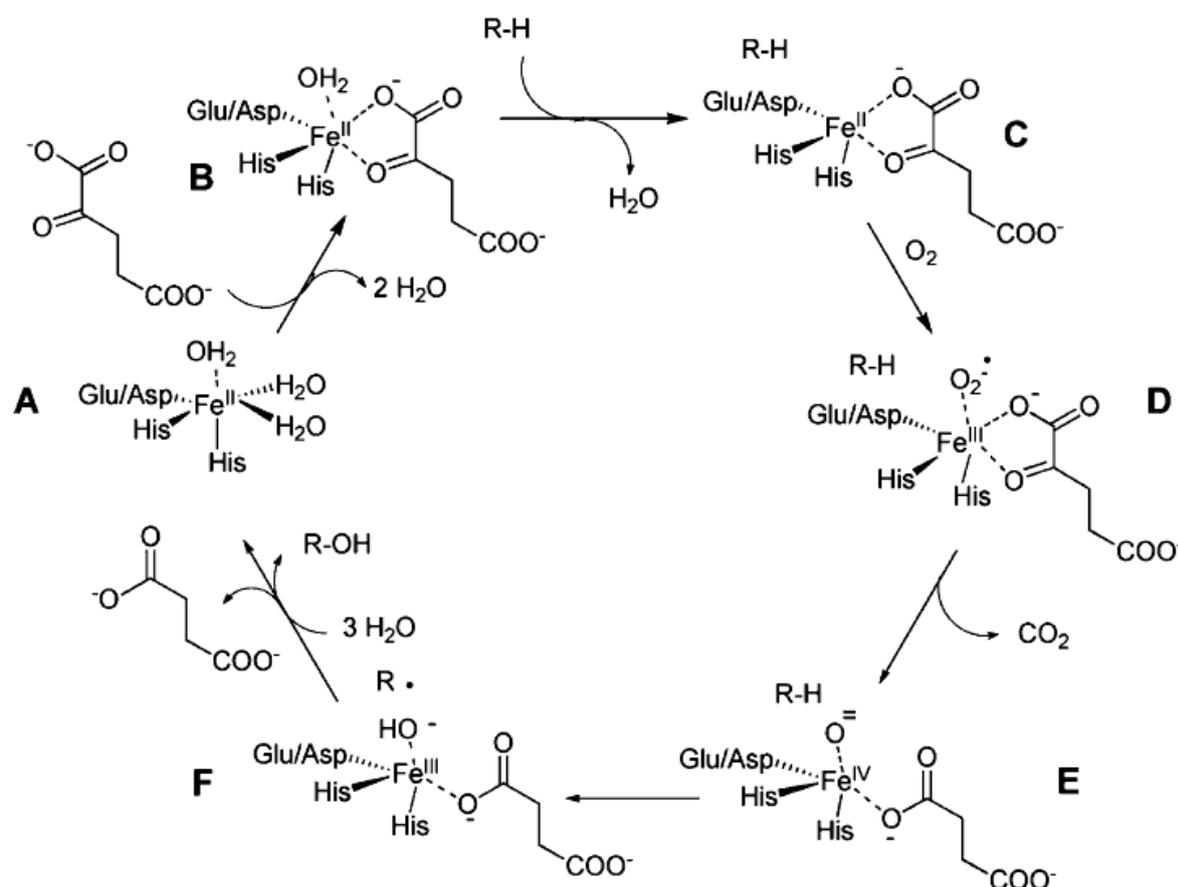


Schéma 50 (tiré de ref[108]) : mécanisme général des  $\alpha$ -KAO

## II.6- Les $\alpha$ -KAO en biocatalyse

La diversité de réactions et de substrats observée lors des paragraphes précédents, l'absence de réductase associée et de cofacteurs onéreux font, à première vue, des  $\alpha$ -KAO de bons

<sup>108</sup>Simmons, J. M.; Muller, T. A.; Hausinger, R. P., *Dalton Trans* **2008**, 14 (38), 5132-42.

candidats pour le développement d'applications en biocatalyse. Cependant, le nombre encore faible d' $\alpha$ -KAO caractérisées, la spécificité de substrat observée chez certaines d'entre elles peuvent être un frein à leur exploitation. Cela peut expliquer qu'il n'existe aujourd'hui que peu d'exemples d'applications développées en biocatalyse des  $\alpha$ -KAO.

Néanmoins, on retrouve tout de même quelques exemples intéressants comme la production de trois des quatre isomères issus de l'hydroxylation de la L-proline (**154**) réalisée sur organisme entier, avec l' $\alpha$ -KAO surexprimée, avec une production allant jusqu'à 68 g/L et avec des rendements de 100% (Schéma 51)<sup>109</sup>

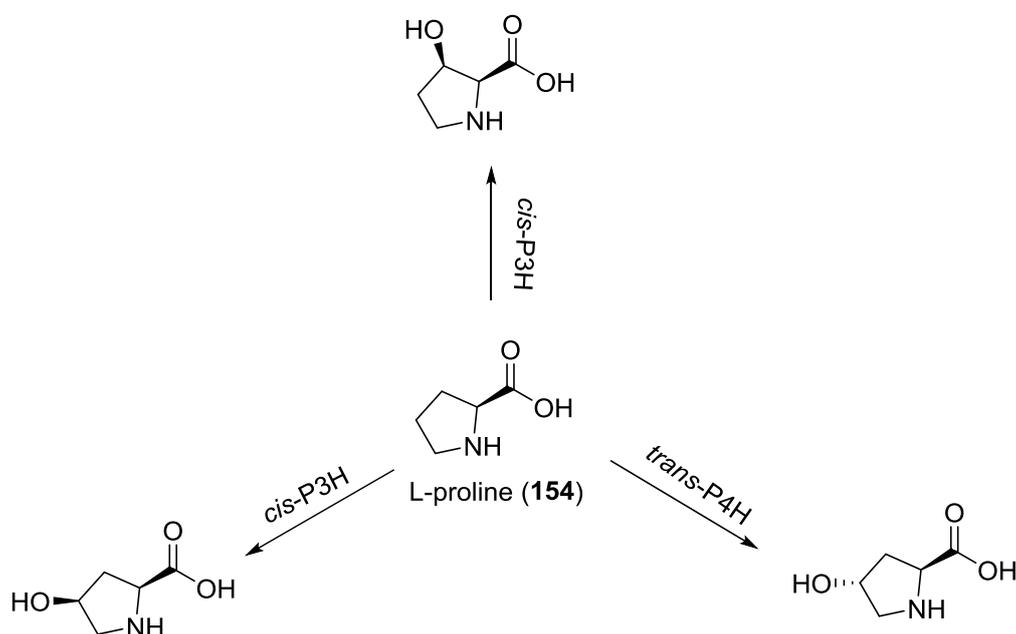


Schéma 51 : hydroxylation de la L-proline

De plus, les prolines hydroxylases acceptent d'autres substrats que la L-proline<sup>110</sup>, notamment des homologues supérieurs et inférieurs, ce qui conduit à la production de synthons chiraux intéressants (Figure 19).

<sup>109</sup>Ozaki, A., 6,617,140 B2, 2003.

<sup>110</sup>Hüttel, W., *Chemie Ingenieur Technik* 2013, 85 (6), 809-817.

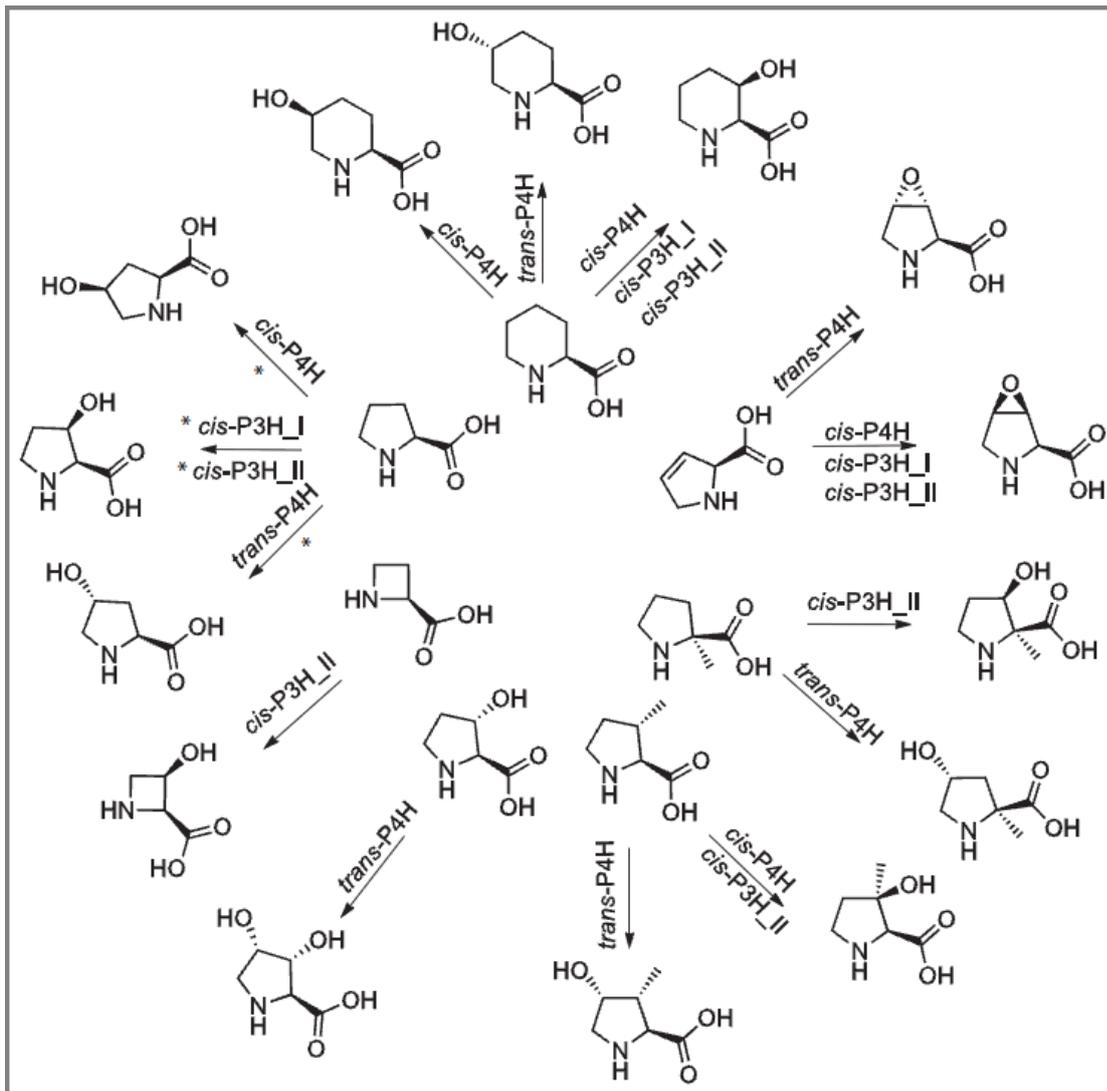


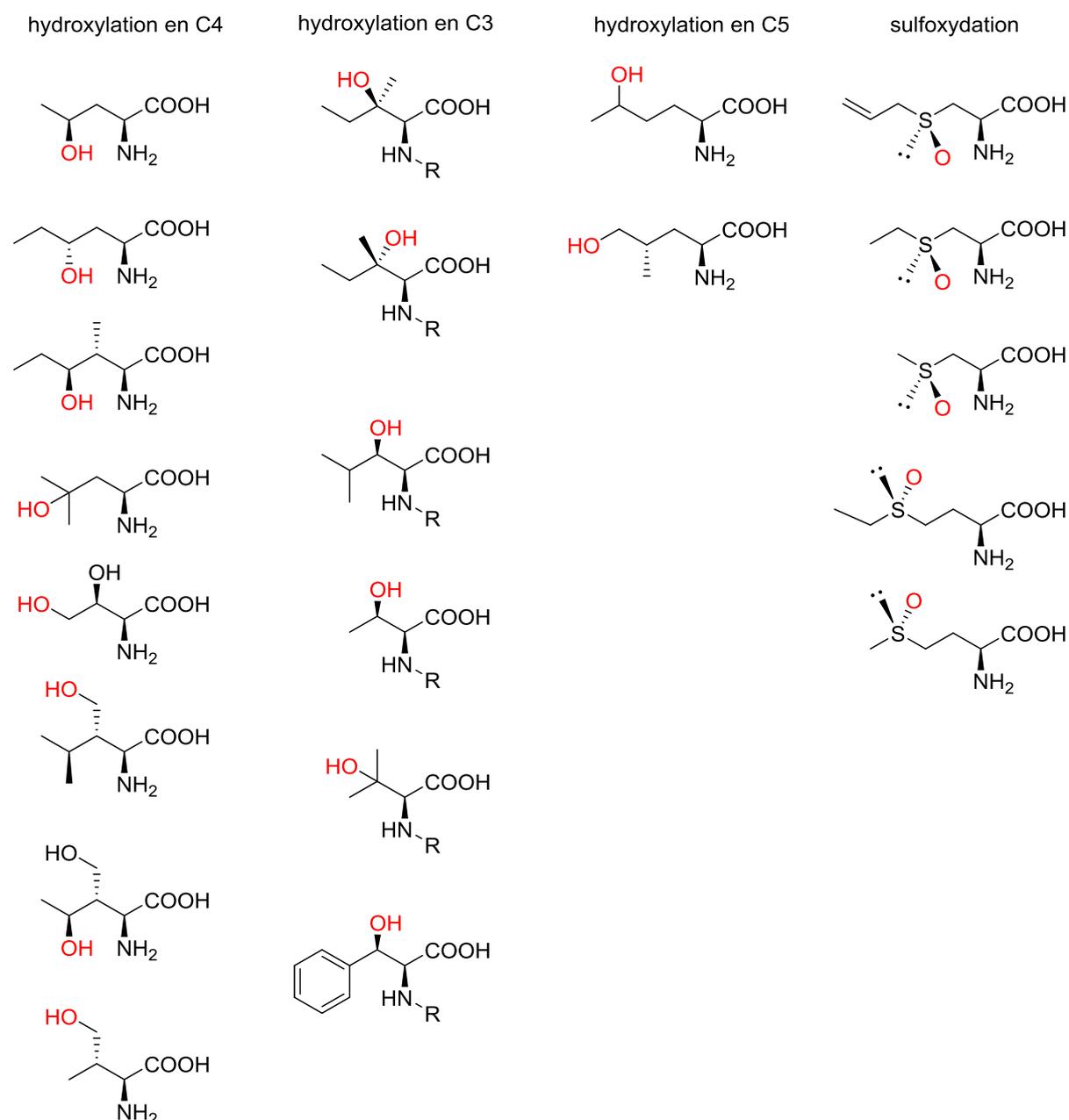
Figure 19 (tirée de [110]) : promiscuité de substrats des L-proline hydroxylases

On peut citer quelques autres exemples de production de composés hydroxylés à partir d' $\alpha$ -KAO à l'échelle semi-préparative, même s'il ne s'agit pas dans ces cas-là de production pour le développement d'applications mais pour la caractérisation du produit. Hibi *et al.* ont par exemple publié une gamme de produits issue de l'oxydation d'acides aminés apolaires (Figure 20). Ils ont dans un premier temps effectué un criblage et trouver l'enzyme IDO<sup>94</sup> catalysant l'hydroxylation de la L-isoleucine. Ils ont ensuite cherché des  $\alpha$ -KAO par homologie de séquence à partir d'IDO et trouvé plusieurs enzymes catalysant l'hydroxylation en C3, C4 et

<sup>94</sup>Hibi, M.; Kawashima, T.; Kodera, T.; Smirnov, S. V.; Sokolov, P. M.; Sugiyama, M.; Shimizu, S.; Yokozeki, K.; Ogawa, J., *Applied and environmental microbiology* **2011**, 77 (19), 6926-30.

<sup>110</sup>Hüttel, W., *Chemie Ingenieur Technik* **2013**, 85 (6), 809-817.

C5 d'acides aminés naturels et non-naturels tels que l'isoleucine, l'acide (S)-2-aminohexanoïque. La sulfoxydation d'acides aminés naturels et non naturels a également été réalisée<sup>95-96,111</sup>.



## II.7- L'enjeu et les axes d'études

Ce travail a pour objectif principal de trouver de nouvelles enzymes oxydatives appartenant à la famille des dioxygénases  $\alpha$ -cétoglutarate et fer dépendantes et de les exploiter en chimie organique. Cette famille catalyse comme on l'a vu précédemment, en présence d' $\alpha$ -cétoglutarate, d'oxygène moléculaire et d'une source de Fer(II), la réaction d'hydroxylation de manière régio- et stéréosélective d'un substrat sur une position non activée et possède l'avantage de ne pas avoir besoin d'une réductase et de cofacteurs onéreux.

Au jour d'aujourd'hui, les dioxygénases  $\alpha$ -cétoglutarate et fer dépendantes sont très peu exploitées à l'échelle industrielle. Cela peut s'expliquer par le petit nombre d'activités dioxygénases connues. Ce travail s'inscrit dans la poursuite de la découverte de cette famille et son exploitation en chimie organique pour la production de blocs de construction chiraux.

La recherche de nouvelles  $\alpha$ -KAO se fera selon une approche génomique basée sur l'homologie de séquence et le partage d'un motif InterPro. Les enzymes candidates seront testées sur un panel de substrats incluant des substrats métaboliques mais également des substrats, préalablement synthétisés ou commerciaux, précurseurs de produits hydroxylés d'intérêt et exploitables par le chimiste organicien tels que des dérivés  $\beta$ -hydroxylamines. Les nouvelles enzymes découvertes seront ensuite étudiées et les produits formés isolés et caractérisés.

## **Chapitre III**

# **Criblage haut débit pour la recherche de nouvelles $\alpha$ -KAO**



## Chapitre III

# Criblage haut débit pour la recherche de nouvelles $\alpha$ -KAO

### III.1- Introduction

L'utilisation des  $\alpha$ -KAO pour des applications en biocatalyse est à ce jour assez limitée<sup>109</sup>, certainement à cause du peu d' $\alpha$ -KAO caractérisées. Cependant, les  $\alpha$ -KAO catalysant la réaction d'hydroxylation d'une liaison Csp<sup>3</sup>-H non activée de manière régio- et stéréospécifique, leur exploitation en biocatalyse constituerait un très bon moyen d'accès à des synthons chiraux valorisables, par exemple pour la synthèse de molécules plus complexes. Découvrir de nouvelles activités dioxygénases  $\alpha$ -cétoglutarate et fer dépendantes et augmenter la diversité des substrats acceptés par cette famille d'enzyme est donc primordial pour son développement dans le domaine de la biocatalyse.

Trois approches sont utilisées aujourd'hui pour la découverte de nouvelles activités enzymatiques<sup>112</sup>.

La première consiste à explorer la biodiversité enzymatique des nombreux génomes séquencés avec plus de 33 millions de séquences de protéines disponibles et issues de plus de 29000 organismes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>). Des outils de bio-informatique tels que les logiciels de comparaisons de séquences (Blast®) ou de détections de motifs protéiques spécifiques d'une famille d'enzyme (Interpro®) permettent à partir d'enzymes déjà connues et référencées dans les bases de données (UniprotKB) d'identifier des nouvelles enzymes potentielles (Figure 21-A).

---

<sup>109</sup>Ozaki, A., 6,617,140 B2, 2003.

<sup>112</sup>Behrens, G. A.; Hummel, A.; Padhi, S. K.; Schätzle, S.; Bornscheuer, U. T., *Advanced Synthesis & Catalysis* **2011**, 353 (13), 2191-2215.

La deuxième consiste à travailler sur des enzymes dont l'activité est connue et caractérisée. L'enzyme est modifiée pour l'amener à, 1) améliorer son activité catalytique<sup>113</sup> ; 2) prendre en charge un nouveau type de substrat<sup>114</sup> (étendre ses capacités catalytiques) ; 3) catalyser une réaction différente de son activité connue<sup>115</sup>. Les méthodes d'ingénierie sont rationnelles, mutations dirigées affectant un ou plusieurs résidus ciblés, ou aléatoires, DNA shuffling, error prone PCR etc ...<sup>116,117</sup> (Figure 21-B).

La troisième approche consiste à créer *de novo* un site actif idéal pour une réaction enzymatique donnée<sup>118,119</sup>. Un docking du site actif dans des structures de protéines déjà connues est ensuite effectué et une nouvelle protéine est choisie selon la géométrie catalytique, la stabilisation du site actif et la complémentarité entre la poche créée et le site actif (Figure 21-C)

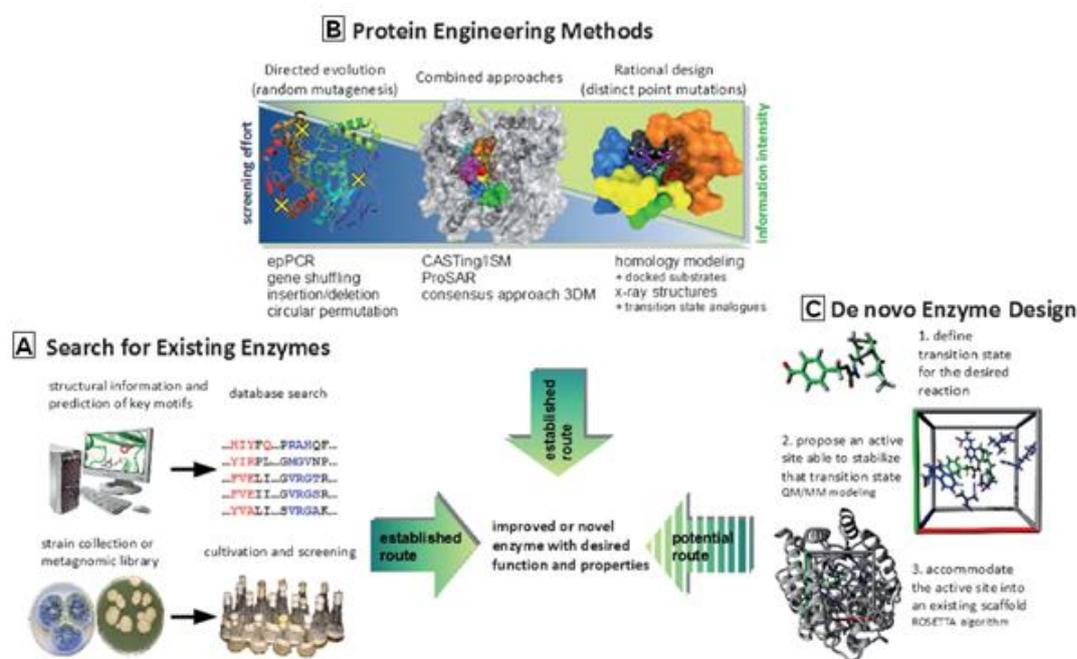


Figure 21 (tirée de ref[112]) : stratégies possibles pour la découverte de nouvelles enzymes

<sup>112</sup>Behrens, G. A.; Hummel, A.; Padhi, S. K.; Schätzle, S.; Bornscheuer, U. T., *Advanced Synthesis & Catalysis* **2011**, 353 (13), 2191-2215. <sup>113</sup>Zhang, J.-H.; Dawes, G.; Stemmer, W. P. C., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, 94 (9), 4504-4509.

<sup>114</sup>Yip, S. H.-C.; Foo, J.-L.; Schenk, G.; Gahan, L. R.; Carr, P. D.; Ollis, D. L., *Protein Engineering Design and Selection* **2011**, 24 (12), 861-872.

<sup>115</sup>McIntosh, J. A.; Coelho, P. S.; Farwell, C. C.; Wang, Z. J.; Lewis, J. C.; Brown, T. R.; Arnold, F. H., *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, 52 (35), 9309-9312.

<sup>116</sup>Bloom, J. D.; Meyer, M. M.; Meinhold, P.; Otey, C. R.; MacMillan, D.; Arnold, F. H., *Current Opinion in Structural Biology* **2005**, 15 (4), 447-452.

<sup>117</sup>streiner 2012.

<sup>118</sup>Hilvert, D., Design of protein catalysts. *Annu Rev Biochem* **2013**, 82, 447-70.

<sup>119</sup>Kries, H.; Blomberg, R.; Hilvert, D., *Current Opinion in Chemical Biology* **2013**, 17 (2), 221-228

Au Genoscope, notre approche est basée sur l'exploration rationnelle et systématique de la biodiversité enzymatique naturelle. En effet, le Genoscope possède les outils nécessaires pour réaliser ce type de projet :

- un savoir-faire en bio-informatique, pour l'analyse des bases de données de séquences protéiques, la sélection des séquences candidates représentatives de la biodiversité enzymatique,
- une souchothèque d'environ 700 souches et un métagénome séquencé au Genoscope provenant de la station d'épuration d'Evry (projet « Cloaca Maxima ») source pour la recherche des séquences candidates,
- une plateforme de clonage et de criblage (Laboratoire de Clonage et de Criblage des Activités de Bioconversion (LCAB)), pour la production et le criblage des enzymes candidates.

### III.2- Sélection et production des enzymes candidates

#### III.2.1- Approche génomique

##### III.2.1.a- Présentation générale

L'approche génomique consiste dans un premier temps à établir pour la famille d'enzymes étudiée un set de référence, c'est-à-dire un récapitulatif des activités enzymatiques connues et prouvés expérimentalement dans cette famille. Les séquences des gènes correspondant à ces enzymes sont comparées, à l'aide du logiciel de comparaison BLAST®, à l'ensemble des séquences répertoriées dans la base UniprotKB. Les séquences possédant un seuil d'identité supérieur à 30% sur 80% de la longueur avec au moins une séquence issue du set de référence sont sélectionnées. Cette méthode permet de s'affranchir des ambiguïtés ou inexactitudes dues au processus automatique d'annotation des génomes. Un regroupement de ces séquences est effectué en fonction leur pourcentage d'homologie de manière à créer des groupes, aussi appelés des clusters, d'enzymes considérées comme « iso-fonctionnelles », *i.e.* catalysant la même réaction enzymatique. Le critère de regroupement au sein d'un même cluster est fixé à un pourcentage d'identité égal ou supérieur à 80%. Avec ce système de clusterisation, il arrive que des séquences n'entrent dans aucun groupe et se retrouvent en « singleton ». Ces séquences sont alors proposées au criblage systématiquement. L'étape suivante consiste à choisir des représentants de chaque cluster (Schéma 52).

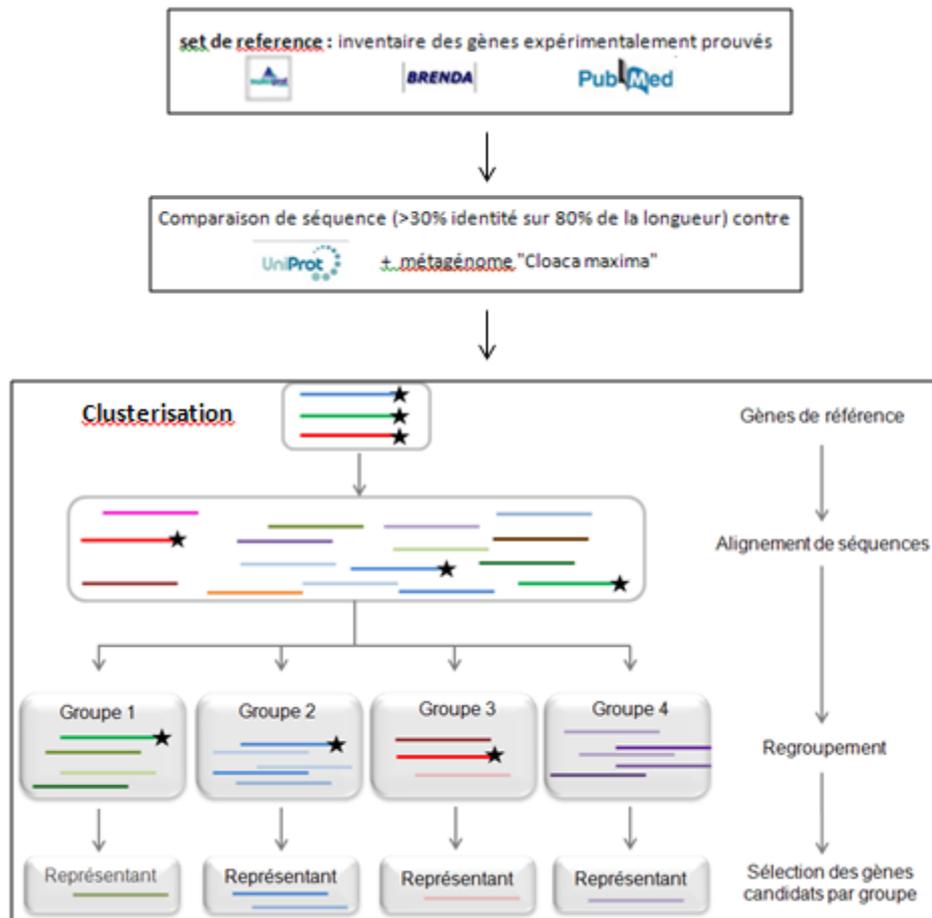


Schéma 52 : concept de sélection d'enzymes via une approche génomique

En parallèle, une analyse cette fois-ci réalisée uniquement sur la base des motifs protéiques InterPro des séquences du set de référence est réalisée. L'ensemble des séquences possédant ces motifs InterPro, quel que soit leur annotation et leur pourcentage d'identité avec un membre de la famille d'enzyme, est clustérisé sur la base des mêmes critères que dans l'analyse précédente.

### III.2.1.b- Sélection des enzymes candidates

Au cours de ce projet, deux criblages ont été effectués, à partir de deux sélections et productions d'enzymes différentes.

#### III.2.1.b.1- Sélection des enzymes candidates pour le premier criblage

Le premier set de référence établi a été limité aux activités dioxygénases sur des acides aminés ou des substrats analogues et contient seulement 10 enzymes (Tableau 5). La

sélection par homologie de séquences effectuées avec Blast® à partir du set de référence a permis de trouver 580 séquences.

Enzymes	Substrats	UniprotKB	Organismes	Références
MppO	L-Enduracididine	Q643C1	<i>S. hygroscopicus</i> NRRL 30439	87
VioC	L-Arginine	Q6WZB0	<i>S. vinaceus</i> ATCC 11861	86
AsnO	L-Asparagine	Q9Z4Z5	<i>S. coelicolor</i> A3 (DSM 40783)	85
KtzO	Glu-PCP	A8CF77	<i>Actinomycete kutzneria</i> sp. 744	120
KtzP	Glu-PCP	A8CF76	<i>Actinomycete kutzneria</i> sp. 744	120
SyrP	L-Asp-S	Q4ZT71	<i>P. syringae</i> pv syringae B728a	88
MIP4H	L-Proline	Q989T9	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	92
SmP4H	L-Proline	Q92LF6	<i>Sinorhizobium meliloti</i> NBRC 14782	92
P4-H	L-Proline	O06499	<i>Dactylosporangium</i> sp. RH1	121
P3-H	L-Proline	O09345	<i>Streptomyces. sp.</i> TH1	121

Tableau 5 : set de référence utilisé pour la première sélection d'enzymes

La sélection par motifs protéiques InterPro des séquences du set de référence (IPR07803 (Aspartyl-Asparaginyl- $\beta$ -hydroxylase); IPR14503 (Clavamate-synthase)) a été réalisée. Cette approche a permis de sélectionner 56 protéines après clustérisation, qui n'avaient pas été sélectionnées par homologie de séquence. Au total, 189 séquences candidates ont été choisies pour le premier criblage.

### III.2.1.b.2- Sélection des enzymes candidates pour le second criblage

Le second set de référence a été établi en incluant les nouvelles  $\alpha$ -KAO découvertes mais également des activités dioxygénases sur des substrats de structures différentes des acides aminés.

<sup>87</sup>Haltli, B.; Tan, Y.; Magarvey, N. A.; Wagenaar, M.; Yin, X.; Greenstein, M.; Hucul, J. A.; Zabriskie, T. M., *Chemistry & biology* **2005**, *12* (11), 1163-1168.

<sup>86</sup>Helmetag, V.; Samel, S. A.; Thomas, M. G.; Marahiel, M. A.; Essen, L. O., *Febs J* **2009**, *276* (13), 3669-82.

<sup>85</sup>Strieker, M.; Kopp, F.; Mahler, C.; Essen, L. O.; Marahiel, M. A., *ACS Chem Biol* **2007**, *2* (3), 187-96.

<sup>88</sup>Singh, G. M.; Fortin, P. D.; Koglin, A.; Walsh, C. T., *Biochemistry* **2008**, *47* (43), 11310-20.

<sup>120</sup>Strieker, M.; Nolan, E. M.; Walsh, C. T.; Marahiel, M. A., *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (37), 13523-30.

<sup>92</sup>Hara, R.; Kino, K., *Biochemical and biophysical research communications* **2009**, *379* (4), 882-6.

<sup>121</sup>Shibasaki, T.; Sakurai, W.; Hasegawa, A.; Uosaki, Y.; Mori, H.; Yoshida, M.; Ozaki, A., *Tetrahedron Letters* **1999**, *40* (28), 5227-5230.

Au final, seulement six nouvelles enzymes ont été ajoutées dans le set de référence du second criblage (Tableau 6). Après la sélection comme décrite précédemment, 141 séquences ont été choisies.

Enzymes	Substrats	UniprotKB	Organismes	Références
IDO	L-isoleucine	E2GIN1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	94
EctD	ectoïne	Q2TDY4	<i>Virgibacillus salexigens</i>	122
TMLH	N-Me <sub>3</sub> -L-lysine	Q9NVH6	<i>Homo sapiens</i>	76
DAOCS	isopénicilline N	P11935	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	123
BBOX	$\gamma$ -butyrobétaine	O75936	<i>Homo sapiens</i>	76

Tableau 6 : enzymes ajoutées dans le second set de référence

### III.2.2- Production des enzymes candidates

La production des dioxygénases candidates a été réalisée par le LCAB selon le procédé décrit très brièvement ci-après. L'amplification par PCR des gènes candidats à partir des souches bactériennes correspondantes est réalisée dans des plaques 96 puits. Le clonage est ensuite réalisé dans le plasmide d'expression de protéines selon la méthode de Ligation Independent Cloning développée par Aslanadis et deJong<sup>124</sup> et adapté au LCAB au format 96 puits. Les plasmides contenant les gènes d'intérêt ont ensuite été introduits par transformation dans la bactérie hôte *E.coli* BL21 (Cf. matériels et méthodes). Après induction de l'expression des gènes par l'IPTG et synthèse des protéines, les bactéries ont été lysées et les lysats cellulaires conservés dans des plaques 96 puits à -80 °C (Schéma 53).

<sup>94</sup>Hibi, M.; Kawashima, T.; Kodera, T.; Smirnov, S. V.; Sokolov, P. M.; Sugiyama, M.; Shimizu, S.; Yokozeki, K.; Ogawa, J., *Applied and environmental microbiology* **2011**, 77 (19), 6926-30.

<sup>122</sup>Reuter, K.; Pittelkow, M.; Bursy, J.; Heine, A.; Craan, T.; Bremer, E., *PloS one* **2010**, 5 (5), 0010647.

<sup>76</sup>Leung, I. K. H.; Krojer, T. J.; Kochan, G. T.; Henry, L.; von Delft, F.; Claridge, T. D. W.; Oppermann, U.; McDonough, M. A.; Schofield, C. J., *Chemistry & biology* **2010**, 17 (12), 1316-1324.

<sup>123</sup>Lloyd, M. D.; Lee, H. J.; Harlos, K.; Zhang, Z. H.; Baldwin, J. E.; Schofield, C. J.; Charnock, J. M.; Garner, C. D.; Hara, T.; Terwisscha van Scheltinga, A. C.; Valegard, K.; Viklund, J. A.; Hajdu, J.; Andersson, I.; Danielsson, A.; Bhikhabhai, R., *J Mol Biol* **1999**, 287 (5), 943-60.

<sup>124</sup>Aslanidis, C.; de Jong, P. J., *Nucleic Acids Res* **1990**, 18 (20), 6069-74.

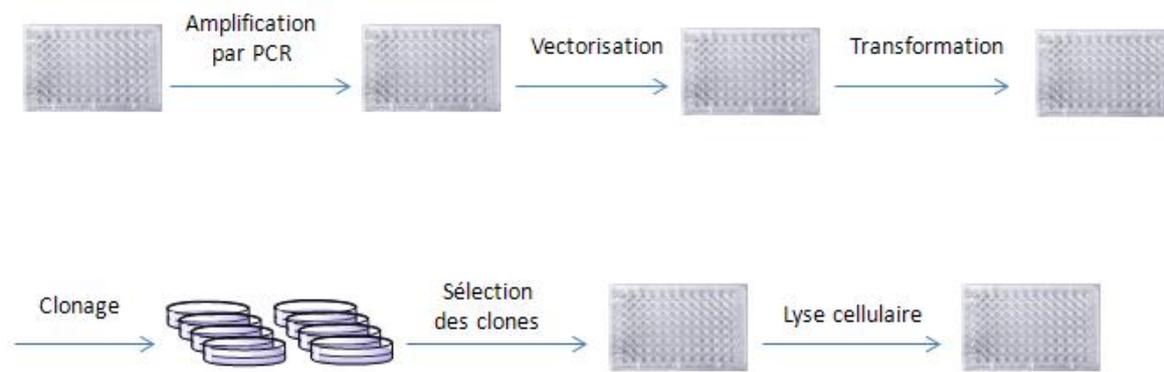


Schéma 53 : production des enzymes

Pour le premier criblage, avec 189 séquences candidates tentées, 76 dioxygénases candidates ont été produites de manière satisfaisante. Le taux d'échec de 60%, s'explique principalement par de mauvais rendements d'amplification par PCR ou par de nombreux gènes possédant un coefficient de Chargaff, *i.e* un pourcentage de guanine et cytosine, très élevé ( $\geq 65\%$ ), dont l'amplification est généralement difficile. La liste des enzymes candidates nommées en fonction de leur position sur la plaque, leur organisme, leur annotation et les numéros de gènes associés sont donnés en annexe 2.

Pour le second criblage, avec 141 séquences candidates, 49 dioxygénases potentielles ont été produites avec un taux d'échec avoisinant les 65%. La liste des enzymes candidates ajoutées lors de ce second criblage, leur organisme, leur annotation et les numéros de gènes associés sont donnés en annexe 3.

### III.3- Choix et mise au point d'un test de détection applicable à un criblage haut débit

Le choix d'un test de détection lors de l'étude d'une activité enzymatique est crucial surtout lorsqu'on envisage un criblage à haut débit. Le test d'activité doit analyser la chimie de la transformation enzymatique et la traduire en un signal détectable, tel qu'un signal lumineux, un changement de couleur de l'échantillon ou par sélection biologique. Un test enzymatique doit être fiable pour qualifier et/ou quantifier l'avancement d'une réaction, étudier si possible les stéréo- et régiosélectivités de l'enzyme ainsi que ses caractéristiques cinétiques et d'affinité ( $K_m$ ,  $k_{cat}$ ,  $V_{max}$ ...). Il faut également prendre en compte, pour l'application à un criblage haut débit, la facilité de mise en œuvre avec une détection rapide et fiable de l'activité mais également la notion d'universalité du test, c'est-à-dire un test indépendant de la nature du substrat ou du produit formé. Plusieurs types de détection sont possibles : la

détection analytique, qui consiste à suivre l'activité à l'aide d'outils analytiques tels que la GC-MS, LC-MS ou la RMN, et qui permet de détecter la disparition d'un substrat ou la formation d'un produit. La détection chimique est une méthode de détection indirecte. Elle met en jeu des composés chimiques qui, par réaction avec un ou le produit formé ou le substrat non transformé conduiront à un changement des propriétés physico-chimiques permettant ainsi la détection<sup>125</sup> (changement de couleur, dégagement gazeux, diminution ou augmentation de l'absorbance UV, etc.). Une alternative peut-être la détection enzymatique couplée, en dosant soit un ou le produit formé soit le substrat non transformé<sup>126</sup>, le plus souvent en mettant en jeu des composés chimiques UV-actifs tel que le NADH.

### III.3.1- Tests déjà utilisés dans la littérature pour le dosage de l'activité dioxycénase

#### III.3.1.a- Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Une seule activité dioxycénase a été étudiée avec suivi dans le temps par RMN<sup>127</sup>. Il s'agit d'une détection des signaux du produit formé à partir d'un substrat bien spécifique. Cette méthode substrat-dépendante et donc non universelle ne sera pas applicable pour un criblage haut débit.

#### III.3.1.b- MS ou LC-MS

Il s'agit d'une méthode plus répandue pour la détection d'activités dioxycénases. Le succinate<sup>128</sup> et le produit hydroxylé<sup>129</sup> peuvent être dosés. Le temps nécessaire à l'analyse des données semble être un frein à l'utilisation de cette technique pour un criblage à haut débit.

#### III.3.1.c- Utilisation de substrats ou produits radioactifs

L'utilisation de 1-<sup>14</sup>C- $\alpha$ -cétoglutarate<sup>130</sup> permet de mesurer l'activité  $\alpha$ -KAO par dosage du <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> formé lors de la réaction. Il est également possible de doser le 4-<sup>14</sup>C-succinate formé lorsque la réaction est effectuée avec du 5-<sup>14</sup>C- $\alpha$ -cétoglutarate<sup>131</sup>. L'utilisation de la

---

<sup>125</sup>Banerjee, A.; Kaul, P.; Sharma, R.; Banerjee, U. C., *J Biomol Screen* **2003**, 8 (5), 559-65.

<sup>126</sup>Suarez, A. S.; Stefan, A.; Lemma, S.; Conte, E.; Hochkoepler, A., *Biotechniques* **2012**, 53 (2), 99-103.

<sup>127</sup>Hopkinson, R. J.; Hamed, R. B.; Rose, N. R.; Claridge, T. D. W.; Schofield, C. J., *ChemBioChem* **2010**, 11 (4), 506-510.

<sup>128</sup>Flashman, E.; Hoffart, L. M.; Hamed, R. B.; Bollinger, J. M., Jr.; Krebs, C.; Schofield, C. J., *Febs J* **2010**, 277 (19), 4089-99.

<sup>129</sup>Flashman, E.; Davies, S. L.; Yeoh, K. K.; Schofield, C. J., *Biochem J* **2010**, 427 (1), 135-42.

<sup>130</sup>Zhang, J.-H.; Qi, R. C. C.; Chen, T.; Chung, T. D. Y.; Stern, A. M.; Hollis, G. F.; Copeland, R. A.; Oldenburg, K. R., *Analytical Biochemistry* **1999**, 271 (2), 137-142.

<sup>131</sup>Kanelakis, K. C.; Palomino, H. L.; Li, L.; Wu, J.; Yan, W.; Rosen, M. D.; Rizzolio, M. C.; Trivedi, M.; Morton, M. F.; Yang, Y.; Venkatesan, H.; Rabinowitz, M. H.; Shankley, N. P.; Barrett, T. D., *J Biomol Screen* **2009**, 14 (6), 627-35.

radioactivité n'a pas été retenue dans la mesure où elle nécessite un équipement spécifique (compteur à scintillation liquide) et de suivre des mesures de sécurité très strictes.

### III.3.1.d- Dérivatisation pour suivi colorimétrique ou UV

Le but est de faire réagir le substrat ou le produit, voire les deux, avec un chromophore ce qui permettra un suivi analytique facile dans l'UV ou le visible. Parmi les agents souvent utilisés, on trouve le dinitrofluorobenzène (FDNB)<sup>132</sup>, qui réagit spécifiquement avec les fonctions amines pour donner un composé détectable avec une absorbance UV. Cette méthode est non universelle et substrat dépendante et n'est donc pas applicable dans le cadre d'un criblage à cause de la diversité des substrats (acide aminé, acide, cétone, amine).

### III.3.1.e- Dosage du succinate

Un test commercial (*Megazyme*®) faisant intervenir trois réactions enzymatiques en cascade permet la détection du succinate formé durant la réaction d'hydroxylation. En présence d'adénosine-5'-triphosphate (ATP), le succinate est converti en succinyl-CoA par l'enzyme *succinyl-CoA synthétase* (SCS) avec formation d'adénosine-5'-diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (Pi) (Schéma xx-1). Ensuite, en présence de *pyruvate kinase* (PK), l'ADP réagit avec le phosphoenolpyruvate (PEP) pour former le pyruvate et régénérer l'ATP (Schéma xx-2). Enfin, la *L-lactate déshydrogenase* (L-LDH) en présence de NADH, dans un processus d'oxydoréduction va réduire le pyruvate produit est réduit en L-Lactate et oxydé le NADH en NAD<sup>+</sup> (Schéma 54).

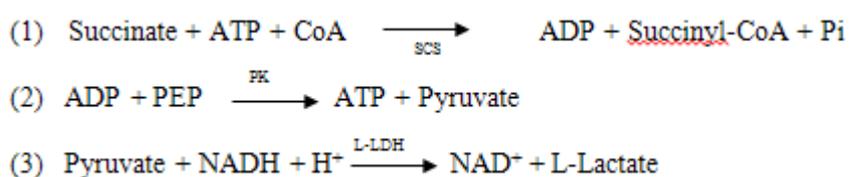
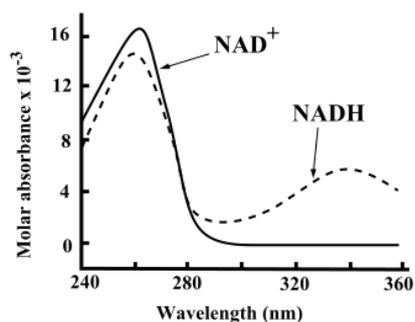


Schéma 54 : réactions enzymatiques mises en jeu du test couplé au succinate

C'est au final la consommation de NADH qui est suivie par la mesure de la décroissance d'absorbance à 340 nm puisque le NAD<sup>+</sup> n'absorbe pas à cette longueur d'onde (Figure 22). Bien que ce test semble convenir à nos besoins pour un criblage, celui-ci n'a pas été retenu dans la mesure où il est relativement onéreux.

<sup>132</sup>Bontoux, M. C.; Gelo-Pujic, M., *Tetrahedron Letters* **2006**, 47 (51), 9073-9076.

Figure 22 : absorbance du NADH et du NAD<sup>+</sup>

### III.3.1.f- Dosage de l' $\alpha$ -cétoglutarate

Ce test est basé sur le dosage de l' $\alpha$ -cétoglutarate résiduel, qui réagit avec l'ammoniaque dans une amination réductrice catalysée par la *glutamate déshydrogenase* (GDH) en présence de NADH pour donner du glutamate. (Schéma 55)<sup>133</sup>. L'oxydation du NADH est suivie par la décroissance de l'absorbance à 340 nm.

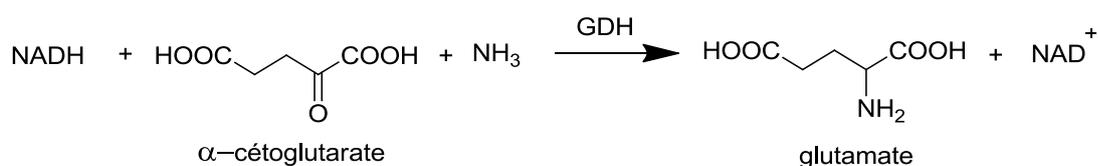


Schéma 55 : réaction catalysée par la GDH

Bien que ce test dose la disparition d'un des substrats et non l'apparition d'un produit, nous l'avons choisi pour plusieurs raisons :

- il ne dépend pas du substrat (test « universel »),
- ce test est déjà utilisé en routine au Genoscope et donc bien maîtrisé,
- il est facilement adaptable en plaque 96 puits.

<sup>133</sup>Bailey, J.; Bell, E. T.; Bell, J. E., *J Biol Chem* **1982**, 257 (10), 5579-83.

III.3.2- Mise au point du test à la GDH pour la détection de l'activité  $\alpha$ -KAO

Cette mise au point a été effectuée en 2009 par Julien Cuccaro, élève ingénieur à CPE Lyon. Dans un premier temps, la faisabilité du test couplé de dosage de l' $\alpha$ -cétoglutarate dans les conditions opératoires de la réaction catalysée par les dioxygénases a été vérifiée et notamment s'assurer qu'aucun des substrats ou produits de cette réaction n'absorbe à 340 nm (Figure 23).

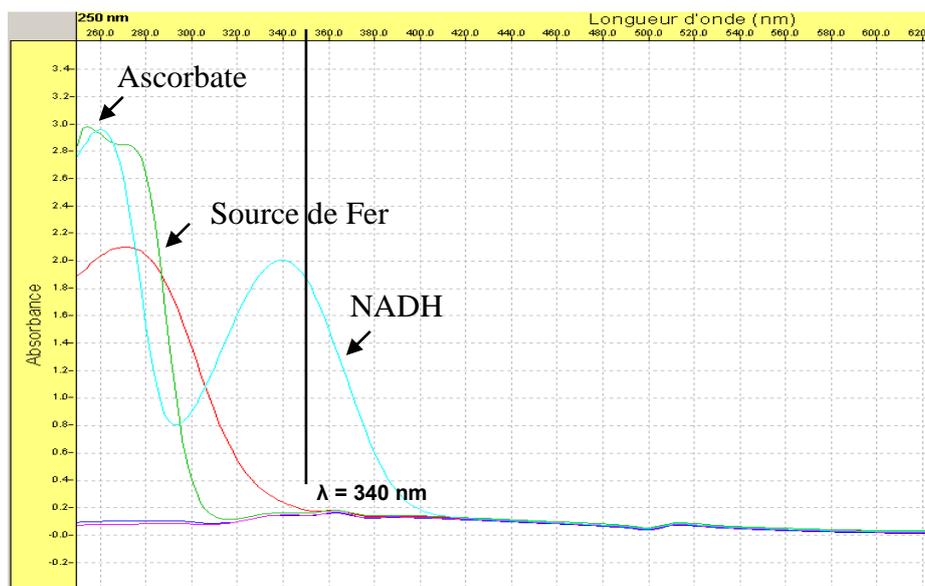


Figure 23 : spectres d'absorptions des réactifs de la réaction enzymatique étudiée

Dans la mesure où les  $\alpha$ -KAO catalysent des réactions d'hydroxylations principalement dans les tampons TRIS et HEPES à un pH compris entre 7 et 8, nous avons donc vérifié que cela n'avait pas d'influence sur la cinétique de la GDH qui généralement est utilisée en tampon Phosphate à pH 8.1 (Figure 24). On voit que la nature du tampon et un léger changement de valeur de pH n'influent pas sur la cinétique de la GDH.

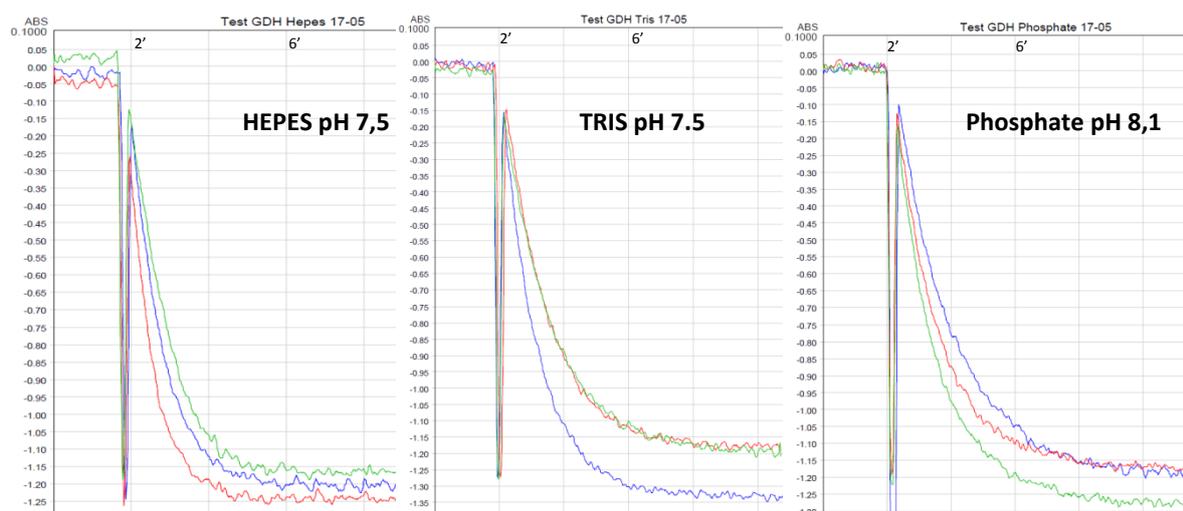


Figure 24 : cinéque de la GDH dans différents tampons

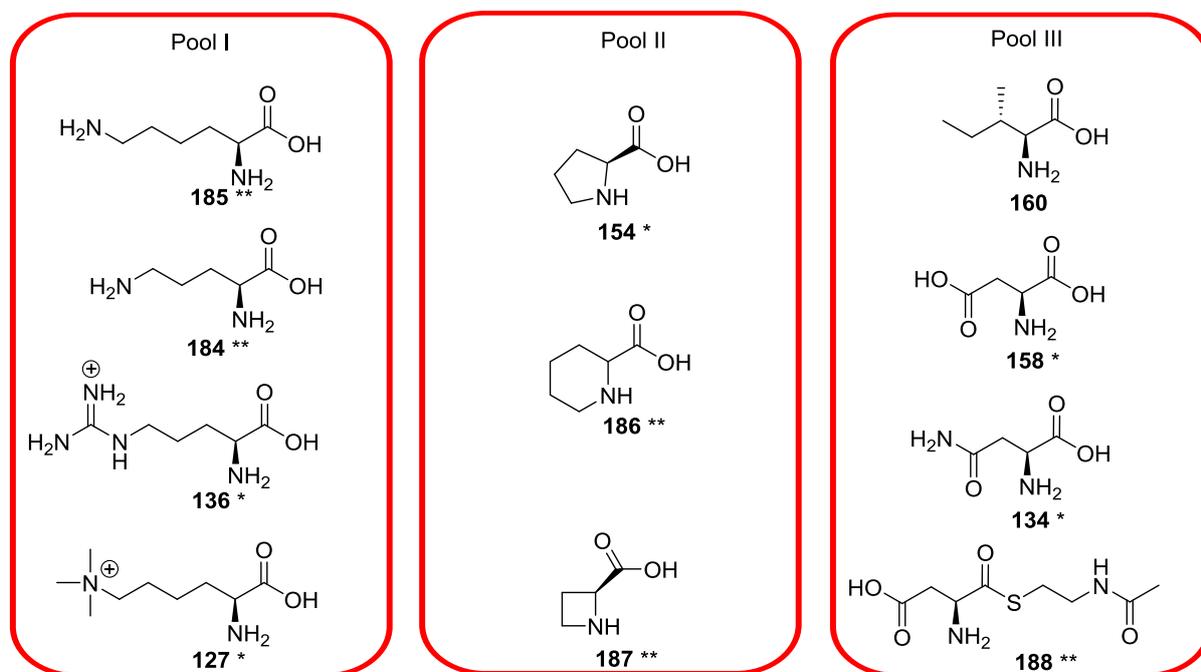
Notre principal problème lors de la mise au point du test pour la détection de l'activité  $\alpha$ -KAO était que nous ne disposions pas d'aucune  $\alpha$ -KAO car il n'existe pas d'enzyme commerciale. Nous avons vérifié la linéarité de réponse du test, en effectuant des gammes de calibration avec des variations de la concentration en  $\alpha$ -cétoglutarate. Des droites possédant des indices de corrélations supérieurs à 0.99 ont été obtenues. Le test de détection a ainsi pu être validé.

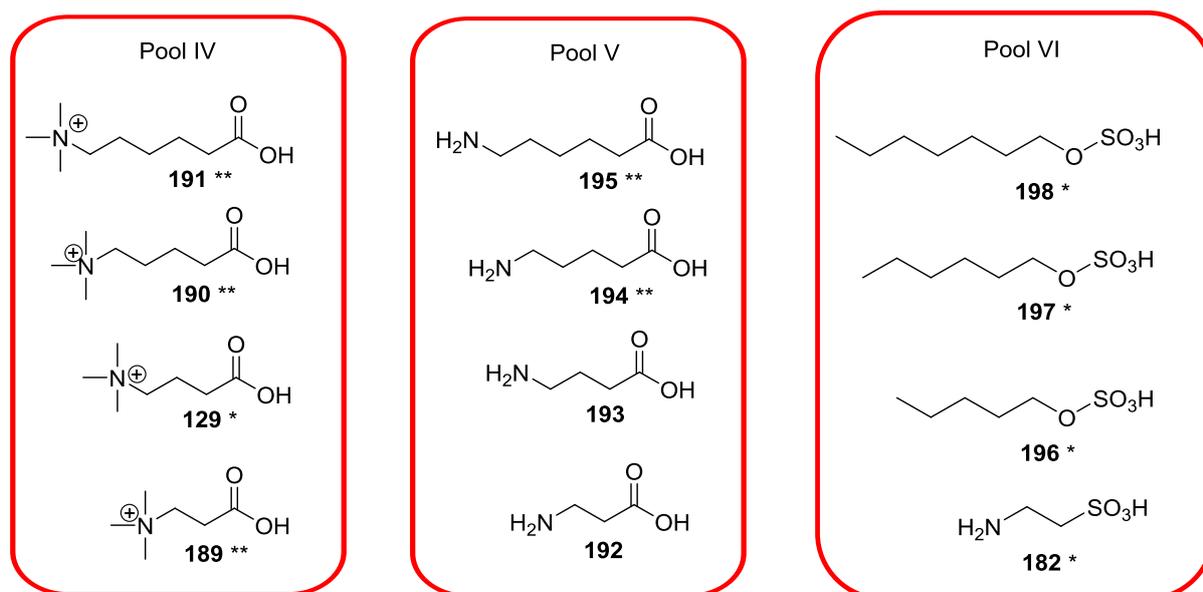
### III.4- Sélection des substrats

#### III.4.1- Sélection de substrats pour le premier criblage

Dans ce projet, notre but est de découvrir des enzymes permettant la formation de molécules hydroxylées plate-formes chirales pour la synthèse organique. Lors de la réalisation du premier criblage, peu d'études étaient disponibles pour savoir si les  $\alpha$ -KAO sont plutôt promiscuitaires ou spécifiques. En effet, au moment du premier criblage, seules les P3H, P4H et AsnO ont été testés sur des substrats différents des substrats métaboliques. P3H et P4H se sont révélées plutôt promiscuitaires et AsnO très spécifique de substrat. Nous avons donc décidé, pour le premier criblage, de sélectionner les substrats connus des enzymes du set de référence ou des substrats structurellement très proches des substrats connus de manière à maximiser nos chances d'obtenir un positif et ainsi de permettre la validation de notre test de détection. Nous avons également décidé de grouper, par 3 ou 4 les substrats de propriétés physico-chimiques proches de manière à réduire le nombre d'expériences et le temps d'analyse lors de ce criblage.

Le pool I contient la L-arginine, le substrat métabolique de VioC, la L-N $\epsilon$ -triméthyllysine, le substrat métabolique de TMLH, la L-ornithine et la L-lysine. Le pool II contient la L-proline et ses homologues supérieur et inférieur, tous étant décrits comme des substrats acceptés par les L-proline hydroxylase. Le pool III est constitué de la L-asparagine, de l'acide L-aspartique, qui sont deux substrats acceptés par des  $\alpha$ -KAO, le L-aspartyl-SNAC, dont la liaison thioester a pour objectif de mimer la liaison du résidu L-aspartyl au système multiprotéique NRPS, et de la L-isoleucine. Le pool IV contient la  $\gamma$ -butyrobétaine, le substrat métabolique de l'enzyme BBOX, un homologue inférieur et deux homologues supérieurs. Le pool V est composé un dérivé de la L-lysine sans l'amine de la chaîne principale et trois homologues inférieurs. Le pool VI est constitué de la taurine **182**, du pentylsulfate **196**, de l'hexylsulfate **197** et de l'heptylsulfate **198** (Figure 25). Pour ce groupe, il ne s'agit pas d'acides aminés ou de dérivés d'acides aminés, à l'exception de la taurine, mais ces quatre composés sont des substrats connus des alkylsulfatases, des dioxygénases catalysant la réaction d'oxydation de sulfate en aldéhyde. Deux enzymes annotées « alkylsulfatase », issues d'*Acinetobacter baylyi* ADP1, ont été rajoutées à notre sélection d'enzymes pour le premier criblage et ainsi augmenter nos probabilités d'obtenir un positif et valider notre test de détection.





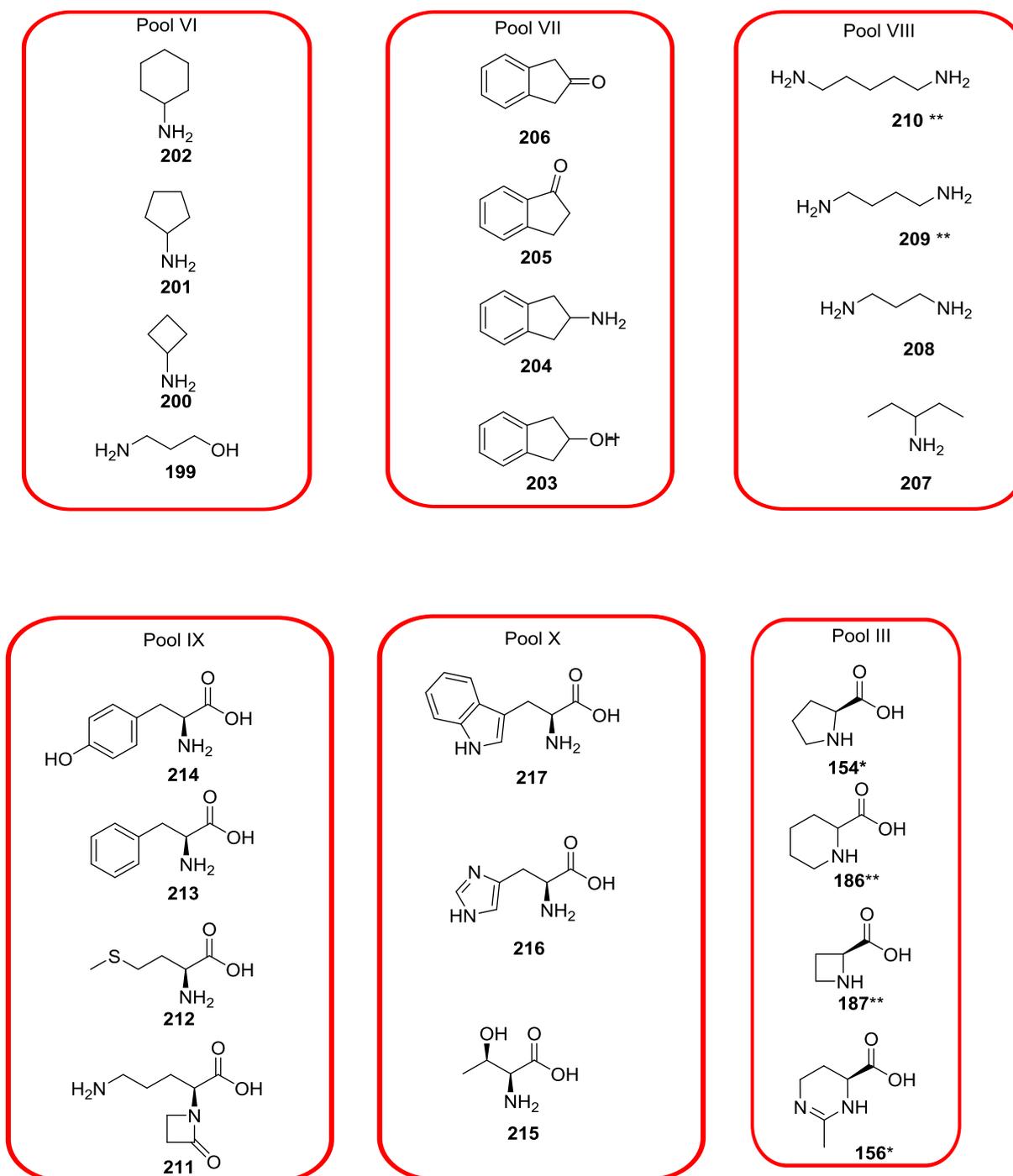
\* Substrat métabolique

\*\* Structure proche du substrat métabolique

Figure 25: structure des substrats sélectionnés pour le premier criblage

#### III.4.2- Sélection de substrats pour le second criblage

Pour le second criblage, notre sélection a été différente. Nous avons retiré des pools les substrats qui nous semblaient les moins intéressants pour la synthèse organique et ajouté des substrats de structures plus variées et éloignées de celle des substrats métaboliques avec l'objectif d'obtenir des synthons chiraux. Ainsi, le pool VI, contenant les alkylsulfates et la taurine, a été remplacé par un groupe contenant la cyclohexylamine, ses homologues supérieur et inférieur et un aminoalcool. Le pool VII est constitué de dérivés fonctionnalisés du noyau indène. Le pool VIII contient trois diamines linéaires et une monoamine branchée. Le pool IX contient la L-tyrosine, la L-phénylalanine, la L-méthionine et la  $\beta$ -lactame L-ornithine. Le pool X est composé du L-tryptophane, de la L-thréonine et la L-histidine (Figure 26). A noter que les pools I, III, IV et V n'ont pas été modifiés et le pool II a été complété avec l'ectoïne, le substrat métabolique de EctD. Deux autres acides aminés ont été également testés, la L-leucine et la L-glutamine de manière à avoir cribler la grande majorité des acides aminés. Au final, seuls quatre acides aminés, dont les produits nous semblaient moins intéressants, n'ont pas été criblés : La L-glycine, la L-sérine, la L-alanine et la L-cystéine.



\* Substrat métabolique

\*\* Structure proche du substrat métabolique

Figure 26 : structure des substrats rajoutés pour le second criblage

## III.4.3- Synthèse des substrats non commerciaux

Parmi les substrats testés lors des deux criblages, la grande majorité d'entre eux était disponible commercialement. Seuls cinq substrats ont dû être synthétisés.

III.4.3.a- Synthèse du L-aspartyl-SNAC (**188**)

Le composé **188** a été synthétisé en deux étapes à partir de l'acide aspartique protégé commercial **218**. La première étape est la thioestérification du composé **218** à partir de la *N*-acétylcystéamine en présence de DMAP et d'EDC, ce qui conduit au composé **219** avec un rendement de 79%. La seconde étape est la coupure du groupement Boc et de l'ester *tert*-butylique à l'aide d'acide chlorhydrique 4M dans le dioxane pour former le L-aspartyl-SNAC avec un rendement quantitatif (Schéma 56).

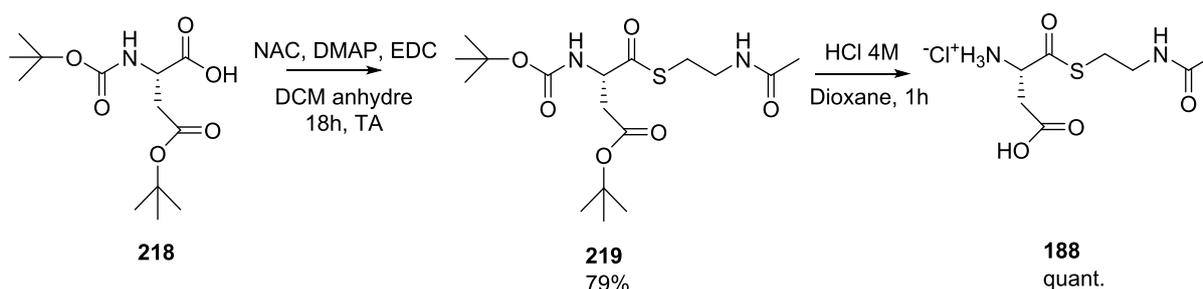


Schéma 56 : synthèse du L-aspartyl-SNAC

## III.4.3.b- Synthèse des ammoniums quaternaires

Les composés **189**, **190** et **191** ont été synthétisés selon un mode opératoire décrit par Fricker *et al.*<sup>134</sup> pour la synthèse de la  $\gamma$ -butyrobétaine. Les composés **189**, **190** et **191** ont été obtenus respectivement avec des rendements 45%, 80% et 59% après triméthylation des fonctions amines avec l'iodure de méthyle en milieu basique (Schéma 57).

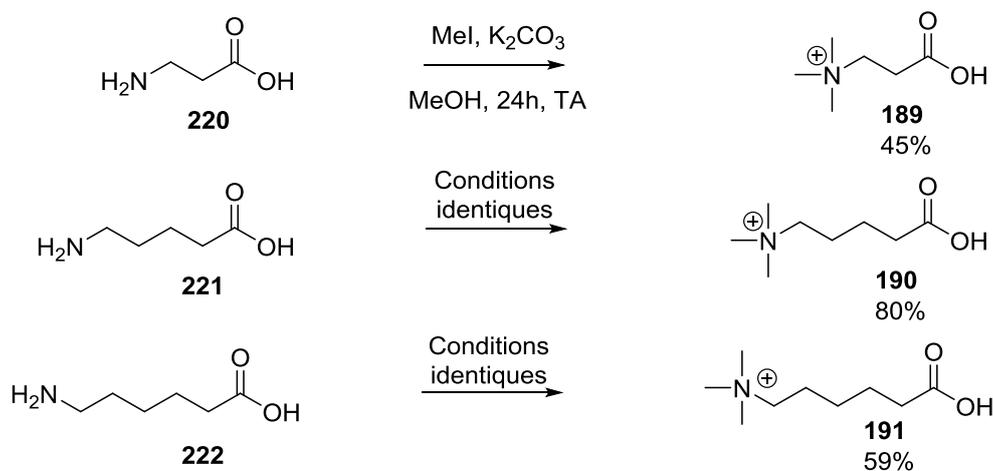
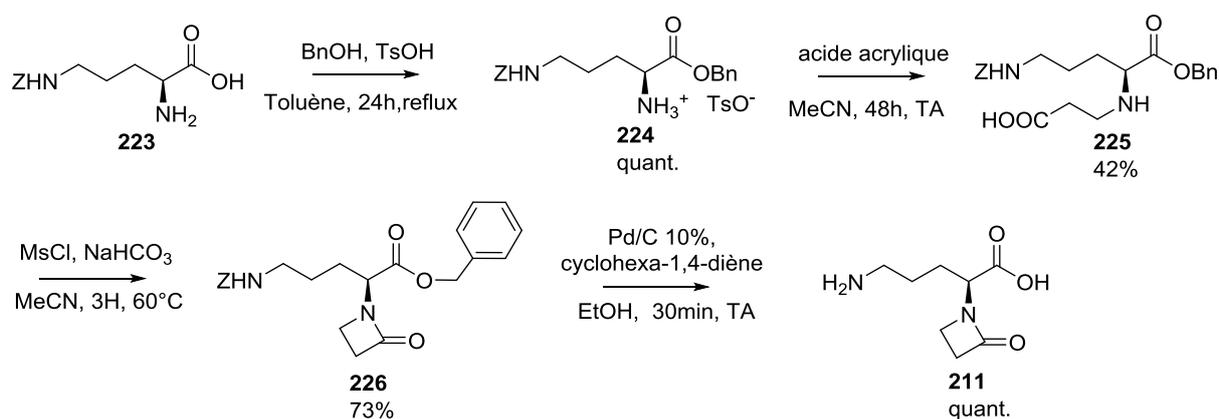


Schéma 57 : synthèse des ammoniums quaternaires

<sup>134</sup>Morano, C.; Zhang, X.; Fricker, L. D., *Analytical Chemistry* **2008**, 80 (23), 9298-9309.

III.4.3.c- Synthèse de la  $\beta$ -lactame L-ornithine

La  $\beta$ -lactame L-ornithine (**211**) a été synthétisée selon un mode opératoire décrit par Lloyd *et al.*<sup>135</sup> en 1999 en quatre étapes (Schéma 58). L'étape de déprotection a été réalisée avec génération d'hydrogène *in situ* à partir du cyclohexa-1,4-diène<sup>136</sup>. La  $\beta$ -lactame L-ornithine a été obtenue avec un rendement global de 31%, similaire à celui de la littérature.

Schéma 58 : synthèse de la  $\beta$ -lactame L-ornithine

## III.5- Réalisation des criblages haut débit

Les criblages ont été réalisés par le LCAB.

## III.5.1- Premier criblage

Les 76  $\alpha$ -KAO du premier criblage ont été regroupées sur une plaque 96 puits. Deux alkylsulfatases candidates provenant d'*Acinetobacter baylyi* ADP1 ont été ajoutées, toujours dans le but de maximiser nos chances d'obtenir au moins une enzyme positive pour vérifier la sensibilité de notre test. Nous avons au total 78 enzymes candidates à cribler sur 23 substrats.

## III.5.1a- Conditions de réaction

Les conditions de la réaction enzymatique ont été fixées à partir des données de la littérature. Pour les dioxygénases, les tampons les plus souvent utilisés sont le TRIS et l'HEPES à un pH compris entre 7 et 8, nous avons choisi de travailler en TRIS à pH 7,5. Parmi les différentes sources de fer décrites dans la littérature, notre choix s'est porté sur le sel de Mohr.

<sup>135</sup>Lloyd, M. D.; Merritt, K. D.; Lee, V.; Sewell, T. J.; Wha-Son, B.; Baldwin, J. E.; Schofield, C. J.; Elson, S. W.; Baggaley, K. H.; Nicholson, N. H., *Tetrahedron* **1999**, 55 (33), 10201-10220.

<sup>136</sup>Bajwa, J. S., *Tetrahedron Letters* **1992**, 33 (17), 2299-2302.

Nous avons également décidé de rajouter de l'ascorbate de sodium, qui est également très souvent utilisé pour maintenir le fer au degré fer(II). Les conditions de réaction choisies sont données dans le tableau 7 ci-dessous. Dans la mesure où notre test de détection est basé sur le dosage de l' $\alpha$ -cétoglutarate résiduel, l' $\alpha$ -cétoglutarate est donc en défaut par rapport au substrat. La concentration en protéine totale est comprise entre 0,04 et 0.15 mg/ml car nous travaillons en lysat, non homogènes.

	<b>concentration finale</b>
1M TRIS pH 7,5	50 mM
Pool 3 ou 4 substrats	5 mM
$\alpha$ -cetoglutarate	1 mM
ascorbate	10 mM
H <sub>2</sub> O	
Lysat	0,04-0,15 mg/mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1 mM
volume total	220 $\mu$ L

Tableau 7 : conditions utilisées pour la réaction enzymatique

Les conditions pour le test de détection par dosage de l' $\alpha$ -cétoglutarate résiduel ont été optimisées et sont données dans le tableau 8 ci-dessous.

	<b>concentration finale</b>
1M TRIS pH 7,5	50 mM
NADH 30mM	600 $\mu$ M
NH <sub>4</sub> Cl (250mM)	50 mM
glutamate deshydrogenase	18,18 $\mu$ g/ml
eau	
volume total	130 $\mu$ L
Volume reaction initiale ( $\alpha$ -cetoglutarate)	90 $\mu$ L
volume total	220 $\mu$ L

Tableau 8 : conditions utilisées pour la détection de l'activité dioxygénase

### III.5.1.b- Protocole

Le criblage des 78 enzymes candidates a été réalisé par le LCAB. Chaque pool de substrats a été testé sur l'ensemble des enzymes potentielles, ce qui, en incluant les blancs sans substrats, a donné un total de sept plaques 96 puits. Le criblage de l'activité  $\alpha$ -KAO a été réalisé sous

agitation à 300 rpm pendant 18h à température ambiante. Il a été décidé pour des raisons pratiques de ne pas quencher la réaction et de passer directement à la réaction couplée pour le dosage de l' $\alpha$ -cétoglutarate résiduel. 90  $\mu$ L de chaque puit de la première réaction ont été transférés dans une nouvelle plaque 96 puits et la réaction couplée est déclenchée par l'ajout de 130  $\mu$ L d'une solution mère contenant la GDH, le tampon tris pH 7.5, le NADH et le  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . La réaction a été suivie au spectrophotomètre à  $\lambda = 340$  nm (Cf. partie expérimentale).

### III.5.1.c- Méthode d'analyse des résultats

Le test de dosage de l' $\alpha$ -cétoglutarate résiduel via une réaction couplée est un test qualitatif basé sur l'absorbance du NADH à 340 nm (Schéma 59).

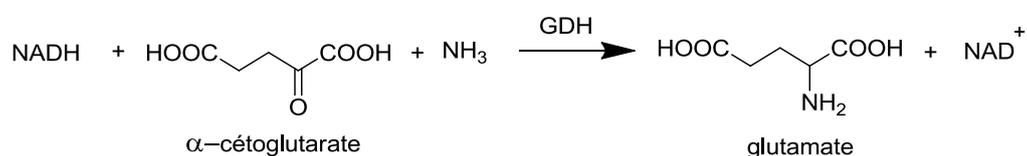


Schéma 59

S'il ne reste plus d' $\alpha$ -cétoglutarate à la fin de la première réaction enzymatique, il n'y aura pas de réaction et la GDH ne va pas consommer de NADH, l'absorbance va être constante (Figure 27-A). Si l' $\alpha$ -cétoglutarate n'a pas été consommé, la GDH va consommer le NADH et l'absorbance à 340 va diminuer jusqu'à se stabiliser à une densité optique (D.O) résiduelle (Figure 27-B). Dans le cas d'une légère consommation d' $\alpha$ -cétoglutarate, la pente de la courbe représentant la cinétique de consommation du NADH et la D.O. finale seront à des valeurs intermédiaires (Figure 27-C). Un dernier cas de figure peut également être observé lié à la présence de bulles d'air, ce qui va perturber la lecture au spectrophotomètre (Figure 27-D).

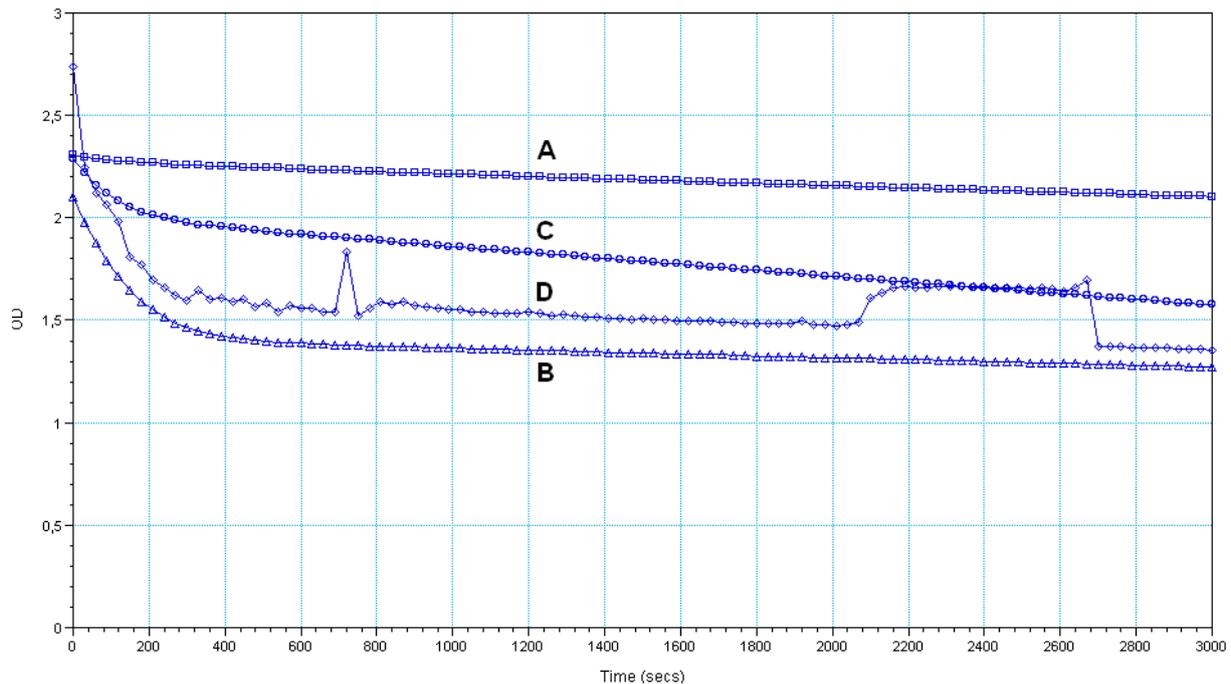


Figure 27 : différents profils obtenus avec le test à la GDH

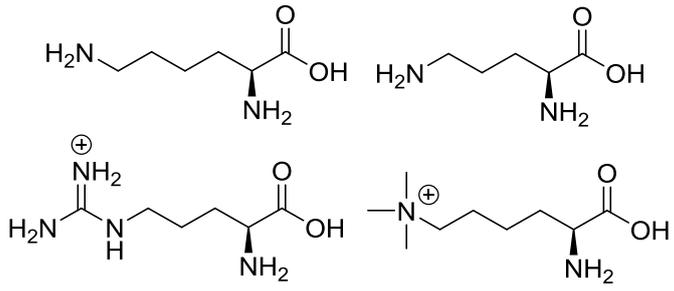
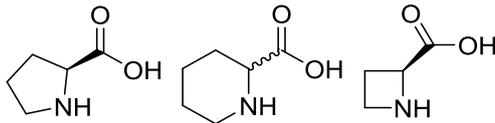
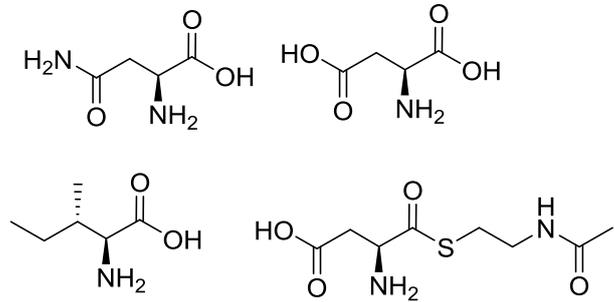
La quantité consommée d' $\alpha$ -cétoglutarate lors de la première étape peut être déterminée de trois manières. La première, la plus simple, consiste à regarder la valeur de la densité optique (D.O) finale une fois la réaction couplée terminée. Cette méthode n'a pas été retenue car elle n'est pas représentative de la cinétique de la consommation du NADH et ne tient pas compte de la D.O initiale, qui peut être variable d'une expérience à l'autre. La deuxième méthode, plus rigoureuse, consiste à mesurer la  $\Delta$ D.O entre la D.O initiale et finale. Cette méthode n'a été retenue car elle n'est pas non plus forcément représentative de la cinétique de l'enzyme. La troisième méthode, qui consiste à mesurer les pentes sur un temps donné, représente la cinétique de consommation du NADH en fonction de l' $\alpha$ -cétoglutarate restant dans le milieu. Nous avons donc opté pour cette méthode.

Un temps de cinétique a été retenu (0-100s), il s'agit de l'intervalle de temps pendant lequel la pente est la plus marquée. A partir de cette pente, deux formules ont été appliquées : la formule 1 qui consiste à soustraire les pentes de la plaque de blanc sans substrat à ces valeurs. La formule 2 consiste dans un premier temps, à pondérer en divisant par la concentration totale des protéines dosées par un test de Bradford. Cette opération a pour but de pondérer les résultats dans la mesure où tous les puits n'avaient pas la même concentration d'enzymes. Par la suite, les valeurs ainsi obtenues ont ensuite été comparées à la moyenne de l'ensemble de pentes obtenues (pente / concentration dans test (bradford) – moyenne). Ces deux formules

nous ont permis, après vérification systématique pour chaque expérience de la non-présence de bulles d'air, de déterminer les enzymes positives à étudier de manière approfondie.

### III.5.1.d- Résultats du premier criblage

Après analyse des résultats, sept enzymes ayant répondues positivement ont été sélectionnées pour vérification (Tableau 9). Le plus grand nombre de positifs a été obtenu avec le pool I, constitué des acides aminés basiques, avec cinq enzymes sélectionnées. Dans les pools III et VI, un seul résultat positif a été détecté. Pour les pools II, IV et V, composés respectivement de la proline et de ses dérivés, de la  $\gamma$ -butyrobétaine et ses dérivés, et de l'acide 6-aminohéxanoïque et ses dérivés, aucune enzyme candidate n'a démontré d'activité. Le résultat des pools II et IV peut paraître surprenant dans la mesure où de nombreuses  $\alpha$ -KAO actives sur la L-proline et la  $\gamma$ -butyrobétaine ont été décrites dans la littérature. Le traitement des données est disponible en annexe 4.

Pool	Composition	Positif (UniprotKB)
I		A5FF23 C7PLM6 B7UXZ8 C7Q942 C7QJ42
II		
III		Q7NZT5

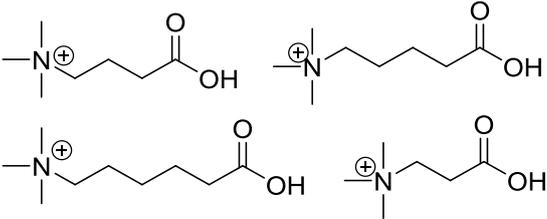
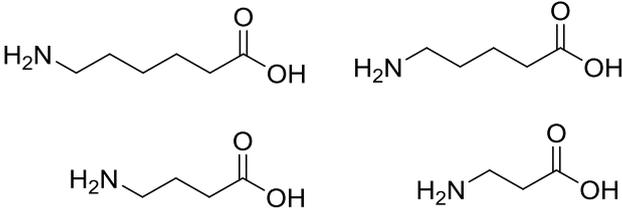
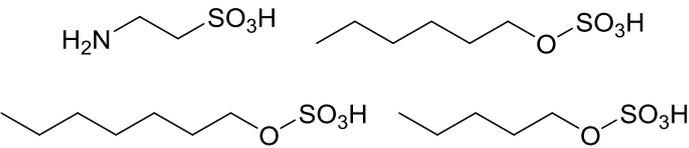
IV		
V		
VI		ACIAD1600

Tableau 9 : résultats obtenus lors du premier criblage

Au final, sept enzymes candidates ont montré une activité sur les substrats testés. Il s'agit d'un résultat satisfaisant car le nombre d' $\alpha$ -KAO connues est relativement faible à ce jour, la famille semble assez petite et nous proposons ainsi plusieurs nouvelles activités.

#### III.5.1.e- Vérification des activités enzymatiques

Sept enzymes ont montré une activité sur certains substrats rassemblés en pool. L'activité de chaque enzyme a été testée sur chacun des substrats du pool positif lors du criblage. Les conditions de réaction et le test utilisés sont les mêmes que pour le criblage. Au final, trois enzymes sont actives sur la L-lysine, une sur la L-arginine et la L-ornithine, une sur l'acide L-aspartique et une sur l'héxyl- et le pentylsulfate. A noter également la présence d'un faux positif pour lequel aucune activité n'a pu être trouvée après vérification (Tableau 10).

Enzyme (UniprotKB)	Activité
A5FF23	L-lysine
C7PLM6	L-lysine
C7Q942	L-arginine / L-ornithine
C7QJ42	L-lysine
Q7NZT5	acide L-Aspartique
ACIAD1600	héxyl- / pentylsulfate

Tableau 10 : Récapitulatif des nouvelles activités  $\alpha$ -KAO découvertes lors du premier criblage

### III.5.2- Second criblage

#### III.5.2.a- Conditions de réaction et protocole

Les 49  $\alpha$ -KAO du second criblage ont été regroupées sur une plaque 96 puits. A ces 49 enzymes candidates s'ajoutent à celles du premier criblage, moins les alkylsulfatases, soit un total de 125 enzymes candidates qui vont être criblées sur les 38 substrats. Pour les substrats des groupes VII et IX, du DMSO a été ajouté pour permettre la solubilisation, avec un maximum de 5% en volume. Les conditions de la réaction enzymatique ont été optimisées avec un changement de tampon et un passage à l'HEPES, une diminution de la concentration en ascorbate de sodium et une augmentation de la concentration de lysat (Tableau 11). Les conditions de la réaction couplée pour le dosage de l' $\alpha$ -cétoglutarate n'ont pas été modifiées. Le second criblage a également été réalisé par le LCAB selon le même protocole, l'interprétation des données a été effectuée de la même manière et est présentée dans le paragraphe suivant.

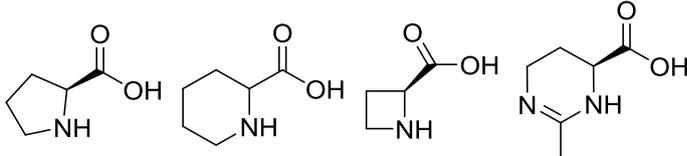
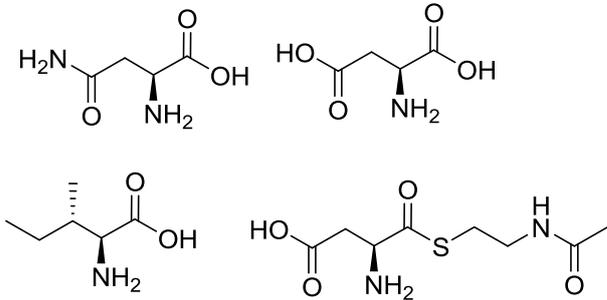
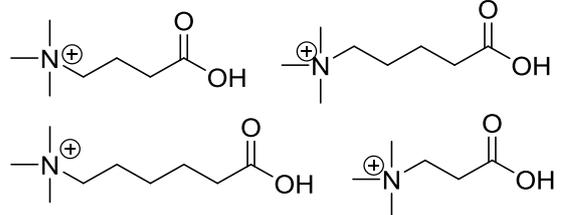
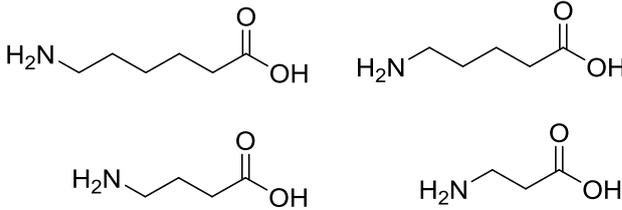
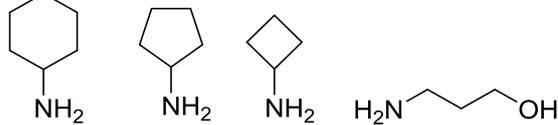
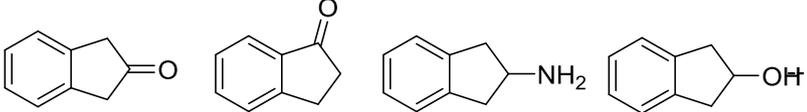
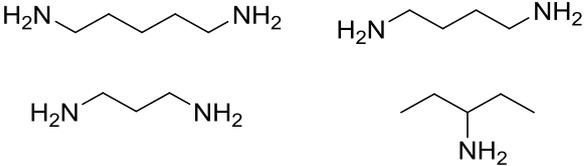
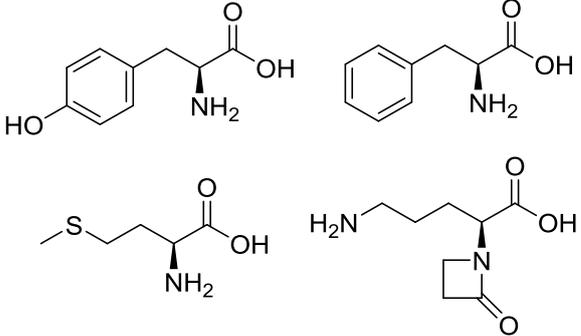
	concentration finale
1M HEPES pH 7,5	50 mM
Pool 3 ou 4 substrats	5 mM
$\alpha$ -cetoglutarate	1 mM
ascorbate	2.5 mM
H <sub>2</sub> O	
Lysat	0,15-0,40 mg/mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1mM
volume total	220 $\mu$ L

Tableau 11 : conditions optimisées pour la réaction enzymatique

## III.5.2.b- Résultats du second criblage

Après analyse des résultats, 17 enzymes ayant répondues positivement, dont une sur deux pools différents, ont été sélectionnées pour vérification (Tableau 12) (le traitement des données est disponible en annexe 4). Des enzymes ont été trouvées quasiment pour chaque pool à l'exception des pools II, IX et X. Pour les pools IX et X il y a eu un problème de détection lors de ce criblage. Les sept substrats présents dans ces deux pools ont donc été criblés un à un sur les deux sélections d'enzymes candidates. Ont également été rajoutés deux autres acides aminés qui n'avaient jamais été criblés : la L-leucine et la L-gtumanine. Ce criblage sur ces neuf substrats réalisé séparément a permis la détection d'une activité dioxygénase sur la L-méthionine et la L-leucine : D3VKH2. Cela nous fait, si l'on ne tient pas compte des positifs du premier criblage, un total de 18 enzymes, dont une active sur deux pools, sélectionnées pour vérification.

Pool	Composition	Positif (UniprotKB)
I		Q82BT6 D3VEV2 D6ZDI9 MAGE2749017

II		
III		Q81GX0
IV		Q16CC3 C1DIR0 A4GAE2 A3JZE9
V		
VI		MAGE3779926 E3I6L0 Q5LN32
VII		B9R6A0 Q93H27 C5BK45
VIII		C7PT84 B1T8I0 E3I6L0
IX		

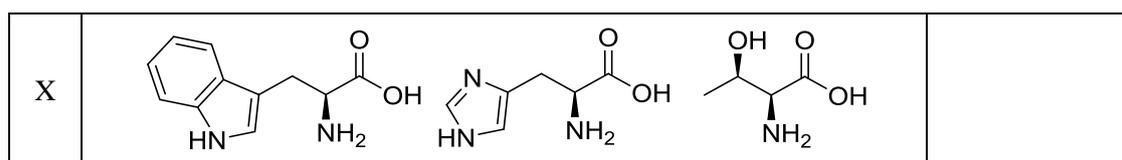


Tableau 12 : résultats obtenus lors du second criblage

## III.5.2.c- Vérification des activités enzymatiques

Comme précédemment, chaque enzyme a été testée, selon le même test, sur chaque substrat du pool pour lequel une activité a été détectée. A noter que cette fois les vérifications ont été effectuées sur enzyme purifiée. Au final après vérification, nous avons pu confirmer une activité pour seulement deux nouvelles enzymes: la première étant active sur la L-isoleucine et la seconde sur la L-méthionine et la L-leucine (Tableau 13).

Enzyme (UniprotKB)	Activité
Q81GX0	L-isoleucine
D3VKH2	L-leucine / L-méthionine

Tableau 14 : récapitulatif des nouvelles activités  $\alpha$ -KAO découvertes lors du second criblage

## III.6- Conclusion

Sur l'ensemble des deux criblages, huit nouvelles  $\alpha$ -KAO ont été découvertes. Cinq ont montré une activité sur des substrats connus (L-Arg, L-Asp<sup>88</sup>, L-Ile<sup>94</sup>, L-Leu<sup>95</sup>, L-Met<sup>96</sup>, hexyl- et pentylsulfate<sup>137</sup>) et trois sur un substrat jamais décrit dans la littérature, la L-lys. L'enzyme active sur la L-Arg (C7Q942) a également montré une activité sur la L-Orn, substrat jamais décrit. A noter également que l'enzyme Q81GX0, active sur la L-isoleucine, a depuis été décrite comme active dans une demande de brevet effectuée en 2011<sup>138</sup> et qui a finalement été annulée. Sur les huit nouvelles  $\alpha$ -KAO, six ont été amenées par la recherche par homologie et deux par le domaine InterPro (A5FF23 et C7PLM6), ce qui montre la

<sup>88</sup>Singh, G. M.; Fortin, P. D.; Koglin, A.; Walsh, C. T., *Biochemistry* **2008**, 47 (43), 11310-20.

<sup>94</sup>Hibi, M.; Kawashima, T.; Kodera, T.; Smirnov, S. V.; Sokolov, P. M.; Sugiyama, M.; Shimizu, S.; Yokozeki, K.; Ogawa, J., *Applied and environmental microbiology* **2011**, 77 (19), 6926-30.

<sup>95</sup>Hibi, M.; Kawashima, T.; Sokolov, P. M.; Smirnov, S. V.; Kodera, T.; Sugiyama, M.; Shimizu, S.; Yokozeki, K.; Ogawa, J., *Applied microbiology and biotechnology* **2013**, 97 (6), 2467-72.

<sup>96</sup>Hibi, M.; Kawashima, T.; Yajima, H.; Smirnov, S. V.; Kodera, T.; Sugiyama, M.; Shimizu, S.; Yokozeki, K.; Ogawa, J., *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, 24 (17), 990-994.

<sup>137</sup>Kahnert, A.; Kertesz, M. A., *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275 (41), 31661-31667.

<sup>138</sup>Hibi, M., WO 2011/021717 A2, **2011**.

complémentarité des deux approches. Au niveau des annotations, une seule avait été correctement annotée, deux possédaient des annotations relativement proches des activités découvertes et cinq étaient annotées comme « protéine non caractérisée » (Tableau 15). Cela montre que notre méthode de sélection des enzymes sur les homologues de séquences et les motifs InterPro sans tenir compte des annotations est cohérente. Compte tenu de la taille de la famille avec seulement 1050 séquences candidates obtenues à partir des sets de référence et du peu d'applications développées en biocatalyse à ce jour, trouver huit nouvelles  $\alpha$ -KAO à partir de seulement 125 enzymes candidates est un résultat satisfaisant.

Enzyme (UniprotKB)	génom	Annotation
A5FF23	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> (strain ATCC 17061 / DSM 2064 / UW101)	Uncharacterized protein
C7PLM6	<i>Chitinophaga pinensis</i> (strain ATCC 43595 / DSM 2588 / NCIB 11800 / UQM 2034)	Uncharacterized protein
C7Q942	<i>Catenulispora acidiphila</i> (strain DSM 44928 / NRRL B-24433 / NBRC 102108 / JCM 14897)	Uncharacterized protein
C7QJ42	<i>Catenulispora acidiphila</i> (strain DSM 44928 / NRRL B-24433 / NBRC 102108 / JCM 14897)	Clavaminat synthase
Q7NZT5	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Putative peptide-aspartate beta-dioxygenase
ACIAD1600	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	Putative alkylsulfatase
Q81GX0	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579 / DSM 31)	Uncharacterized protein

D3VKH2	<i>Xenorhabdus nematophila</i> (strain ATCC 19061 / DSM 3370 / LMG 1036 / NCIB 9965 / AN6)	Uncharacterized protein
--------	---	----------------------------

Tableau 15 : organisme et annotation des nouvelles  $\alpha$ -KAO découvertes

## **Chapitre IV**

### **Etudes des nouvelles $\alpha$ -KAO**



## Chapitre IV

### Etude des nouvelles $\alpha$ -KAO

#### IV.1- Introduction

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, nous avons trouvé huit nouvelles  $\alpha$ -KAO. Pour cinq d'entre elles les activités trouvées ont été décrites dans la littérature (sur L-Arg, L-Asp, L-Ile, L-Leu, L-Met, hexyl et pentylsulfate), nous avons donc choisi de focaliser la suite de notre étude sur les nouvelles activités, *i.e.* L-Lys et L-Orn. Quatre nouvelles  $\alpha$ -KAO ont montré une activité sur ces deux acides aminés, trois d'entre elles sur la L-lysine, la quatrième sur la L-Ornithine, ainsi que sur la L-Arginine<sup>86</sup>, activité déjà décrite. Pour la suite du mémoire, nous avons décidé de nommer ces enzymes LDO1, LDO2 et LDO3 pour Lysine DiOxygénase et OADO pour Ornithine et Arginine DiOxygénase (Tableau 16).

Enzyme (UniprotKB)	Activité	Nom
C7QJ42	L-Lys	LDO1
C7PLM6	L-Lys	LDO2
A5FF23	L-Lys	LDO3
C7Q942	L-Orn / L-Arg	OADO

Tableau 16 : noms des enzymes étudiées

Pour chacune de ces enzymes, nous avons d'abord mis au point une méthode de suivi HPLC de l'activité enzymatique. Dans un deuxième temps, nous avons optimisé la réaction en étudiant l'effet de la variation de différents paramètres. Enfin, afin d'identifier les produits formés, nous avons effectué une montée en échelle, pour disposer d'assez de produit pour conduire les analyses structurales.

---

<sup>86</sup>Helmetag, V.; Samel, S. A.; Thomas, M. G.; Marahiel, M. A.; Essen, L. O., ) *Febs J* **2009**, 276 (13), 3669-82.

Dans ce chapitre, seront présentées les études approfondies des enzymes LDO1, LDO2, LDO3 et OADO. Pour la suite des études nous avons choisi de travailler sur enzymes purifiées. Les enzymes ont été purifiées par FPLC (Cf. partie expérimentale).

#### IV.2- Conditions de dérivatisation

Pour suivre les réactions enzymatiques par HPLC, nous avons choisi de dériver le milieu réactionnel; les substrats, L-Lys, L-Orn et L-Arg ne sont pas UV actifs et trop polaires pour être retenus sur une colonne C18 classique. La dérivatisation avec un agent chromophore aura deux avantages, elle permettra le suivi en UV et une meilleure séparation des composés du milieu réactionnel.

Nous avons choisi deux agents dérivatisants courants : le réactif de Marfey **227** (FDAA)<sup>139</sup> et le chloroformiate de (9-fluorénylméthyle) (**228**) (Fmoc-Cl)<sup>140</sup> (Figure 28).

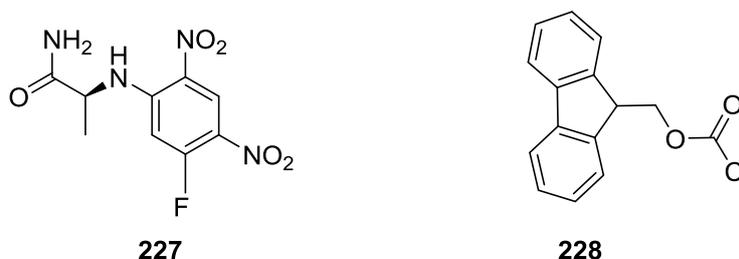


Figure 28 : agents dérivatisants utilisés

Le FDAA est souvent utilisé pour permettre d'étudier l'aspect stéréochimique d'une réaction car c'est un agent chiral. Le Fmoc-Cl est moins onéreux et plus facile d'utilisation. Les protocoles de dérivatisation et les conditions HPLC sont décrits dans la partie expérimentale.

#### IV.3- Optimisation des réactions

Pour obtenir la meilleure conversion possible de la L-Lys par LDO1, LDO2, LDO3 et de la L-Orn et L-Arg par OADO, une optimisation des conditions de réaction enzymatique pour chaque enzyme a été réalisée. Nous avons repris les conditions du premier criblage (Tableau 17) en modifiant la stoechiométrie pour l' $\alpha$ -cétoglutarate de façon à ce qu'il ne soit plus en défaut.

<sup>139</sup>Bhushan, R.; Bruckner, H., *Amino Acids* **2004**, 27 (3-4), 231-47.

<sup>140</sup>Melucci, D.; Xie, M.; Reschiglian, P.; Torsi, G., *Chromatographia* **1999**, 49 (5-6), 317-320.

	<b>concentration finale</b>
1M TRIS pH 7,5 1M	50 mM
L-lysine 50mM	5 mM
$\alpha$ -cetoglutarate 100mM	5 mM
ascorbate 100mM	10 mM
H <sub>2</sub> O	
LDO1 purifiée	0,024 mg/mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 100mM	1 mM
volume total	220 $\mu$ L

Tableau 17 : conditions utilisées pour la réaction enzymatique

Notre première expérience a été de tester la stéréospécificité de substrat en utilisant la lysine et l'ornithine racémique. La réaction a été suivie HPLC après dérivatisation du milieu avec le FDAA. Cela nous a permis de déterminer que nos quatre enzymes sont totalement stéréospécifiques. En effet, un seul des énantiomères de la L-Lys et L-Orn est consommé et un seul nouveau pic est observé donc un seul diastéréoisomère issue de l'hydrolylation de la L-Lys ou L-Orn est formé. Par exemple pour LDO1, on peut voir sur le chromatogramme 28 l'apparition d'un seul nouveau pic à 19,48 minutes et la diminution du pic à 21.16 minutes correspondant à la L-Lys.

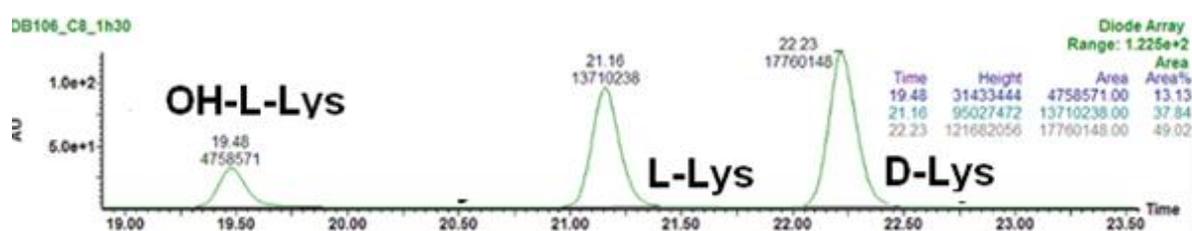


Figure 28 : analyse de la réaction après dérivatisation au FDAA

Pour la suite, le Fmoc-Cl, moins onéreux et plus facile d'utilisation, a été utilisé pour l'optimisation des conditions de réactions. Nous avons étudié l'influence de différents paramètres :

- le ratio substrat/ $\alpha$ -cétoglutarate,
- la nature du tampon,
- le pH,

- la concentration en ascorbate,
- la nature et la concentration de la source de Fer,
- la température,
- l'agitation.

Cette étude approfondie nous a permis d'optimiser les conditions de la réaction données dans le tableau ci-dessous. Les conditions ayant été modifiées par rapport au criblage sont représentées en rouge.

LDO1	concentration finale	LDO2	concentration finale
HEPES pH 7,5	50 mM	HEPES pH 7,5	50 mM
L-lysine	10 mM	L-lysine	10 mM
$\alpha$ -cetoglutarate	15 mM	$\alpha$ -cetoglutarate	15 mM
ascorbate	2.5 mM	ascorbate	2.5 mM
H <sub>2</sub> O		H <sub>2</sub> O	
LDO1	0,024 mg/mL	LDO2	0,031 mg/mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1 mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1 mM
volume total	220 $\mu$ L	volume total	220 $\mu$ L
TA, 18h, 300 rpm		TA, 18h, 300 rpm	

LDO3	concentration finale	OADO	concentration finale
HEPES pH 7,5	50 mM	HEPES pH 7,5	50 mM
L-lysine	10 mM	L-lysine	10 mM
$\alpha$ -cetoglutarate	15 mM	$\alpha$ -cetoglutarate	15 mM
ascorbate	2.5 mM	ascorbate	0 mM
H <sub>2</sub> O		H <sub>2</sub> O	
LDO3	0,086 mg/mL	OADO	0,595 mg/mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1 mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1 mM
volume total	220 $\mu$ L	volume total	220 $\mu$ L
TA, 18h, 300 rpm		TA, 18h, 300 rpm	

Tableau 18 : conditions optimisées pour les quatre  $\alpha$ -KAO

Plusieurs paramètres ont été modifiés : le tampon TRIS a été remplacé par un tampon HEPES, la concentration de l'ascorbate de sodium a été diminuée de 10 mM à 2.5 mM car pour les enzymes LDO1 et OADO il devient inhibiteur à des concentrations trop élevées. Pour OADO,

la suppression de l'ascorbate a permis de passer d'une conversion de 26% à une conversion de 55%. Pour LDO2 et LDO3, il n'est pas inhibiteur jusqu'à 20 mM mais une forte concentration n'augmente pas l'activité. La concentration en  $\alpha$ -cétoglutarate a été augmentée afin d'être en ratio 3/2 par rapport au substrat, stoechiométrie ayant permis la meilleure conversion. Ainsi avec tous ces paramètres optimisés, nous avons obtenu en 18 heures à température ambiante les conversions suivantes :

- $\geq 95\%$  sur la L-Lys avec LDO1 à une concentration de 0,024 mg/mL,
- $\geq 95\%$  sur la L-Lys avec LDO2 à une concentration de 0,031 mg/mL,
- $\geq 95\%$  sur la L-Lys avec LDO3 à une concentration de 0,086 mg/mL,
- 50% sur la L-Arg avec OADO à une concentration de 0,595 mg/mL,
- 60% sur la L-Orn avec OADO à une concentration de 0,595 mg/mL.

A ce stade, nous n'avons pas d'autres informations sur la structure des produits obtenus que la stéréosélectivité totale de nos enzymes avec un seul diastéréoisomère formé. Parmi les produits que nous pourrions former avec ces quatre enzymes, seule la 5-OH-L-Lys est commerciale, nous en avons acheté et ainsi pu comparer son chromatogramme après dérivatisation avec celui du milieu réactionnel de LDO1, LDO2 et LDO3. Les temps de rétention étant différents, nous avons pu conclure que LDO1, LDO2 et LDO3 ne formaient pas de 5-OH-L-lysine. Afin de disposer d'une quantité suffisante de produit pour effectuer les analyses structurales, un travail de montée en échelle a été effectué.

#### IV.4- Montée en échelle

Plusieurs tests de montées en échelle avec l'enzyme LDO1 sur la L-lys, pour la synthèse du composé à l'échelle semi-préparative, ont été effectués sous forme de duplicat sur un volume de 1 mL : le premier dans un ballon avec un agitateur magnétique, le deuxième dans un Eppendorf 1,5 mL agité à 300 rpm et le troisième dans un erlenmeyer de 50 mL agité également à 300 rpm. Les conversions obtenues sont très différentes selon le matériel utilisé. L'agitation magnétique dans un ballon est de loin la moins efficace, faire la réaction en Eppendorf ou dans un erlenmeyer semble bien plus efficace avec des conversions respectivement de 90% et 100% en 18h à température ambiante.

Une deuxième montée en échelle a été effectuée, toujours sous forme de duplicat, pour passer de 1 mL à 10 mL dans un erlenmeyer de 250 mL. En 18 heures, les conversions obtenues ont été de 90 et 100% (Figure 29).

Enfin un passage d'un volume de 10 mL à 20 et 40 mL dans des erlenmeyers de 250 mL a conduit à des conversions beaucoup plus faibles, cela s'expliquant certainement par une moins bonne oxygénation liée à l'augmentation du volume et à la diminution de la surface de contact entre le milieu enzymatique et l'air. Nous avons donc choisi de travailler avec un volume de 4x10 mL.

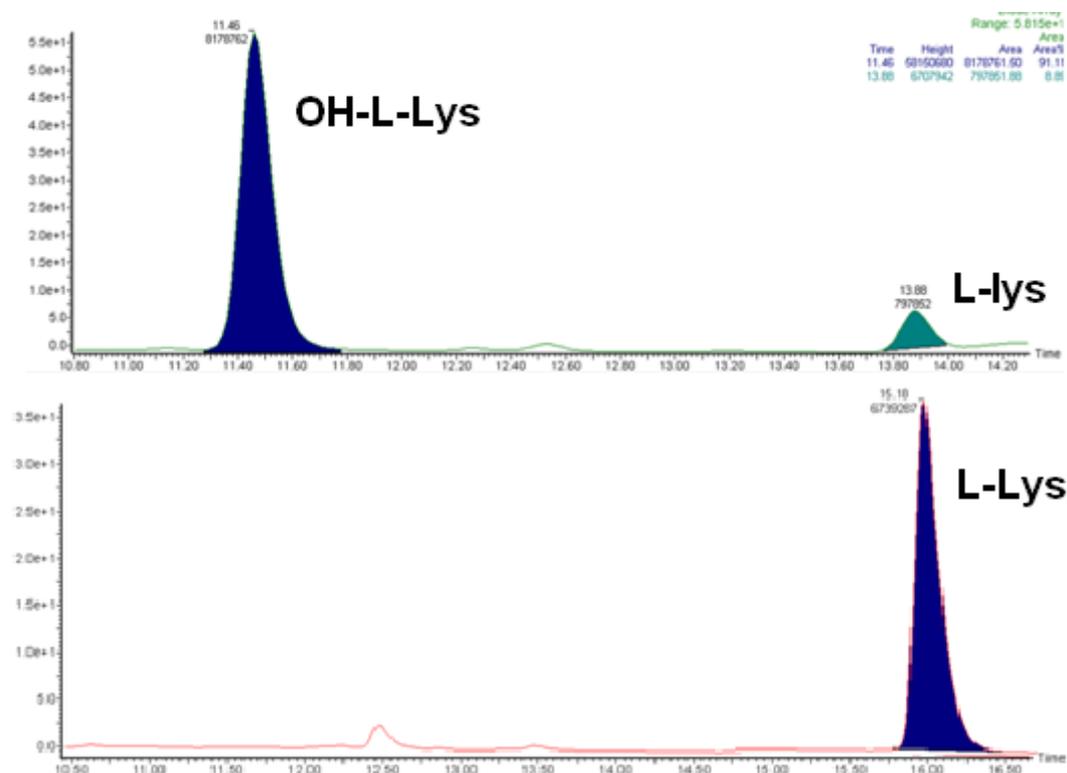


Figure 29 : résultats de la montée en échelle de LDO1 avec la L-Lysine

Les montées en échelle avec LDO1, LDO2 LDO3 et OADO ont été réalisées. Les conversions obtenues sont :

- LDO1 avec la L-Lys : 94% de conversion,
- LDO2 avec la L-Lys : 96% de conversion,
- LDO3 avec la L-Lys : 91% de conversion,
- OADO avec la L-Orn : 68% de conversion,

- OADO avec la L-Arg : 50% de conversion.

#### IV.5- Isolement et caractérisation des produits

La L-Lys, la L-Orn, La L-Arg et les produits formés par les quatre enzymes sont des composés très polaires et sont difficilement extractibles du milieu. Néanmoins, dans un premier temps nous avons essayé de les séparer et de purifier les dérivés oxydés après évaporation du milieu réactionnel par HPLC préparative et par chromatographie sur silice. Ces essais sont détaillés dans le paragraphe suivant.

##### IV.5.1- Purification directe

Nous avons analysé le milieu réactionnel de l'enzyme LDO1 par HPLC sans dérivation préalable, sur deux types de colonnes une XBridge C18 (3.5 $\mu$ m, 4.6\*150mm) et une Zic-pHilic (5 $\mu$ m, 4.6\*150mm) avec une détection par détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL). Après optimisation des gradients, nous n'avons observé qu'une séparation partielle avec la XBridge (Figure 30-A), tandis que sur la Zic-pHilic, une très bonne séparation a été obtenue (Figure 30-B). Malheureusement nous n'avons pas pu appliquer ces conditions en HPLC préparative car la Zic-pHilic n'est pas commercialisée au format préparatif. L'utilisation d'une Zic-Hilic classique aurait pu être une solution mais nos conditions de pH (pH = 9.9) ne peuvent pas être appliquées sur cette colonne.

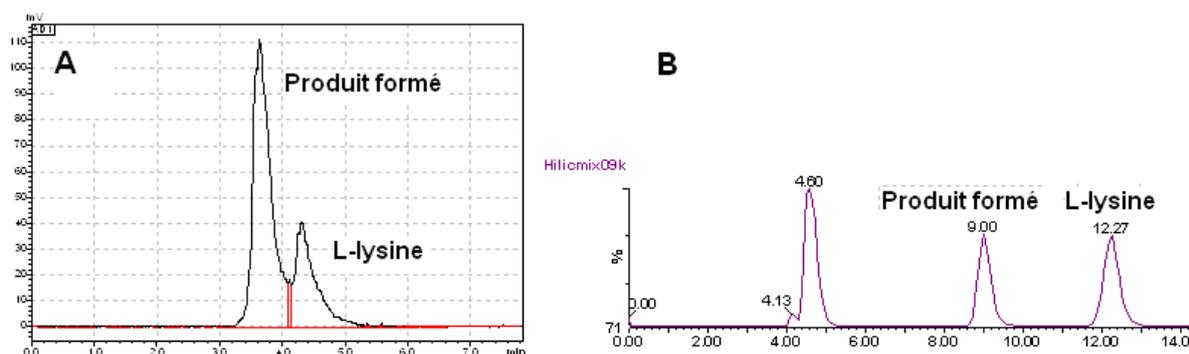


Figure 30 : séparation de la L-Lysine et l'hydroxy-L-lysine

Nous nous sommes tournés alors vers une purification par chromatographie sur colonne. Plusieurs essais de séparation sur CCM ont été effectués. Les éluants habituellement utilisés pour la séparation des acides aminés tels que MeOH saturé en ammoniac, CTUU (ethyl acetate/acetone/eau/acide formique 5/3/1/1 : v/v/v/v) et CTDD (ethyl acetate/acetone/eau/acide formique 5/3/2/2 : v/v/v/v) ont été testés et n'ont pas permis d'obtenir une bonne séparation entre la L-Lys et le produit formé. Un nouvel éluant, composé d'un tampon

carbonate d'ammonium 10 mM à pH 11,35 et d'acétone (1/2 : v/v) a été développé et a permis une bonne séparation sur CCM en phase inverse de la L-Lys et du composé formé par LDO1 (Figure 31). Malheureusement, le passage en CCM préparative et colonne chromatographique n'a pas été concluant avec la perte de la séparation pour les CCM et la dégradation des colonnes chromatographiques à cause du pH trop élevé.

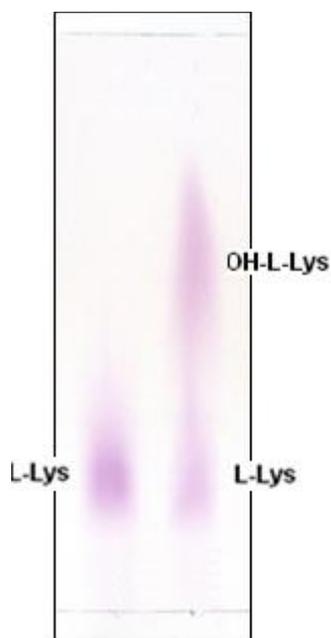


Figure 31 : séparation par CCM de la L-Lys et L-OH-L-Lys

Devant les difficultés rencontrées pour la purification de nos produits de manière directe, nous avons opté pour une dérivatisation avec un groupement protecteur pour réduire leur polarité et pouvoir les séparer du milieu réactionnel.

#### IV.5.2- Purification après dérivatisation et caractérisation des produits formés

##### IV.5.2.a- Purification du produit formé par LDO1

Dans un premier temps, nous avons dérivatisé, après évaporation, le milieu issu de la montée en échelle avec LDO1 avec du Fmoc-Cl. (Schéma 60).

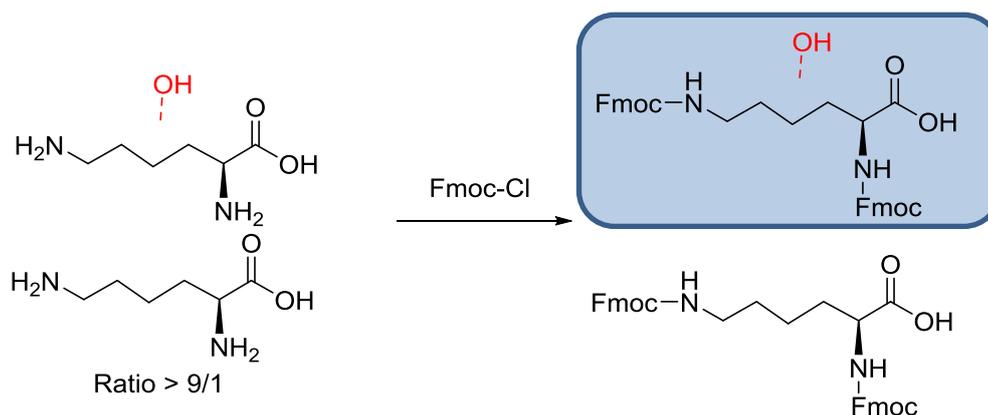
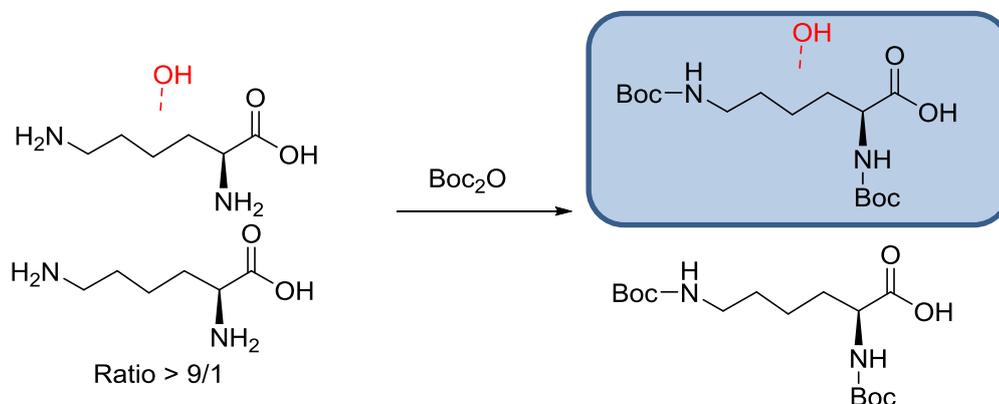


Schéma 60 : séparation de la L-Lys et la OH-L-Lys par dérivatisation au Fmoc-Cl

Après évaporation du solvant, le brut réactionnel s'est avéré être insoluble dans les solvants organiques à l'exception du DMSO. Malgré le minimum de DMSO utilisé pour la solubilisation du brut réactionnel, la purification sur colonne chromatographique n'a pas été possible le produit n'a pas été retenu sur la silice.

Nous avons alors testé le di-*tert*-butyl dicarbonate ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ). Le brut réactionnel issu de la montée en échelle avec LDO1 après évaporation a été mis en réaction avec le  $\text{Boc}_2\text{O}$  en présence de  $\text{NaHCO}_3$  (schéma 61).

Schéma 61 : séparation de la L-lys et la OH-L-lys par dérivatisation au  $\text{Boc}_2\text{O}$ 

Après traitement et purification sur colonne chromatographique, le produit hydroxylé protégé n'a été obtenu qu'avec une pureté d'environ 80%, insuffisante pour une analyse correcte de sa structure. La purification est compliquée car dans le brut réactionnel il y a de nombreux produits polaires, l' $\alpha$ -cétoglutarate résiduel, le succinate, l'ascorbate de sodium, le tampon mais surtout du glycérol utilisé pour stabiliser la protéine (Figure 32). Nous avons donc testé différents moyens de les éliminer et le plus efficace a été de faire une première purification par résine échangeuse d'ions.

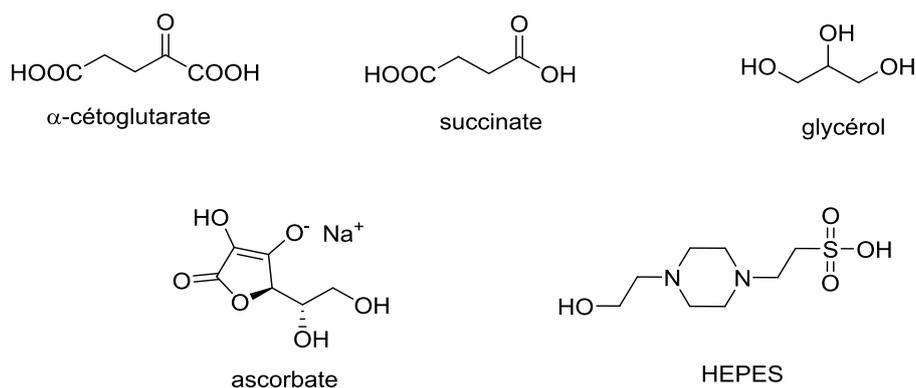


Figure 32 : composés du milieu réactionnel

Ainsi, avec cette étape supplémentaire de purification, nous avons obtenu le produit hydroxylé protégé avec un rendement de 78%. L'analyse RMN a permis de montrer que l'hydroxylation avait lieu sur le C3. Le produit dérivatisé a ensuite été déprotégé avec du HCl 4M dans le dioxane pour conduire à la 3-OH-L-lysine (**230**) avec un rendement quantitatif. Le rendement total pour la synthèse de 3-OH-L-lysine est de 73% (Schéma 62).

L'analyse des spectres RMN (proton, ROESY et NOESY) ne nous a pas permis de déterminer la stéréochimie du C3, des analyses complémentaires ont été nécessaires.

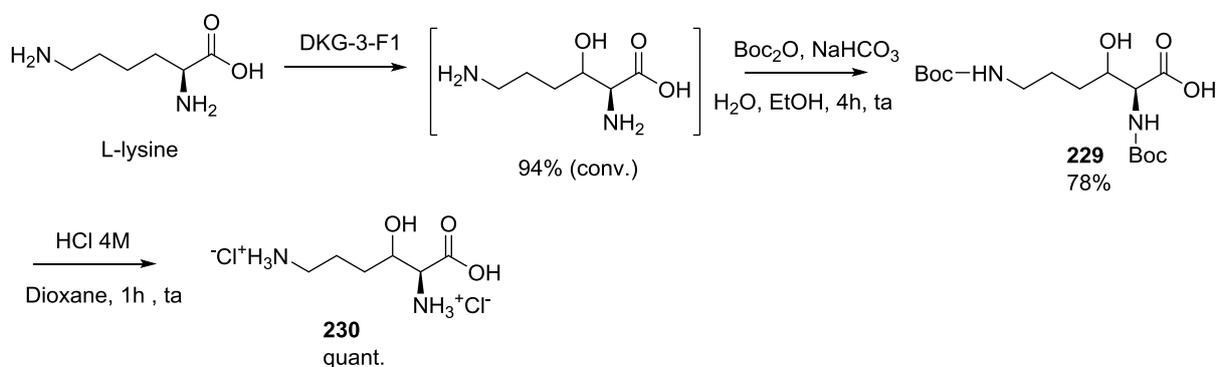


Schéma 62 : synthèse et purification de la 3-OH-L-lysine

#### IV.5.2.b- Caractérisation du produit formé par LDO1

Pour déterminer la stéréochimie de la 3-OH-L-lysine formée par LDO1, nous avons choisi d'utiliser la méthode développée en 1969 par Mosher *et al.*<sup>141</sup> (Figure 33) pour la détermination de la configuration absolue des amines et des alcools.

<sup>141</sup>Dale, J. A.; Dull, D. L.; Mosher, H. S., *The Journal of organic chemistry* **1969**, 34 (9), 2543-2549.



Figure 33 : structure des acides de Mosher

Les acides dits « de Mosher » réagissent avec des amines et des alcools pour former les amides et les esters correspondant, l'analyse en RMN  $^1\text{H}$  permet de déterminer la configuration absolue des centres chiraux porteurs de l'amide ou de l'ester. En effet, des effets de blindage<sup>142</sup> liés à la présence du noyau phényle vont modifier les déplacements chimiques des protons avoisinants et l'analyse des différences de déplacement de signaux entre l'ester ou l'amide formé à partir du (*S*)-Mosher et celles de l'ester ou l'amide formé à partir du (*R*)-Mosher ( $\Delta\delta(\text{SR})$ ) va permettre de déterminer la stéréochimie. Ainsi, si nous prenons l'exemple des deux stéréochimies possibles pour notre molécule, représentées ci-dessous (Schéma 63), après réaction avec le (*S*)-Mosher et le (*R*)-Mosher, si les  $\Delta\delta(\text{SR})$  obtenus sont positifs pour la partie « chaîne principale de l'acide aminé » et négatifs pour la partie « chaîne latérale de l'acide aminé » la configuration absolue de l'alcool est *S*. Et inversement si les  $\Delta\delta(\text{SR})$  sont négatifs pour la « chaîne principale de l'acide aminé » et positifs pour « la chaîne latérale de l'acide aminé » la configuration absolue de l'alcool est *R*.

---

<sup>142</sup>Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R., *Chemical Reviews* **2004**, *104* (1), 17-118.

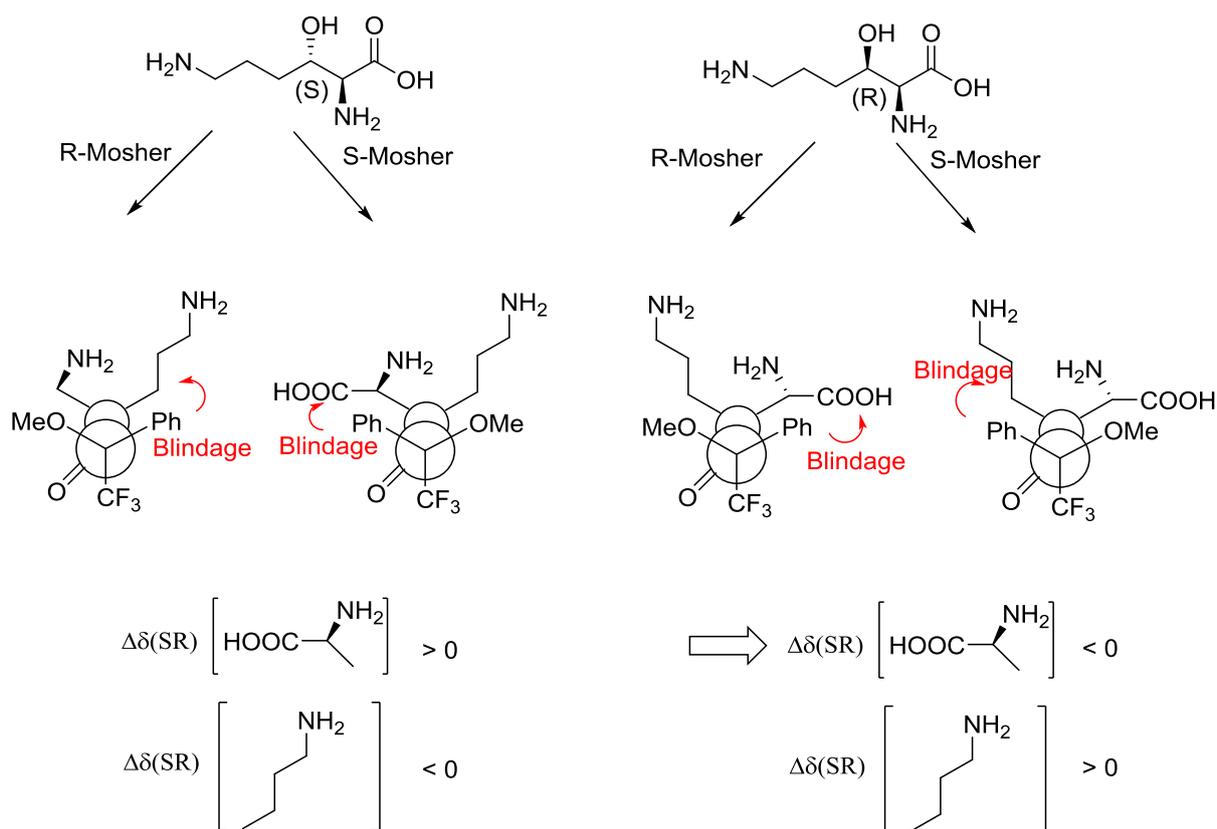


Schéma 63 : principe de la caractérisation par dérivatisation avec les acides de Mosher

Comme les acides de Mosher réagissent également avec les amines, nous avons fait l'étude sur le produit protégé par un groupement Boc sur les deux fonctions amine. Nous avons également protégé la fonction acide sous forme d'ester benzylique car avec la fonction acide libre, la formation des esters de Mosher s'est avérée problématique. L'ester benzylique **233** a été obtenu avec un rendement de 78% (Schéma 64).

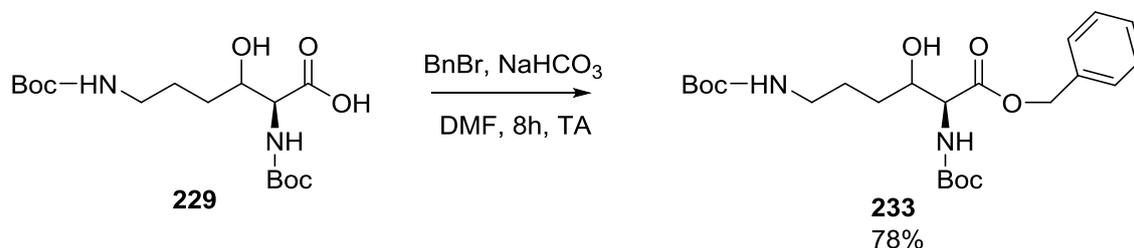
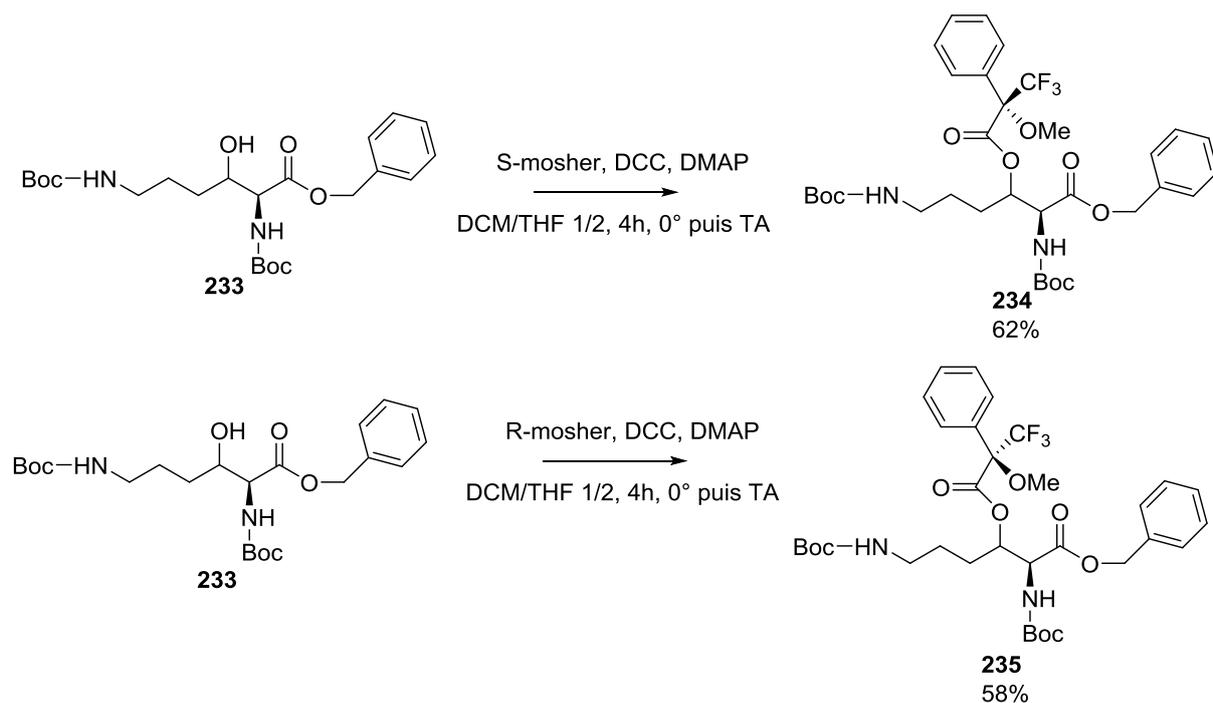


Schéma 64 : protection de la 3-OH-L-lysine sous forme d'ester benzylique

Les esters de Mosher **234** et **235** ont été obtenus par couplage entre le produit protégé **233** et l'acide (*S*) d'une part, et l'acide (*R*) d'autre part, en présence de DCC et de DMAP, avec des rendements de 62 et 58% respectivement (Schéma 65).

Schéma 65 : dérivatisation de la 3-OH-L-lysine avec le (*R*)- et le (*S*)-Mosher

L'analyse en RMN et la superposition des spectres obtenus pour ces deux esters montre très clairement des différences de déplacement (Figure 34).

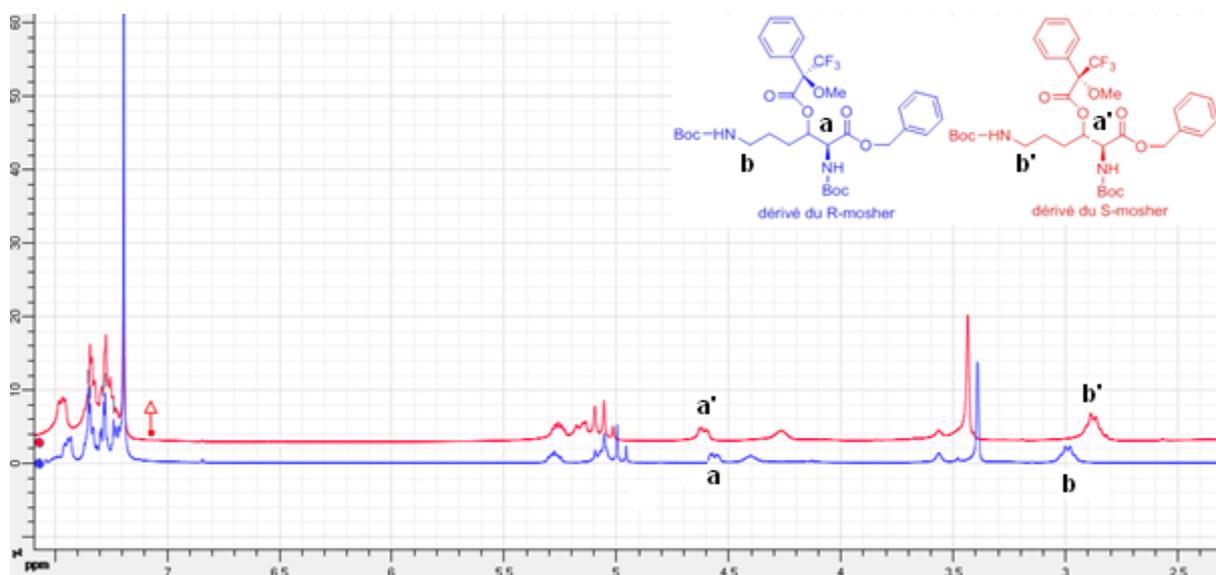


Figure 34 : spectres RMN obtenus après dérivatisation avec les acides de Mosher

Le calcul, pour chaque signal, du  $\Delta\delta(\text{SR})$  a permis de déterminer la stéréochimie de notre composé. En effet, les  $\Delta\delta(\text{SR})$  calculés pour les signaux de la partie « chaîne principale de

l'acide aminé » sont positifs et ceux de la partie « chaîne latérale de l'acide aminé » sont négatifs (Figure 35), nous avons donc un centre asymétrique de configuration *S*.

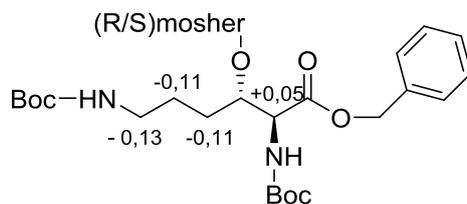


Figure 35 : différences de déplacements observés par RMN

L'enzyme LDO1 forme, à partir de la L-lysine, la (3*S*)-3-hydroxy-L-lysine (**230**). C'est la première fois que ce composé est synthétisé. Le diastéréoisomère (3*R*)-hydroxy-L-lysine a déjà été obtenu par voie de synthèse conventionnelle en six étapes à partir du 4-chloro-1-butanol avec un rendement global de 30%<sup>143</sup>.

#### IV.4.2.c- Purification du produit formé par LDO2

Le protocole mis au point pour l'isolement et la purification du produit de LDO1 a été appliqué pour le produit obtenu avec LDO2. Lors de la purification nous avons observé la formation d'un nouveau produit, moins polaire que le produit attendu. L'analyse RMN du mélange obtenu nous a permis de déterminer que ce produit était la lactone **237** obtenue par cyclisation intramoléculaire du composé hydroxylé protégé **236**, lors de la purification sur la colonne (Schéma 66).

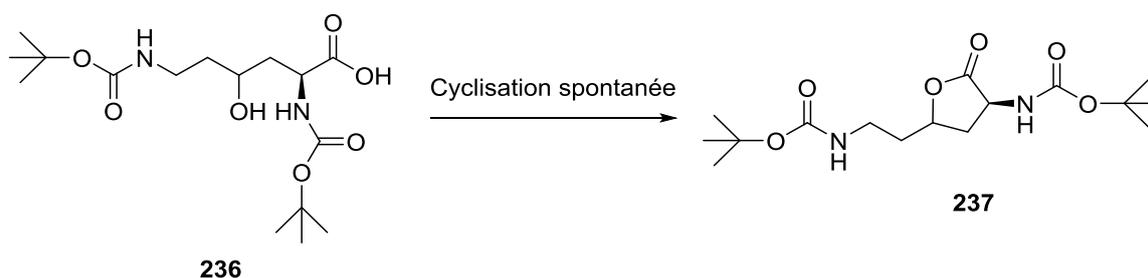


Schéma 66 : cyclisation spontanée de la 4-OH-L-lysine

Comme nous n'avons pas réussi à séparer ces deux composés, nous avons favorisé la formation de la lactone en laissant le produit brut, avant purification, en solution dans le dichlorométhane, une nuit à TA. Après purification, le produit lactonisé protégé est obtenu

<sup>143</sup>Masse, C. E.; Morgan, A. J.; Panek, J. S., *Organic letters* **2000**, 2 (17), 2571-2573

avec un rendement de 78%. Le produit lactonisé a ensuite été déprotégé avec du HCl 4M dans le dioxane pour conduire à la 4-OH-L-lysine **238** avec un rendement quantitatif. Le rendement total pour la synthèse du dérivé cyclique de la 4-hydroxy-L-lysine est de 75% (Schéma 67).

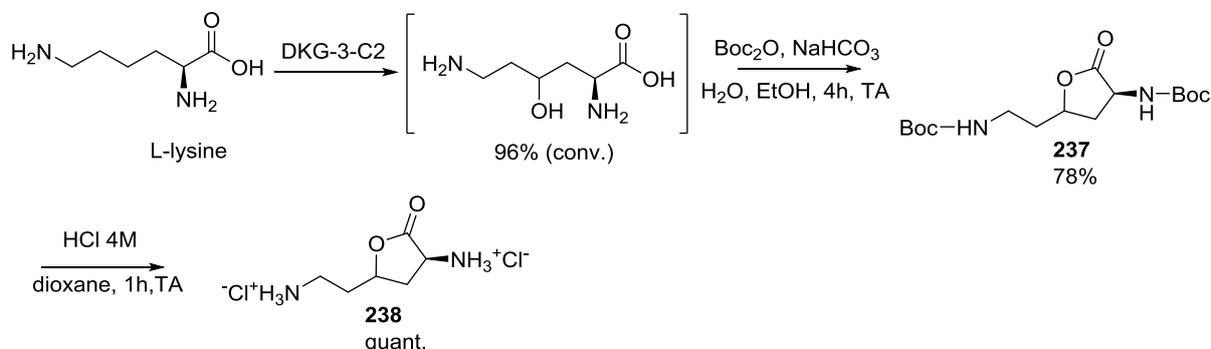


Schéma 67 : synthèse et purification de la 4-OH-L-lysine sous sa forme cyclique

#### IV.4.2.d- Caractérisation du produit formé par LDO2

La configuration absolue du C4 a été déterminée RMN 2D NOESY. La comparaison du point de fusion avec celui reporté dans la littérature a permis de confirmer la stéréochimie<sup>144</sup>. L'enzyme LDO2 catalyse donc l'hydroxylation de la L-lysine en (4R)-hydroxy-L-lysine (**239**) que nous avons isolée et caractérisée sous sa forme cyclisée **238** (Figure 36).

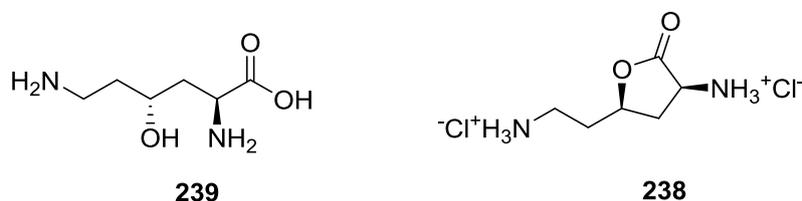


Figure 36 : produit formé et produit isolé issus de LDO2

Des dérivés de la (4R)-hydroxy-L-lysine protégés sur le  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>, sur le COOH, sur le 4-OH et sur le  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> ont été obtenus par des voies de synthèse multi étapes<sup>145</sup>, ainsi que des composés précurseurs dans lesquels la fonction  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> est masquée sous forme de triazide N<sub>3</sub><sup>146</sup>.

<sup>144</sup>Izumiya, N.; Fujita, Y.; Irreverre, F.; Witkop, B., *Biochemistry* **1965**, 4 (11), 2501-2507.

<sup>145</sup>Yang, R.; Pasunooti, K. K.; Li, F.; Liu, X.-W.; Liu, C.-F., *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131 (38), 13592-13593.

<sup>146</sup>Marin, J.; Briand, J.-P.; Guichard, G., *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, 2008 (6), 1005-1012.

## IV.4.2.e- Purification et caractérisation du produit formé par LDO3

Les études sur LDO3 ont montré que cette enzyme catalyse, tout comme LDO2 la réaction d'hydroxylation stéréosélective de la L-lysine en (4*R*)-4-hydroxy-L-lysine (**239**) (Figure 37).

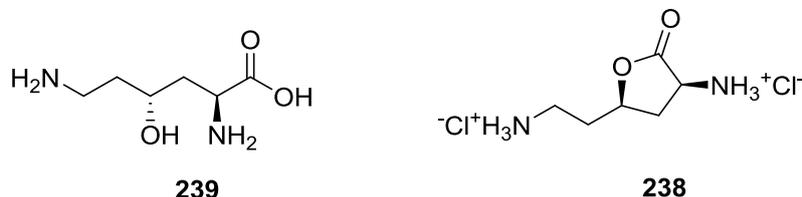


Figure 37 : produit formé et produit isolé issus de LDO3

LDO3 est cependant moins active que LDO2 sur la L-lysine. Il a en effet été nécessaire lors de l'étape de montée en échelle de travailler à une concentration d'enzyme de 0,086 mg/mL contre 0,031 mg/mL pour LDO2. La (4*R*)-4-hydroxy-L-lysine cyclisée **238** a tout de même été isolée, selon le même protocole, avec un rendement global de 65%.

## IV.5.2.f- Purification et caractérisation des produits formés par OADO

Le protocole d'isolement et de purification mis au point pour les hydroxylysines a été appliqué pour isoler le produit d'oxydation de la L-ornithine. Pour le produit d'oxydation de la L-arginine, nous avons dû mettre au point un autre protocole et le produit a été caractérisé après dérivatisation au DNFB

## IV.5.2.f.1- Purification du produit formé par OADO avec la L-ornithine

En suivant le protocole mis au point précédemment, nous avons obtenu la 3-hydroxy-L-ornithine **241** avec un rendement global de 42% (Schéma 68).

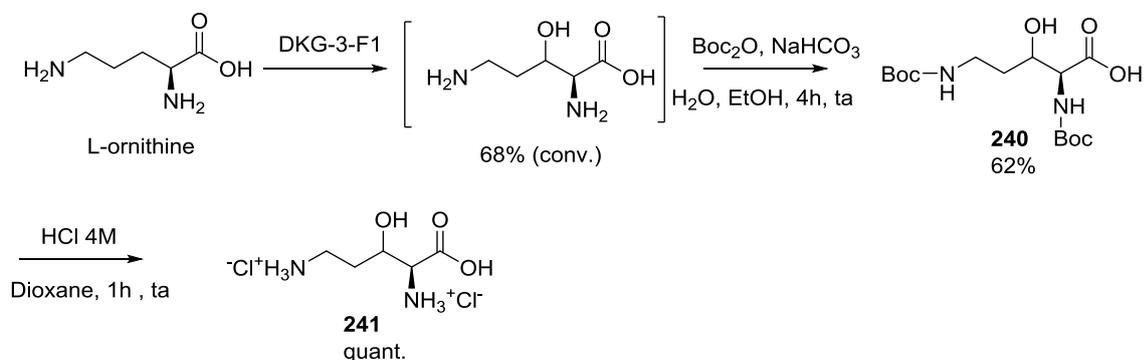


Schéma 68 : synthèse et purification de la 3-OH-L-ornithine

## IV.5.2.f.2- Caractérisation du produit formé par OADO sur la L-ornithine

La configuration absolue du C3 a été déterminée par comparaison des constantes de couplage  $J_{H2-H3}$  avec celles de la (3*S*)-hydroxy-L-lysine et des hydroxy-L-ornithines décrites dans la littérature<sup>147</sup> (Figure 38).

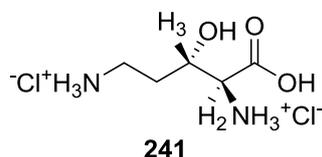


Figure 38 : structure du produit formé par OADO avec la L-ornithine

## IV.5.2.f.3- Purification du produit formé par OADO avec la L-arginine

En 2004, Thomas *et al.*<sup>148</sup> ont caractérisé l'activité de l'enzyme VioC dans la voie de biosynthèse de la viomycine. VioC hydroxyle la L-arginine en C3 pour donner la (3*S*)-3-hydroxy-L-arginine. Le produit d'hydroxylation a été directement purifié du milieu enzymatique par passage sur une résine échangeuse d'ions suivie d'une précipitation dans l'éthanol. Nous n'avons pas pu reproduire ce protocole car avec OADO, la conversion de la L-arginine en produit hydroxylé n'est pas totale et le problème est justement la séparation du produit hydroxylé du substrat de départ. Nous avons donc appliqué le protocole mis au point pour la purification des lysines hydroxylées. La dérivatisation des arginines par un groupement Boc s'est révélée compliquée, faute au noyau guanidinium que nous n'avons pas réussi à protéger malgré les différents protocoles testés. Le produit hydroxylé mono protégé sur le N $\alpha$ , n'a pas une différence de polarité suffisante avec la L-arginine pour permettre une bonne séparation. La dérivatisation au Fmoc-Cl n'a pas non plus permis de séparer les deux produits pour les mêmes raisons. Un protocole permettant de protéger l'arginine sur le N $\alpha$  et deux fois sur le noyau guanidinium avec un groupement Cbz<sup>149</sup> a également été essayé mais la purification a été compliquée et les produits n'ont pas pu être séparés. Nous nous sommes finalement tournés vers une dérivatisation avec le DNFB, pour au moins pouvoir caractériser le produit même si ce groupement ne peut pas être coupé et ne permet pas d'obtenir *in fine* l'hydroxyarginine.

<sup>147</sup>Wityak, J.; Gould, S. J.; Hein, S. J.; Keszler, D. A., *The Journal of organic chemistry* **1987**, 52 (11), 2179-2183.

<sup>148</sup>Ju, J.; Ozanick, S. G.; Shen, B.; Thomas, M. G., *ChemBioChem* **2004**, 5 (9), 1281-5.

<sup>149</sup>Jetten, M.; Peters, C. A. M.; van Nispen, J. W. F. M.; Ottenheijm, H. C. J., *Tetrahedron Letters* **1991**, 32 (42), 6025-6028.

Le produit dérivatisé a ainsi pu être purifié par HPLC préparative et isolé un rendement total de 36 % (Schéma 69). Les analyses RMN ont permis de déterminer que la L-arginine est hydroxylée en C3.

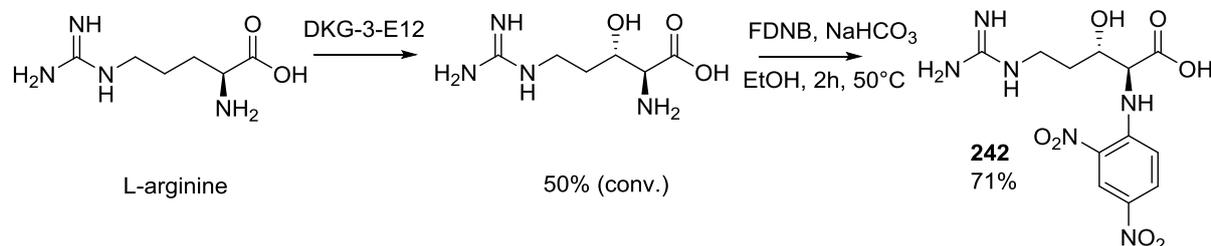


Schéma 69 : synthèse et purification de la 3-OH-L-arginine sous sa forme DNB

#### IV.5.2.f.4- Caractérisation du produit formé par OADO avec la L-arginine

La configuration absolue du C3 a été déterminée par comparaison des constantes de couplage du produit avec la (3S)-3-hydroxy-L-ornithine dérivatisé au FDNB **243**. Les constantes de couplage  $J_{H_2-H_3}$  sont identiques (Figure 39).

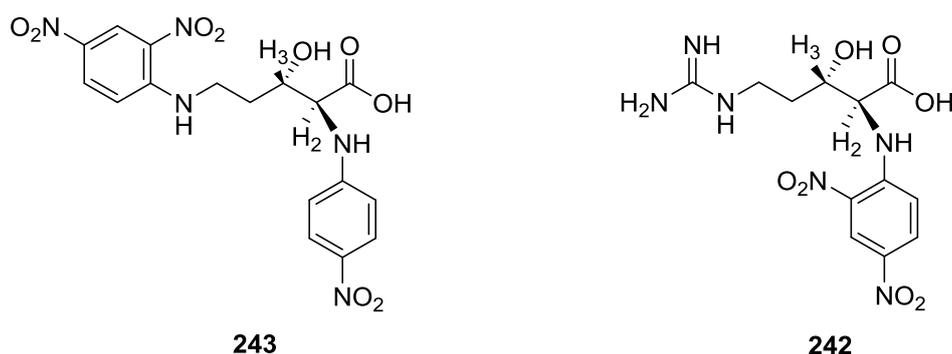


Figure 39 : structure des produits formés par OADO

L'enzyme OADO catalyse donc l'hydroxylation de la L-arginine en C3 pour donner la (3S)-hydroxy-L-arginine (**244**), ce qui n'est pas surprenant puisqu'elle conduit à la formation de la (3S)-3-hydroxy-L-ornithine (figure 40). Le produit obtenu avec OADO sur la L-arginine est le même que celui obtenu avec VioC, l'enzyme de la voie de biosynthèse de la viomycine, VioC et OADO ont 44% d'identité.

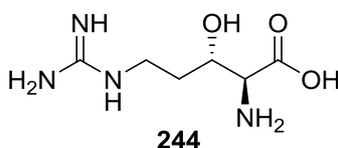


Figure 40 : (3S)-hydroxy-L-arginine obtenue avec OADO

Les (3*R*)-hydroxy-L-ornithine, (3*S*)-hydroxy-L-ornithine, (3*R*)-hydroxy-L-arginine et (3*S*)-hydroxy-L-arginine ont également été obtenues par synthèse chimique en six étapes à partir de l'acide L-glutamique<sup>147</sup>. Des dérivés protégés sur tous les hétéroatomes ont également été décrits<sup>150</sup>.

#### IV.6- Etude de la promiscuité de LDO1, LDO2, LDO3 et OADO

Pour compléter l'étude des quatre nouvelles  $\alpha$ -KAO, une étude sur la promiscuité de substrat de ces enzymes a été effectuée avec 25 substrats présentant des variations structurales autour de la L-Lys, la L-Orn et L-Arg. Nous avons testé les trois acides aminés en série D, les acides aminés avec la fonction acide protégée sous forme d'ester méthylique, les dérivés sans fonction acide et les dérivés *N* $\alpha$  acétyl. Des acides aminés avec une chaîne latérale modifiée ont également été testés comme la thia-L-lysine dont le C4 est remplacé par un atome de soufre, *N* $\epsilon$ -Me-L-lysine et la L-citrulline qui est un analogue de la L-arginine avec une fonction urée. Deux substrats non commerciaux ont été synthétisés, la L-ornithine méthylester (**245**) selon un protocole déjà décrit<sup>151</sup> et la  $\beta$ -lysine (**247**) à partir du produit diprotégé commercial 246 (Schéma 70).

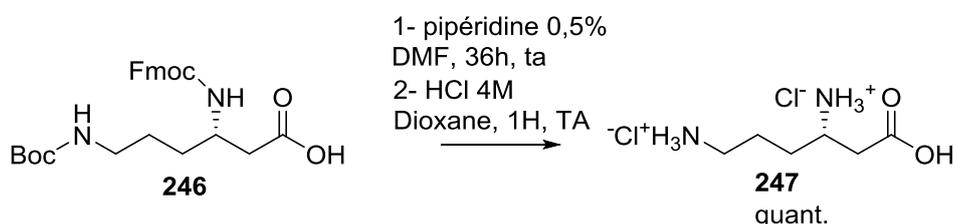


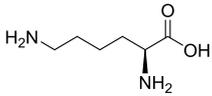
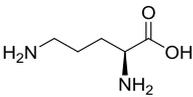
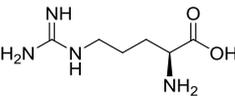
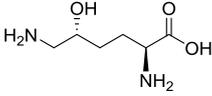
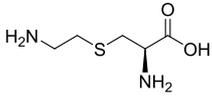
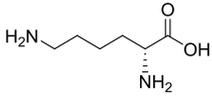
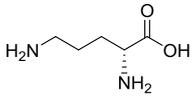
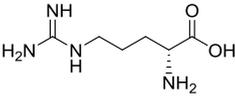
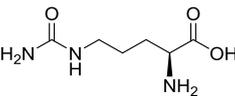
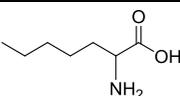
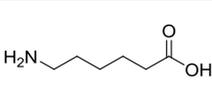
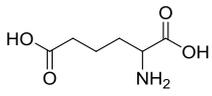
Schéma 70 : synthèse de la  $\beta$ -Lysine

Les réactions ont été effectuées dans les conditions mises au point précédemment en présence de LDO1, LDO2, LDO3 et OADO à une concentration de de 0,08 mg/mL pendant trois heures à température ambiante. Les réactions ont été suivies par HPLC après dérivatisation au Fmoc-Cl (Tableau 19). Avec ces conditions réactionnelles LDO1, LDO2, LDO3 catalysent la formation de (3*S*)-3-hydroxy-L-lysine et la (4*R*)-4-hydroxy-L-lysine avec respectivement 61%, 65% et 49% de conversion. Avec ces mêmes conditions, OADO catalyse la formation de (3*S*)-3-hydroxy-L-ornithine et (3*S*)-3-hydroxy-L-arginine avec respectivement 11% et 10% de conversion.

<sup>150</sup>Gregory, N., WO0127084, **2000**.

<sup>147</sup>Wityak, J.; Gould, S. J.; Hein, S. J.; Keszler, D. A., *The Journal of organic chemistry* **1987**, 52 (11), 2179-2183.

<sup>151</sup>Stranix, B. R., 0151546 A1, **2002**.

Substrats	LDO1	LDO2	LDO3	OADO
L-lysine 	<b>61%</b>	<b>65%</b>	<b>49%</b>	négatif
L-ornithine 	négatif	négatif	négatif	<b>11%</b>
L-arginine 	négatif	négatif	négatif	<b>10%</b>
(5R)-hydroxy-L-lysine 	<b>56%</b>	<b>15%</b>	<b>11%</b>	négatif
Thia-L-lysine 	négatif	<b>56%</b>	<b>31%</b>	négatif
D-lysine 	négatif	négatif	négatif	négatif
D-ornithine 	négatif	négatif	négatif	négatif
D-arginine 	négatif	négatif	négatif	négatif
L-citrulline 	négatif	négatif	négatif	négatif
2-aminoheptanoic acid 	négatif	négatif	négatif	négatif
6-aminohexanoic acid 	négatif	négatif	négatif	négatif
2-aminoadipic acid 	négatif	négatif	négatif	négatif
Cadaverine 	négatif	négatif	négatif	négatif

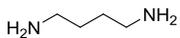
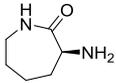
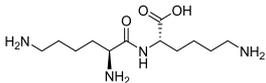
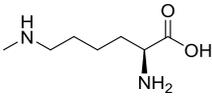
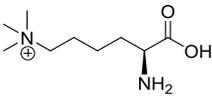
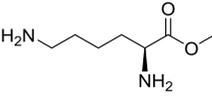
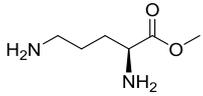
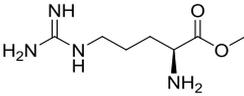
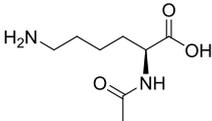
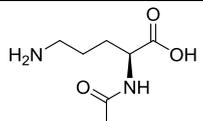
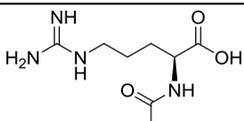
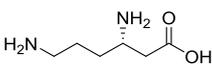
Substrats		LDO1	LDO2	LDO3	OADO
Putrescine		négatif	négatif	négatif	négatif
L-(-)- $\alpha$ -Amino- $\epsilon$ -caprolactam		négatif	négatif	négatif	négatif
L-Lysil-L-lysine		négatif	négatif	négatif	négatif
<i>N</i> $\epsilon$ -Me-L-lysine		négatif	négatif	négatif	négatif
<i>N</i> $\epsilon$ -Me <sub>3</sub> -L-lysine		négatif	négatif	négatif	négatif
L-lysine methyl ester		négatif	négatif	négatif	négatif
L-ornithine methyl ester		négatif	négatif	négatif	négatif
L-arginine methyl ester		négatif	négatif	négatif	négatif
<i>N</i> $\alpha$ -acetyl-L-lysine		négatif	négatif	négatif	négatif
<i>N</i> $\alpha$ -acetyl-L-ornithine		négatif	négatif	négatif	négatif
<i>N</i> $\alpha$ -acetyl-L-arginine		négatif	négatif	négatif	négatif
$\beta$ -L-lysine		négatif	négatif	négatif	négatif

Tableau 19

Après analyse des résultats, peu de substrats ont été acceptés :

- LDO1 est active sur la (5*R*)-5-OH-L-lysine,
- LDO2 et LDO3 sont actives sur la (5*R*)-5-OH-L-lysine et la thia-L-lysine,
- OADO n'est active sur aucun autre substrat que L-Arg et L-Orn.

Au final, les quatre nouvelles  $\alpha$ -KAO se sont donc révélées être très spécifiques en substrat. Les fonctions acides, amines et le noyau guanidine sont très importants car la modification d'une seule de ces fonctions induit une perte totale de l'activité. Par contre, des modifications au niveau de la chaîne carbonée avec le remplacement d'un carbone par un hétéroatome ou l'ajout de fonction alcool semblent être mieux acceptées. Par exemple, la thia-L-lysine est substrat de LDO2 et LDO3 sans perte d'activité et la (5*R*)-5-OH-L-lysine est acceptée par les trois enzymes LDO1, LDO2 et LDO3. L'activité sur la thia-L-lysine est intéressante parce qu'il s'agit certainement d'une sulfoxydation. Une montée en échelle doit être réalisée pour permettre la caractérisation du produit formé.

#### IV.7- Modélisation moléculaire

Une étude de modélisation moléculaire a été réalisée par Karine Bastard du Laboratoire d'Analyses Bioinformatiques pour la Génomique et le Métabolisme (LABGeM) pour étudier la fixation du substrat dans le site actif et comprendre la spécificité très forte de substrat des enzymes LDO1, LDO2, LDO3 et OADO. La modélisation moléculaire repose sur des principes de mécanique moléculaires où l'énergie des atomes est calculée au moyen d'approximations semi-classiques.

Toute molécule étant l'association de divers atomes, la cohésion de cet ensemble résultant des interactions -répulsives et attractives- entre les atomes va être modélisée par un système purement mécanique de forces, sans prendre en compte la nature microscopique et électrostatique (quantique) des interactions entre les électrons et les noyaux. La modélisation moléculaire représente les atomes par des sphères et les liaisons entre les atomes par des ressorts.

L'énergie d'une molécule ou d'un complexe moléculaire dépend des positions relatives de ses atomes. Cette énergie peut être approximée comme étant la somme de plusieurs contributions. Elle correspond à :

- l'énergie de liaison (traduit la compression ou l'extension d'une liaison à partir de sa longueur d'équilibre),
- l'énergie de flexion (angle de courbure d'une liaison par rapport à sa valeur d'équilibre),
- l'énergie de torsion,
- l'énergie d'interaction entre deux atomes non liés.

L'objectif étant d'obtenir un modèle avec la plus faible énergie possible. Pour cette étude deux techniques de modélisation ont été utilisées. D'abord, la modélisation par homologie. Elle se base sur un concept simple. Des séquences proches ont des repliements proches, comme on le constate pour des protéines ayant des taux de similitude de séquence supérieures à 30 %. L'utilisateur fournit un alignement où se trouvent les séquences des structures connues et la séquence qu'il va devoir utiliser pour la construction du modèle structural. La structure est modélisée en fonction de cet alignement en respectant des contraintes spatiales. Pour prédire la structure des quatre enzymes, les structures des  $\alpha$ -KAO AsnO<sup>85</sup>, VioC<sup>86</sup> et CAS<sup>107</sup> ont été utilisées comme modèles.

La deuxième technique est le docking moléculaire. Il consiste à prédire à la fois la conformation active et l'orientation du substrat dans la poche catalytique de l'enzyme. La grande majorité des méthodes de docking utilisent soit le principe de complémentarité stérique soit le calcul d'interactions moléculaires. Généralement, plusieurs poses du ligand sont générées et classées par ordre de probabilité décroissante selon une fonction d'évaluation qui au mieux essaiera d'approximer l'énergie libre de liaison du substrat à l'enzyme (c'est-à-dire son affinité).

Les structures RX d'AsnO, VioC et CAS sont disponibles. Ces trois enzymes ont été prises comme base pour une modélisation par homologie des quatre  $\alpha$ -KAO. LDO1, LDO2, et OADO ont pu être ainsi modélisées (Figure 41). Pour LDO3, le modèle généré n'est pas correctement construit au niveau de la poche arrière et l'hydroxylysine ne peut pas se glisser dans le site actif. Un travail additionnel serait nécessaire pour modéliser cette poche arrière correctement.

---

<sup>85</sup>Strieker, M.; Kopp, F.; Mahlert, C.; Essen, L. O.; Marahiel, M. A., *ACS Chem Biol* **2007**, 2 (3), 187-96.

<sup>86</sup>Helmetag, V.; Samel, S. A.; Thomas, M. G.; Marahiel, M. A.; Essen, L. O., *Febs J* **2009**, 276 (13), 3669-82.

<sup>107</sup>Zhang, Z.; Ren, J.; Harlos, K.; McKinnon, C. H.; Clifton, I. J.; Schofield, C. J., *FEBS Lett* **2002**, 517 (1-3), 7-12.

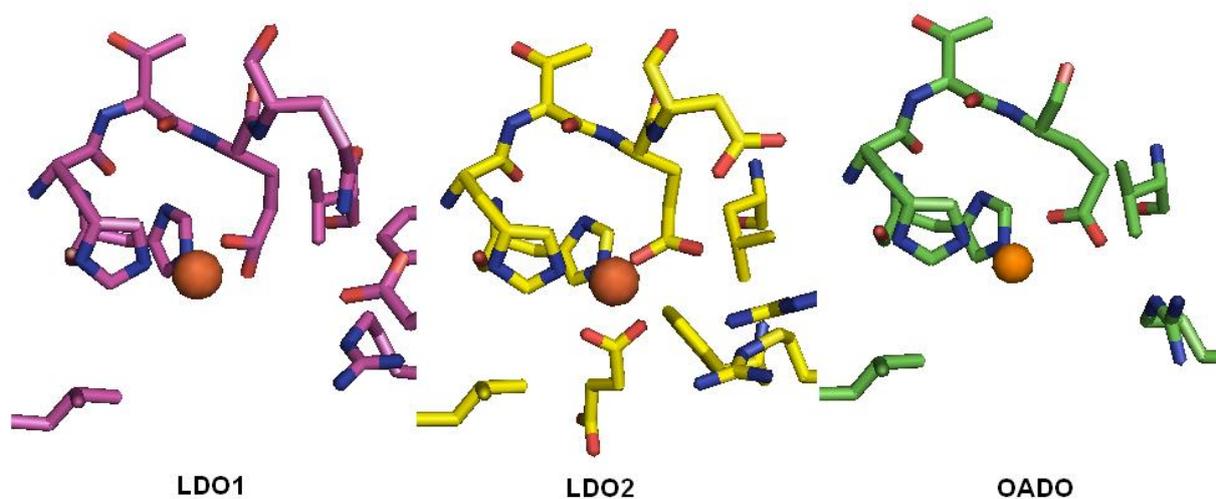


Figure 41 : modélisation du site actif de LDO1, LDO2 et OADO

La superposition des trois modèles de LDO1, LDO2 et OADO montre la présence des deux histidines et du glutamate constituant la triade catalytique retrouvée chez toutes les  $\alpha$ -KAO. Une leucine est également présente dans les trois  $\alpha$ -KAO modélisées. Pour le reste, la composition en acides aminés des sites actifs est différente (Figure 42).

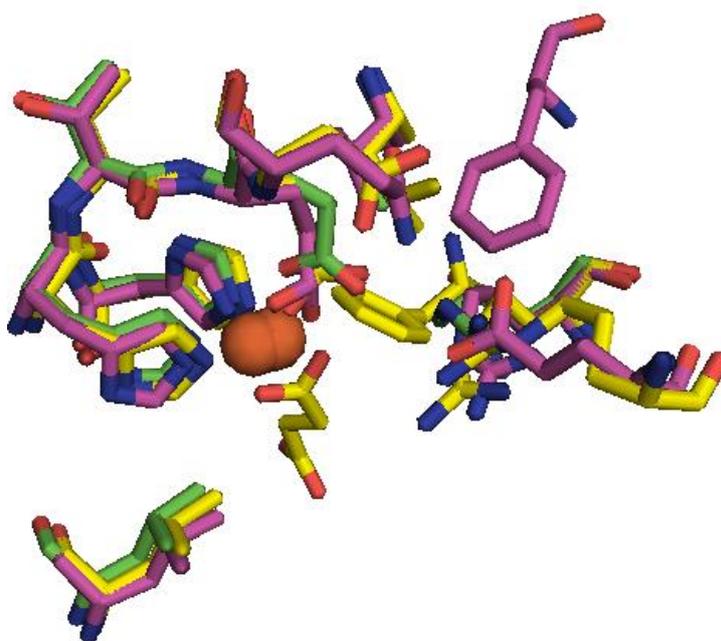


Figure 42 : superposition des sites actifs de LDO1, LDO2 et OADO

La modélisation des produits dans les sites actifs montre l'importance de certains résidus pour la fixation des substrats/produits (Figure 43). Pour LDO1 (3-OH-L-lysine en rose pâle), la fonction acide est à moins de 3Å du résidu arginine 332. L'amine de la chaîne principale se situe à moins de 3Å des résidus glutamate 147 et aspartate 234. L'amine de la chaîne latérale est située à moins de 3Å du résidu aspartate 268.

Pour LDO2 (4-OH-L-lysine en marron), la fonction acide est à moins de 3Å des résidus arginine 151 et arginine 344. L'amine de la chaîne principale se situe à moins de 3Å du résidu aspartate 236. L'amine de la chaîne latérale ne possède pas de résidu pouvant établir des liaisons situés à moins de 3Å.

Pour OADO (3-OH-L-arginine en jaune), la fonction acide est située à moins de 3Å du résidu glutamine 116. L'amine de la chaîne principale se situe à moins de 3Å du résidu aspartate 236. Les atomes d'azote du noyau guanidinium possèdent deux résidus à moins de 4Å : le glutamate 135 et la sérine 212.

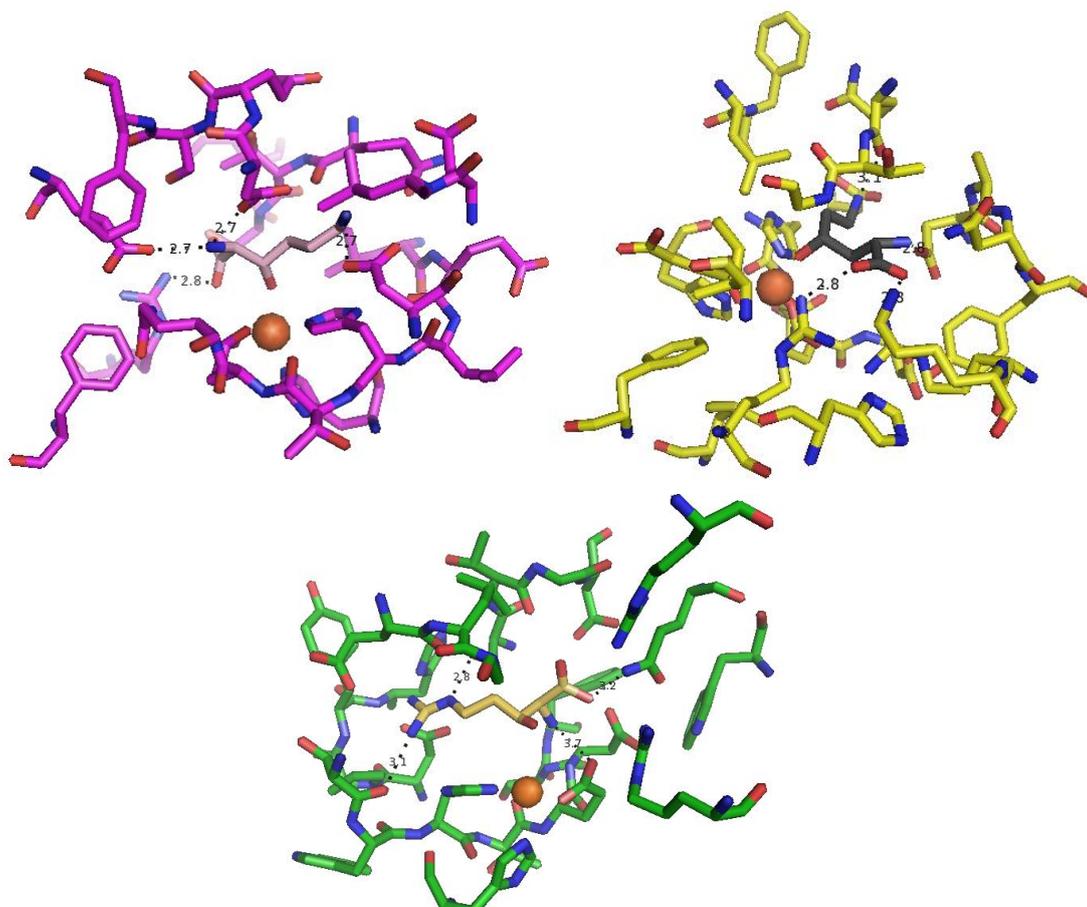


Figure 43 : modélisation du produit dans le site actif de LDO1, LDO2 et OADO

## V-5 Conclusion

L'étude des quatre nouvelles  $\alpha$ -KAO LDO1, LDO2, LDO3 et OADO s'est révélée très fructueuse. LDO1, LDO2, LDO3 ont permis la synthèse stéréospécifique et régio- et stéréosélective de la (3*S*)-3-hydroxy-L-lysine avec un rendement de 73% et de la (4*R*)-4-hydroxy-L-lysine, obtenue ici sous sa forme cyclisée avec un rendement de 74%, à partir de la L-lysine. Par action sur la L-ornithine OADO a conduit à la formation de la (3*S*)-3-hydroxy-L-ornithine avec un rendement de 42%, OADO est également active sur la L-arginine et le dérivé DNB de la (3*S*)-3-hydroxy-L-arginine a été obtenu avec un rendement de 35% (Figure 44).

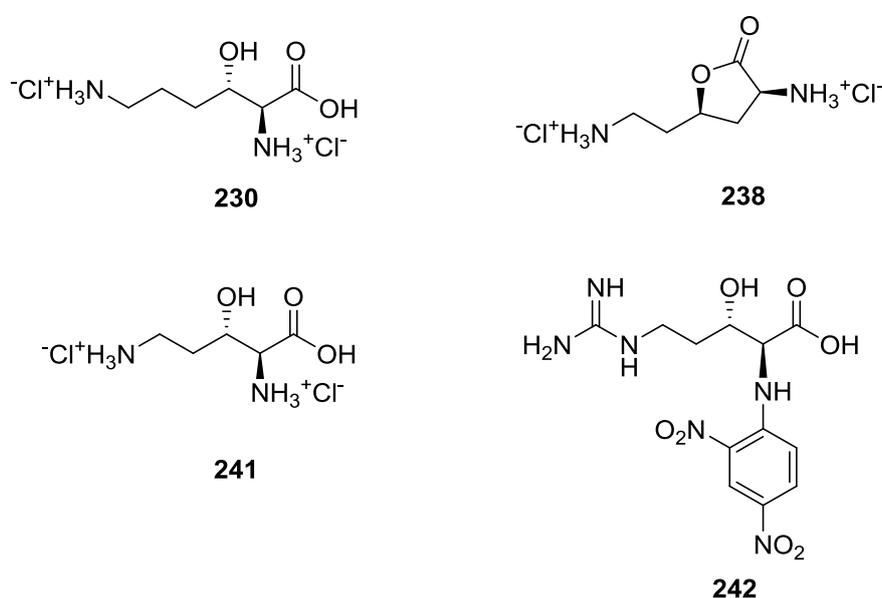


Figure 44 : produits obtenus à partir des nouvelles  $\alpha$ -KAO

Les rendements obtenus sont comparables ou supérieurs à ceux décrits dans la littérature pour la synthèse des mêmes composés.

Il est notable que sur ces quatre nouvelles  $\alpha$ -KAO, une seule, LDO1 (C7QJ42) a une annotation correspondant à une activité dioxygénase  $\alpha$ -cétoglutarate dépendante (clavaminase synthase). Les trois autres sont annotées comme protéines non caractérisées.

Ces quatre protéines se ressemblent peu, sauf pour LDO2 et LDO3 actives sur les mêmes substrats, et elles sont également assez éloignées des  $\alpha$ -KAO caractérisées ayant une activité sur des acides aminés ou des dérivés d'acides aminés. Nous avons regroupé dans les tableaux 20 et 21 les comparaisons entre les séquences protéiques de nos quatre  $\alpha$ -KAO et avec les séquences les plus proches. Les identités les plus fortes sont avec les protéines actives sur

l'arginine (VioC), et un dérivé de l'arginine (MppO) et sur l'asparagine (AsnO). Il faut noter que deux de ces nouvelles  $\alpha$ -KAO, LDO2 (C7PLM6) et LDO3 (A5FF23) ont été trouvées par le motif InterPro, montrant ainsi la pertinence de cette approche complémentaire de la recherche par homologie de séquence.

	LDO1	LDO2	LDO3	OADO
LDO1 (C7QJ42)		<30%	<30%	<30%
LDO2 (C7PLM6)	<30%		63%	<30%
LDO3 (A5FF23)	<30%	63%		<30%
OADO (C7Q942)	<30%	<30%	<30%	

Tableau 20

	VioC (Q6WZB0)	mppO (Q643C1)	AsnO (Q9Z4Z5)
LDO1 (C7QJ42)	32%	30%	32%
LDO2 (C7PLM6)	<30%	<30%	<30%
LDO3 (A5FF23)	<30%	<30%	<30%
OADO (C7Q942)	44%	43%	31%

Tableau 21

Ces quatre enzymes se sont révélées être très spécifiques en substrat et n'acceptant que de très légères modifications du squelette de base. Les études de modélisation moléculaire ont permis de modéliser trois  $\alpha$ -KAO et les résultats obtenus sont en concordance les résultats expérimentaux et permettent d'expliquer la forte spécificité de substrat des  $\alpha$ -KAO.



# **Chapitre V**

## **Applications**



# Chapitre V

## Applications

### V.1- Introduction

Les acides aminés et dérivés constituent une classe de blocs de construction chiraux pour la synthèse organique. Les acides  $\alpha$ -aminés possèdent un atome de carbone chiral et deux groupes fonctionnels et peuvent ainsi être transformés en une grande variété de composés. Avec les quatre nouvelles  $\alpha$ -KAO découvertes, nous avons pu synthétiser trois acides aminés hydroxylés de manière totalement stéréosélective et ces dérivés d'acides aminés ont un fort potentiel pour la synthèse de molécules d'intérêt.

Sans modification structurale, les résidus arginyl, lysyl et ornithyl mono- ou di-hydroxylés sont retrouvés dans des peptides antibiotiques<sup>152</sup>. En quelques étapes, ils peuvent être transformés en polyamines hydroxylées et acides  $\omega$ -aminés hydroxylés.

A partir d'acides  $\alpha$ -aminés protéinogènes à chaîne latérale basique, on peut envisager la synthèse de dérivés mono ou dihydroxylés, en une étape, ou en couplant plusieurs étapes enzymatiques, avec comme première étape, la réaction d'hydroxylation avec l'une de nos quatre  $\alpha$ -KAO.

Dans un premier temps, nous avons synthétisé le dérivé dihydroxylé de la L-lysine. Nous nous sommes aussi intéressés à la possibilité d'obtenir des aminoalcools, très souvent utilisés comme blocs de construction chiraux pour la synthèse de molécules plus complexes<sup>153</sup>, par réactions cascade avec un ou deux étapes d'hydroxylation suivie d'une décarboxylation.

---

<sup>152</sup>Gualtieri, M., WO2013045600A1, 2013.

<sup>153</sup>Marino, S. T.; Stachurska-Buczek, D.; Huggins, D. A.; Krywult, B. M.; Sheehan, C. S.; Nguyen, T.; Choi, N.; Parsons, J. G.; Griffiths, P. G.; James, I. W.; Bray, A. M.; White, J. M.; Boyce, R. S., *Molecules* **2004**, 9 (6), 405-26.

## V.2- (3,5)-dihydroxy-L-lysine et (4,5)-dihydroxy-L-lysine

Lors des études sur la promiscuité de substrat (chapitre IV), nous avons observé une activité de LDO1, LDO2 et LDO3 sur la (5*R*)-5-hydroxy-L-lysine. Nous avons étudié les activités de LDO1 et LDO2 sur ce substrat, et pour les deux enzymes de très bonnes conversions ont été obtenues (> 90%). Nous avons également testé la possibilité de convertir la 5-hydroxy-L-lysine en (3,4,5)-trihydroxy-L-lysine mais aucun produit n'a pu être détecté en HPLC. Les montées en échelle des réactions des LDO1 et LDO2 sur la 5-hydroxy-L-lysine seront réalisées pour permettre de déterminer les structures des produits même si on peut penser que les régio et stéréosélectivités seront conservées.

## V.3- Synthèse de la (3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxy-L-lysine sous forme cyclique

Nous avons vu au chapitre précédent que trois de nos  $\alpha$ -KAO étaient actives sur le même substrat, la L-lysine, avec des régiosélectivités différentes, hydroxylation en C3 pour LDO1 et en C4 pour LDO2 et LDO3. Nous avons donc étudié la possibilité d'obtenir la dihydroxylation en couplant l'activité en C3 de LDO 1 avec celle en C4 de LDO2 ou 3. Cette étude a été initiée par Marine Harrari, stagiaire M1 de Paris Sud Orsay, et poursuivie par Adam Monfleur, stagiaire M2 de Paris 7 Diderot.

### V.3.1- Etudes des conditions réactionnelles de la cascade

Nous avons travaillé avec LDO3 car un test d'activité préliminaire a montré que les deux enzymes étaient actives sur la (3*S*)-3-hydroxy-L-lysine mais que LDO3 donnait une meilleure conversion.

Dans un premier, nous avons testé la faisabilité de cette cascade en effectuant trois tests : les enzymes LDO1 et LDO3 en même temps, les ajouts séquentiels LDO1 puis LDO3 et LDO3 puis LDO1. Le seul résultat a été obtenu avec l'ajout séquentiel LDO1 puis LDO3 car LDO1 n'est pas active sur le produit de LDO3, la (4*R*)-4-hydroxy-L-lysine. Les conditions de réaction ont donc été adaptées de manière à obtenir, avec l'enzyme LDO1, 100% de conversion en trois heures sur la L-lysine. Après ces trois heures, l'enzyme LDO3 est ajoutée pour convertir la (3*S*)-3-hydroxy-L-lysine formée en dihydroxy-L-lysine et c'est sur ce point-là que des optimisations ont été effectuées. Nous avons optimisé différents paramètres de la réaction. Les conditions retenues sont présentées dans le tableau 22.

Etape 1	[ ] finale (mM)	Etape 2	[ ] finale (mM)
1M HEPES pH 7,5	50	$\alpha$ -cetoglutarate	15
L-lysine	10	$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1
$\alpha$ -cetoglutarate	15	ascorbate	2,5
ascorbate	2,5	LDO3	0,31 mg/mL
H <sub>2</sub> O		Volume total	500 $\mu\text{L}$
LDO1	0,13 mg/mL	600 rpm, 18h, TA	
$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1		
Volume total	220 $\mu\text{L}$		
600 rpm, 3h, TA			

Tableau 22

## V.3.2- Montée en échelle

La montée en échelle a été lancée en 4x10 mL dans quatre erlenmeyers de 250 mL. La réaction a été agitée à 600 rpm et à TA. La conversion de la L-lysine a été suivie par HPLC après dérivatisation au Fmoc-Cl, en trois heures la réaction est totale (Figure 45-A). La seconde enzyme, les cofacteurs et l'ascorbate, sont ensuite ajoutés. Après agitation à 600 rpm, pendant six heures à TA, la conversion était d'environ 50% (Figure 45-C) et de 90% après 21 heures de réaction (Figure 45-D).

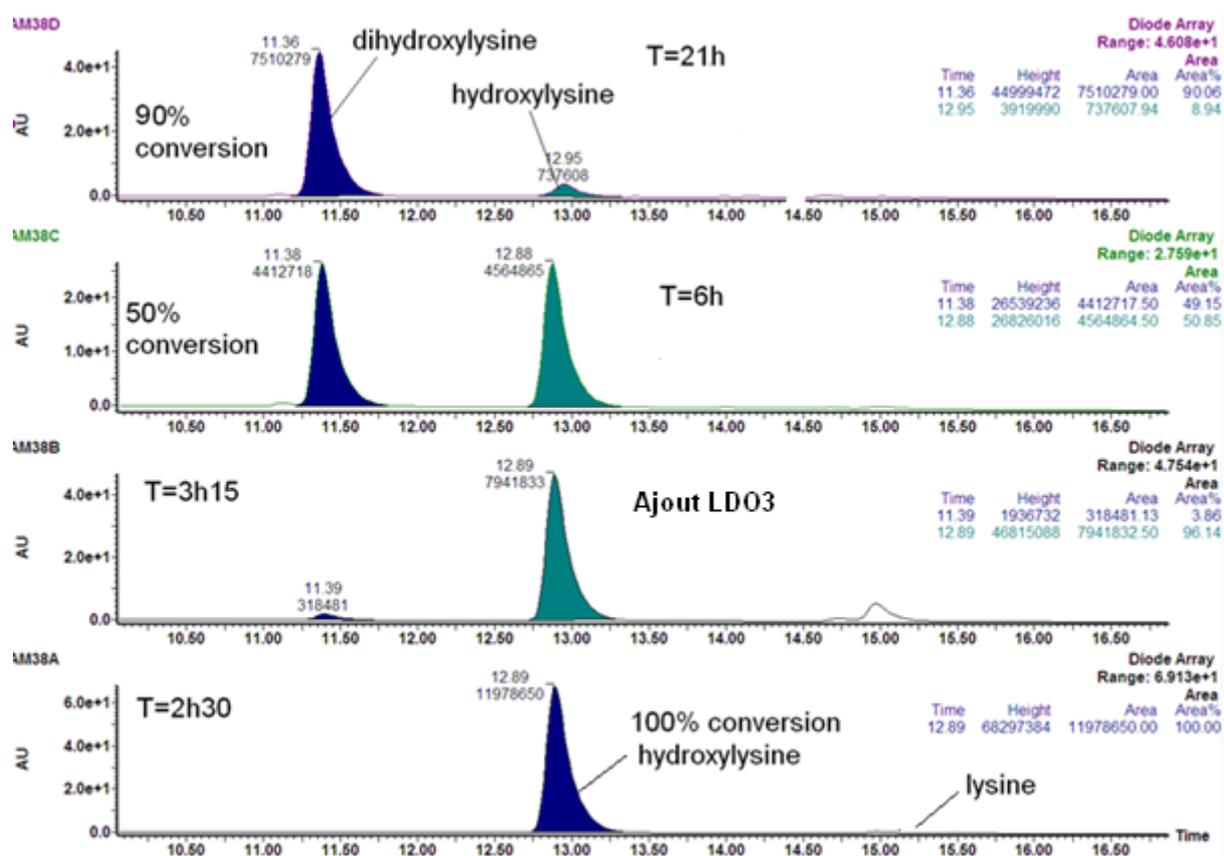


Figure 45 : suivi de la cascade enzymatique par HPLC

## V.3.2.a- Purification du produit formé

Le composé a été isolé et caractérisé après protection par le  $\text{Boc}_2\text{O}$ , purification, coupure des groupements protecteurs selon le protocole mis au point précédemment. Comme pour la (4S)-4-hydroxy-L-lysine, une cyclisation spontanée après dérivatisation a été observée et nous avons donc isolé la dihydroxy-L-lysine **249** sous forme cyclique avec un rendement total de 53% (Schéma 71).

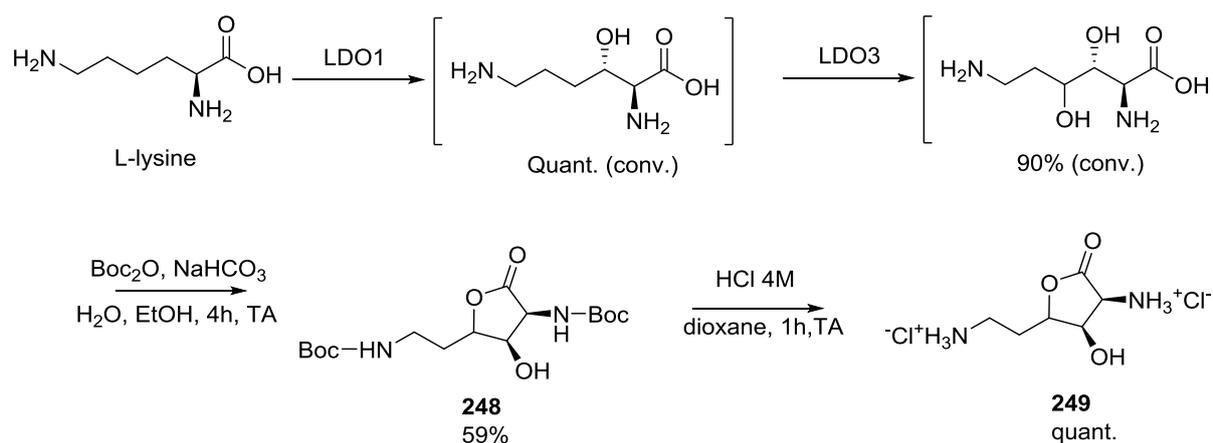


Schéma 71 : purification de la (3,4)-di-OH-L-lysine sous sa forme cyclique

### V.3.2.a- Caractérisation du produit formé

Les petites constantes de couplage  $J_{\text{H}_2\text{H}_3}$  et  $J_{\text{H}_3\text{H}_4}$  et les corrélations observées par RMN 2D NOESY et ROESY nous ont permis de conclure que la configuration absolue du C4 était conservée. Le produit de dihydroxylation formé est donc la (3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxy-L-lysine isolée sous sa forme cyclique (Figure 46).

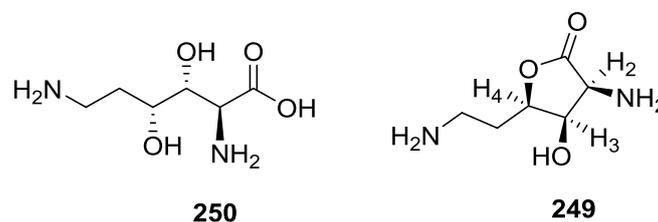


Figure 46 : produit formé et produit isolé issus de la cascade enzymatique

## V.4- Diamines hydroxylées

### V.4.1- Intérêt

Les diamines sont des plateformes de grand intérêt pour la synthèse de polymères bioplastiques ; on les retrouve aussi comme motifs dans des composés à activité biologique naturels et synthétiques, *e.g.* le venin d'araignée NPTX-1. (Figure 47)

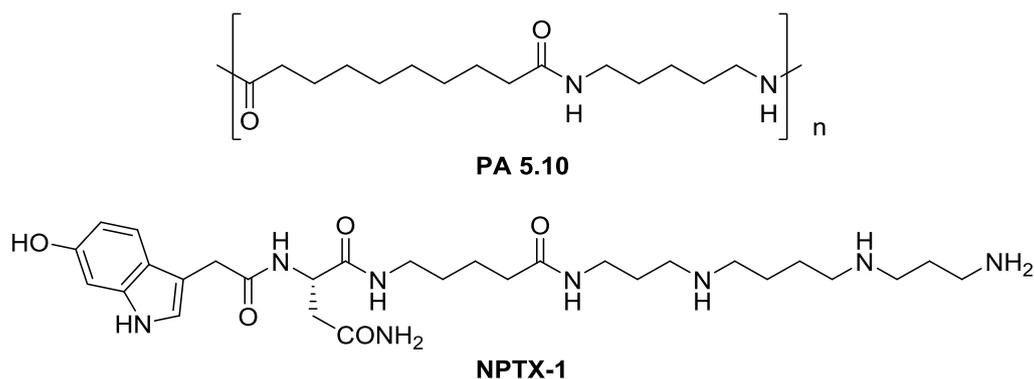


Figure 47 : composés à activité biologique avec un motif « diamine »

Chez les bactéries les voies de biosynthèse des diamines sont bien connues à partir des acides aminés à chaîne latérale basique, L-lysine, L-arginine et L-ornithine, par décarboxylation et leur production par ingénierie métabolique a été étudiée dans différentes souches bactériennes<sup>154,155</sup>.

Les hydroxy-putrescine et cadavérine sont les analogues hydroxylés des diamines, elles ont été synthétisées par voie chimique conventionnelle<sup>156,157</sup>. On les retrouve comme motif de base dans l'hypusine, un acide aminé inhabituel rencontré chez les eucaryotes et certaines archées, et dans des composés à activité biologique comme des oxazolidinones et des analogues de l'érythromycine (Figure 48)<sup>158,159</sup>

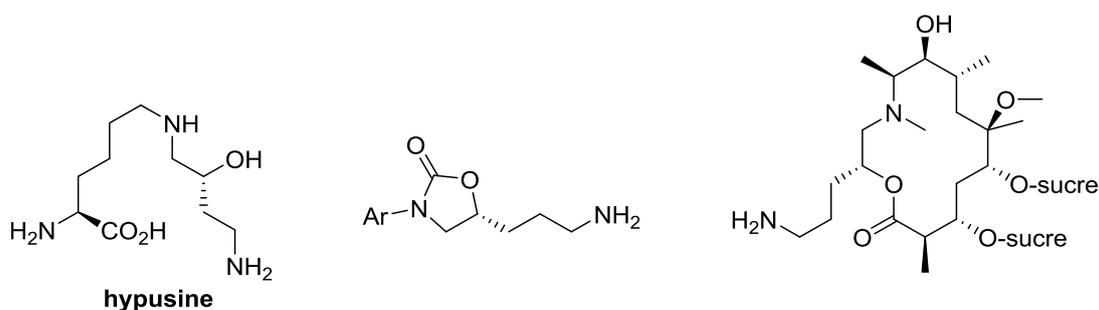


Figure 48

<sup>154</sup>Kind, S.; Wittmann, C., *Applied microbiology and biotechnology* **2011**, 91 (5), 1287-96.

<sup>155</sup>Schneider, J.; Wendisch, V. F., *Applied microbiology and biotechnology* **2011**, 91 (1), 17-30.

<sup>156</sup>Lindstedt, S.; Lindstedt, G., *The Journal of organic chemistry* **1963**, 28 (1), 251-252.

<sup>157</sup>Kayatani, T.; Hayashi, Y.; Suzuki, M.; Uehara, A., *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1994**, 67 (11), 2980-2989.

<sup>158</sup>Gude, M., WO 2010 041219, **2009**.

<sup>159</sup>Chikauchi, K., EP 1985620, **2008**.

Ces molécules présentent donc un intérêt en synthèse. La production par voie biocatalytique de diverses diamines mono et dihydroxylées peut être envisagée en couplant une ou deux étapes d'hydroxylation avec l'une des quatre  $\alpha$ -KAO LDO1, LDO2, LDO3 et OADO4, avec une étape de décarboxylation. Trois hydroxydiamines et une dihydroxydiamine pourraient ainsi être obtenues. (Figure 49).

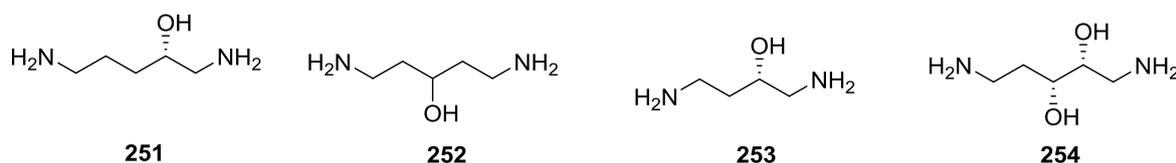


Figure 49 : structure des produits potentiels issus du couplage  $\alpha$ -KAO/décarboxylase

#### V.4.2- Recherche de décarboxylases

Comme précisé plus haut, les diamines sont biosynthétisées par simple décarboxylation des acides aminés correspondant. De nombreuses lysine décarboxylases (LDC EC4.1.1.18) et ornithine décarboxylases (ODC EC4.1.1.17) ont été étudiées<sup>160</sup>. Il a été montré que l'activité de décarboxylation pouvait être promiscuitaire et certaines LDC décarboxylent l'ornithine<sup>161,162</sup>. Au laboratoire nous disposons d'une collection de décarboxylases et trois décarboxylases d'*Acinetobacter baylyi* *adp1*, l'ACIAD3341, l'ACIAD2768 et l'ACIAD2660, annotées respectivement « putative arginine/lysine/ornithine decarboxylase », « putative ornithine decarboxylase » et « diaminopimelate decarboxylase » ont été sélectionnées pour être testées. L'ACIAD2660 n'a pas été sélectionnée directement en fonction de son annotation mais à partir du motif InterPro commun avec des arginine/lysine/ornithine decarboxylases (IPR000183). A ces trois enzymes, nous avons ajouté deux décarboxylases issues des mêmes souches bactériennes que LDO2 et LDO3, *Flavobacterium johnsoniae* et *Chitinophaga pinensis*, car l'étude des contextes génomiques a montré que ces deux décarboxylases C7PLM7 et A5FF25 en étaient en syntenie avec les LDO2 et LDO3 (C7PLM6 et A5FF23 respectivement) (Tableau 23).

<sup>160</sup>Lee, J.; Michael, A. J.; Martynowski, D.; Goldsmith, E. J.; Phillips, M. A., *J Biol Chem* **2007**, 282 (37), 27115-25.

<sup>161</sup>Takatsuka, Y.; Yamaguchi, Y.; Ono, M.; Kamio, Y., *J Bacteriol* **2000**, 182 (23), 6732-41.

<sup>162</sup>Takatsuka, Y.; Onoda, M.; Sugiyama, T.; Muramoto, K.; Tomita, T.; Kamio, Y., *biotechnology, and biochemistry* **1999**, 63 (6), 1063-9.

UniproKB	Annotation	Organisme
ACIAD3341	putative arginine/lysine/ornithine decarboxylase	<i>Acinetobacter baylyi</i> adp1
ACIAD2768	putative ornithine decarboxylase	<i>Acinetobacter baylyi</i> adp1
ACIAD2660	diaminopimelate decarboxylase	<i>Acinetobacter baylyi</i> adp1
A5FF25	Pyridoxal-dependent decarboxylase	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>
C7PLM7	Pyridoxal-dependent decarboxylase	<i>Chitinophaga pinensis</i>

Tableau 23

#### V.4.3- Test des décarboxylases sur la L-lysine et L-ornithine

L'activité de ces cinq enzymes a d'abord été vérifiée sur L-lysine et L-ornithine. Ces cinq enzymes ont dans un premier temps été produites sous forme de lysat brut et testées dans des conditions classiquement utilisées<sup>163</sup> en présence de PLP et DTT à 37°C (Tableau 24). Les réactions ont été suivies par HPLC après dérivation du milieu au Fmoc-Cl. Au final, les cinq enzymes se sont révélées être positives sur la L-lysine et L-ornithine avec formation de cadaverine et de putrescine, les plus actives étant les trois ACIAD avec des conversions quantitatives.

	[ ] finale (mM)		[ ] finale (mM)
Tampon HEPES pH 7,5		Tampon HEPES pH 7,5	
L-lysine	5	L-ornithine	5
PLP	1	PLP	1
DTT	1	DTT	1
décarboxylase	0,09-0,43 mg/mL	décarboxylase	0,09-0,43 mg/mL
37°C, 18 h, 1000 rpm		37°C, 18 h, 1000 rpm	

Tableau 24

#### V.4.4- Réactions en cascade

Ces cinq enzymes ont ensuite été testées dans les réactions de décarboxylation des mono et dihydroxy-L-lysines et de la hydroxy-L-ornithine. Nous avons donc ajouté l'étape de décarboxylation à la suite de l'étape d'hydroxylation dans un processus en cascade. Dans le cas de la dihydroxylysine, nous avons enchainé les trois étapes.

<sup>163</sup>Médici, R.; de María, P. D.; Otten, L. G.; Straathof, A. J. J., *Advanced Synthesis & Catalysis* **2011**, 353 (13), 2369-2376.

Les réactions ont été suivies par HPLC après dérivatisation du milieu réactionnel par le Fmoc-Cl. La décarboxylase a été ajoutée après vérification de la totale conversion de l'acide aminé en dérivé hydroxylé. Nous avons d'abord étudié la décarboxylation de la (3*S*)-3-hydroxy-L-lysine. La décarboxylase a été ajoutée au milieu sous forme purifiée, avec du DTT et du PLP. Les cinq décarboxylases ont été testées, les conditions réactionnelles sont réunies dans le tableau 25.

Etape 1	[ ] finale (mM)	Etape 2	[ ] finale (mM)
1M Hepes pH 7,5	50	étape 1	
L-lys	5	PLP	1
$\alpha$ -cetoglutarate	15	DTT	1
ascorbate	0	décarboxylase	0,24 mg/mL
H <sub>2</sub> O		37°C, 18 h, 1000 rpm	
F1 purifiée	0,18 mg/mL		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1		
TA, 18 h, 600 rpm			

Tableau 25

Seules les décarboxylases issues de l'analyse du contexte génomique se sont révélées très actives sur la (3*S*)-3-hydroxy-L-lysine avec des conversions en (2*S*)-1,5-diamino-2-pentanol (**251**) supérieures à 90% en 18 heures (Figure 50). Le même mode opératoire a été utilisé pour la (4*R*)-4-hydroxy-L-lysine, la (3*S*)-3-hydroxy-L-ornithine et la (3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxy-L-lysine. Pour la (4*R*)-4-hydroxy-L-lysine la conversion en 1,5-diamino-3-pentanol (**252**) a été totale, pour la (3*S*)-3-hydroxy-L-ornithine, une conversion en (2*S*)-1,4-diamino-2-butanol (**253**) d'environ 50% a été obtenue. Par réaction cascade enchaînant deux étapes successives d'hydroxylation et une étape de décarboxylation, le (2*S*,3*S*)-1,5-diamino-2,3-pentane-1,2-diol (**254**) a été obtenu à partir de la L-lysine avec une conversion d'environ 90%. Dans tous les cas, les décarboxylases issues du contexte génomique se sont révélées être les plus efficaces. Les chromatogrammes obtenus de la décarboxylation de la (3*S*)-3-hydroxy-L-ornithine, la (4*R*)-4-hydroxy-L-lysine et la (3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxy-L-lysine sont disponibles en partie expérimentale.

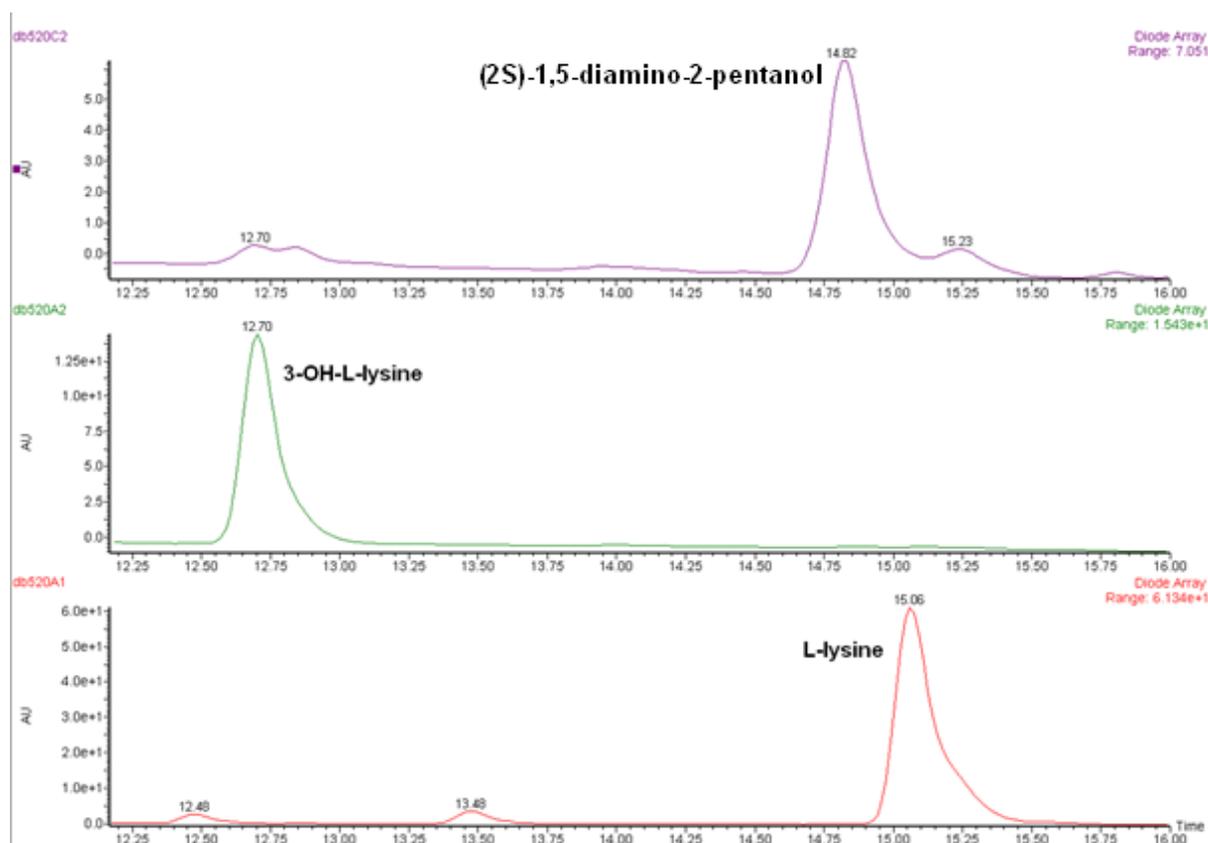


Figure 50: suivi de la cascade LDO1/décarboxylase

Les montées en échelle qui permettront d'isoler et caractériser de façon définitive ces dérivés diaminés n'ont pas encore été réalisées. Elles seront effectuées prochainement. Ce premier travail sur la décarboxylation et les résultats obtenus nous permettent d'être optimistes quant à la production de dérivés de diamines chirales par voie biocatalytique en cascade.

#### V.5- Conclusion

Deux applications pour la synthèse de composés d'intérêt ont été réalisées. La première est la dihydroxylation catalytique de la L-lysine conduisant à la (3R,4R)-3,4-dihydroxy-L-lysine (Figure 51) isolée sous sa forme cyclique avec un rendement total de 53%.

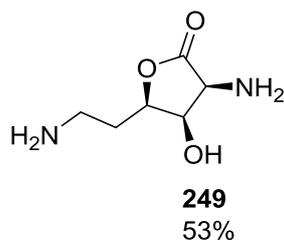


Figure 51 : produit isolé issu de la cascade enzymatique LDO1/LDO3

La deuxième application est la synthèse d'hydroxy-putrescine et cadavérines, qui sont retrouvés dans des composés à activité biologique naturels et synthétiques. Le couplage de nos quatre  $\alpha$ -KAO avec une décarboxylase a permis la formation de trois hydroxydiamines et d'une dihydroxydiamine : le (2*S*)-1,5-diamino-2-pentanol, le 1,5-diamino-3-pentanol, le (2*S*,3*S*)-1,5-diamino-2,3-pentanediol et le (2*S*)-1,4-diamino-2-butanol (Figure 52). Les montées en échelle seront réalisées prochainement.

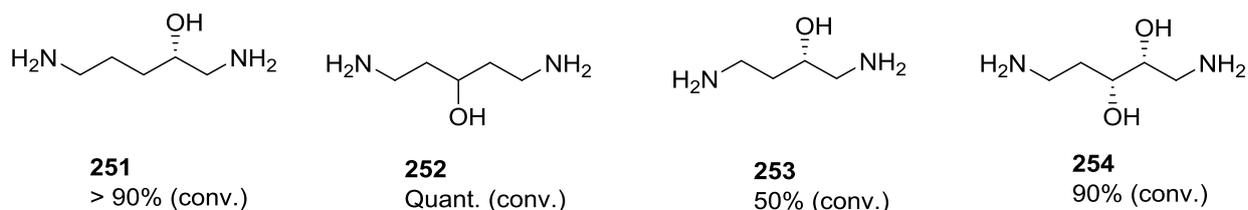


Figure 52 : composés issus du couplage  $\alpha$ -KAO/décarboxylase



# **Conclusion générale**



## Conclusion générale

Les objectifs de mon travail de recherche étaient triples :

- la découverte de nouvelles dioxygénases  $\alpha$ -cétoglutarate et fer dépendantes et plus particulièrement des dioxygénases étant actives sur des amines ou des acides pouvant conduire à la production d'aminoalcool ou d'acides aminés non protéinogènes,
- les étudier et caractériser les produits formés,
- développer des applications pour montrer l'intérêt que peut représenter pour le chimiste organicien cette famille d'enzyme.

De nouvelles  $\alpha$ -KAO ont été trouvées par exploration de la biodiversité par approche génomique. Une recherche basée sur l'homologie de séquences et le partage d'un même domaine InterPro a permis de sélectionner 340 séquences candidates. Après clonage et surexpression, au total 203  $\alpha$ -KAO candidates ont été obtenues. Les enzymes candidates ont été criblées en deux fois, 78 enzymes sur 23 substrats pour le premier criblage et 125 enzymes pour le second sur 36 substrats. La détection basée sur le dosage de l' $\alpha$ -cétoglutarate résiduel a été adaptée pour la détection de l'activité  $\alpha$ -KAO.

Après criblage et vérification des activités, huit nouvelles  $\alpha$ -KAO ont été découvertes. Parmi ces huit enzymes, trois d'entre elles ont montré une activité sur un substrat jamais décrit dans la littérature : la L-lysine, et une active sur la L-arginine, substrat connu, a montré une activité sur la L-ornithine. Ces quatre enzymes ont donc été étudiées en priorité. Après optimisation des conditions de réactions, montée en échelle, purification et caractérisation, deux produits issus de l'hydroxylation de la L-lysine ont été obtenus de manière totalement stéréospécifique et stéréosélective : la (3*S*)-3-hydroxy-L-lysine avec un rendement global de 73%, et la (4*R*)-4-hydroxy-L-lysine obtenue sous forme cyclique avec deux enzymes, LDO2 et LDO3, avec des rendements de 75 et 65% respectivement. La quatrième enzyme, OADO, active sur L-arginine et L-ornithine, a également été étudiée plus en détail. Bien qu'après optimisation, toutes conditions égales par ailleurs, elle se soit révélée bien moins active que

les trois premières enzymes, une montée en échelle a été réalisée et nous a permis d'obtenir stéréospécifiquement et stéréosélectivement la (3*S*)-3-hydroxy-L-ornithine avec un rendement global de 42%. L'enzyme OADO a également été active sur la L-arginine mais le produit n'a pu être isolé que sous une forme dérivatisé. Cela nous a tout de même permis de caractériser le produit formé par l'enzyme, il s'agit de (3*S*)-3-hydroxy-L-arginine.

Toutes les enzymes se sont révélées être totalement stéréospécifiques et stéréosélectives, l'étude de leur promiscuité de substrats a montré qu'elles sont de manière générale très spécifiques, n'acceptant des substrats que structurellement très proches. L'exploitation de cette « légère » promiscuité nous a permis de montrer qu'il était possible d'obtenir des dérivés dihydroxylés de la L-lysine, soit en partant de la (5*R*)-5-hydroxy-L-lysine par action de LDO1 ou de LDO2 pour former la (3,5)-dihydroxy-L-lysine ou la (4,5)-dihydroxy-L-lysine, respectivement, soit en couplant les activités LDO1 et LDO3 en cascade et ainsi la (3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxy-L-lysine a été obtenue sous forme cyclique avec un rendement global de 53%.

Des travaux sont également en cours sur le couplage de ces  $\alpha$ KAO avec des décarboxylases pour la formation de dérivés hydroxylés de la cadaverine et la putrescine : le (2*S*)-1,5-diamino-2-pentanol, le 1,5-diamino-3-pentanol, le (2*R*,3*R*)-1,5-diamino-2,3-pentane-1,2-diol et le (2*S*)-1,4-diamino-2-butanol. Les activités décarboxylases ont été confirmées par HPLC et les conversions observées très fortes. Les montées en échelle seront effectuées prochainement.

L'approche génomique développée dans ce projet, associant recherche par homologie et partage d'un domaine InterPro, a permis d'enrichir le petit catalogue des  $\alpha$ KAO caractérisées. Les études menées sur quatre d'entre elles, ont montré que ces nouvelles enzymes sont très spécifiques et n'acceptent qu'un nombre très restreint de substrats. Elles pourraient faire l'objet d'évolution par mutagenèse afin de modifier leur spécificité et ainsi élargir leur champ d'applications.

# **Experimental part**



# Experimental part

## Summary

Materials and methods .....	173
A- Cloning and candidate enzymes production .....	175
B- Purification of enzymes .....	175
C- Substrate synthesis .....	177
D- High throughput screening .....	185
E- Isolation and characterisation of LDO1 product: <u>(3S)-3-hydroxy-L-lysine</u> .....	187
F- Isolation and characterisation of LDO2 and LDO3 product: cyclic derivative of <u>(4R)-4-hydroxy-L-lysine</u> .....	197
G- Isolation and characterisation of ODAO product: <u>(3S)-3-hydroxy-L-ornithine</u> .....	199
H- Isolation and characterisation of OADO product: <u>(3S)-3-hydroxy-L-arginine</u> as its DNB derivative .....	205

I- Isolation and characterization of the LDO1 – LDO3 cascade product: <u>(3<i>R</i>,4<i>R</i>)-3,4-dihydroxy-L-lysine</u> as its cyclic derivative .....	207
J- Enzymatic synthesis of (2 <i>S</i> )-1,5-diamino-2-pentanol, 1,5-diamino-3-pentanol, (2 <i>S</i> )-1,4-diamino-2-butanol and (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )-1,5-diamino-2,3-pentanediol .....	211
K- Exploration of substrate promiscuity .....	217
L- General protocols for derivatization and HPLC conditions .....	221

## Materials and methods

### Reagents and solvents

All reagents and solvents were purchased from commercial sources and used without additional purification.

### Chromatography

Thin-layer chromatography (TLC) was performed with aluminium-backed sheets with silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck).

Preparative chromatography (PLC) was performed with glass-backed sheets with silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) with 0,5 or 1 mm for thickness.

Column chromatography was performed on a CombiFlash® Companion using Redisep® Rf or GraceResolv Silica cartridges.

HPLC analyses were performed on a Waters model 2795 liquid chromatograph provided with a Waters model 996 Photodiode Array Detector and Atlantis T3 5µm 4.6\*150 mm as column.

HPLC preparative purifications were performed on a Shimadzu Model LC-20AP and Xbridge prep C18 5 µm OBD 19\*150 mm as column.

### Physical and spectral data

NMR spectra were recorded on a Bruker 300 MHz spectrometer (Evry University, France). Chemical shifts (expressed in ppm) of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were referenced to the solvent peaks  $\delta(\text{H}) = 7.24$  and  $\delta(\text{C}) = 77.2$  for CDCl<sub>3</sub>,  $\delta(\text{H}) = 2.50$  and  $\delta(\text{C}) = 39.5$  for DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta(\text{H}) = 4.79$  for D<sub>2</sub>O. MeOH was used as standard ( $\delta(\text{C}) = 49.50$  when <sup>13</sup>C NMR spectra was done in D<sub>2</sub>O). Following abbreviations were used: s (singlet), d (doublet), t (triplet), dd (doublet of doublets), m (multiplet), br s (broad signal).

Mass spectra were recorded on a Thermo LTQ Orbitrap spectrometer in electrospray ionization method (positive ion mode ESI<sup>+</sup> or negative ion mode ESI<sup>-</sup>, high resolution).

Melting points were measured with a TA Instruments **Q100** Modulated Differential.

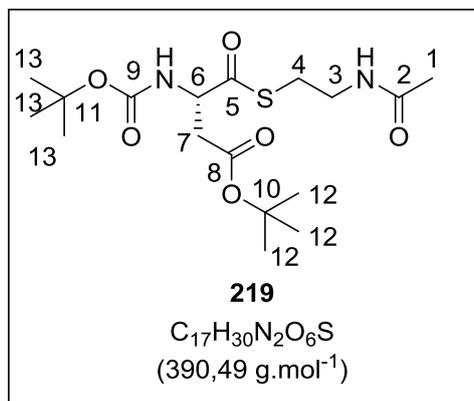
## **A- Cloning and Candidate Enzyme Production**

All steps from primers purchase to biochemical assays were performed in 96 micro-wells. The choice of the primers was based on the Primer3 program. Oligonucleotides were from Sigma-Genosys. Specific extensions are added to the primers for cloning into our plasmid pET22b(+) (Novagen) modified for ligation independent cloning. The forward primers introduced a hexahistidine sequence in the proteins after the initial methionine for purification purposes. Plasmids were then introduced into *E. coli* BL21 (DE3) plysE strains (Invitrogen) for over-expression. Cell cultures, isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction for protein production and cell extracts were then conducted as previously reported. For the production of the enzymes used for the initial high throughput screening, an adaption for 96-microwell plate conditions was needed. A 1.6 mL cell culture was induced for recombinant protein production in each well. After centrifugation, cells were suspended in 300 mL of 50 mM HEPES buffer pH 7.5 containing 50 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM Pefabloc SC and 0.2 mL Lysonase<sup>TM</sup> bioprocessing reagent (Merck), and sonicated using an ultrasonic bath (Bronson 2510 Ultrasonic Cleaner). After centrifugation to clarify the cell extract, the supernatants were analyzed by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDSPAGE) to check for recombinant protein production. Protein concentrations were determined by the Bradford method with bovine serum albumin as the standard (Bio-Rad). The samples were stored at -80 °C.

## **B- Purification of Enzymes**

After centrifugation, to clarify the cell extract, the supernatant was loaded onto a 1-ml HisTrap FF column (Amersham Biosciences) using an Äkta Explorer (Amersham Biosciences). After sample loading, the column was washed with lysis buffer and the protein was eluted with the same buffer containing 250 mM imidazole. Removal of imidazole and buffer exchange was carried out using a HiPrep 26/10 desalting column (Amersham Biosciences) and a mobile phase composed of 50 mM HEPES, pH 7.5, 50 mM NaCl, 10% glycerol, and 1 mM dithiothreitol. The protein was further purified by ion exchange using a MonoQ 5/50 GL column (Amersham Biosciences). The protein was eluted with a NaCl gradient ranging from 50mM to 1 M over 100 column volumes. Finally, the protein was submitted to gel filtration on a Superdex 200 column (Amersham Biosciences). The purified protein was stored at -80 °C. The samples were analyzed by SDS-PAGE using the Invitrogen NuPAGE system, according to the manufacturer's instructions.

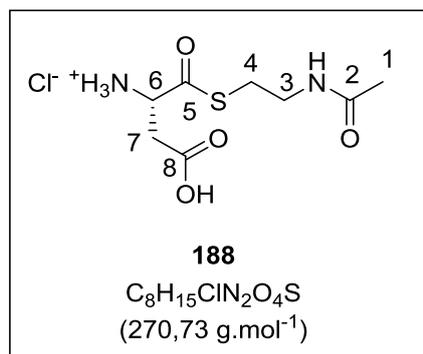


**C- Substrate synthesis****(219) (S)-tert-butyl-4-((2-acetamidoethyl)thio)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-4-oxo butanoate**

To a solution of *N*-acetylcysteamine (336  $\mu$ L, 2.30 mmol, 1.3eq.) in 50 mL of anhydrous DCM under  $N_2$ , was added (*S*)-4-(tert-butoxy)-4-oxo-2-pivalamidobutanoic acid solubilized in 15 mL of anhydrous DCM (512 mg, 1.77 mmol, 1 eq.). DMAP (345 mg, 2.83 mmol, 1.6 eq.) and EDC (384 mg, 2.8 mmol, 1.4 eq.) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature under  $N_2$  for 18 hours. The organic layer was washed with 4\*30 mL of ammonium chloride solution, 40 mL of saturated brine, then dried over magnesium sulphate, filtered and evaporated. Purification of the product by flash chromatography (70/30 petroleum ether/AcOEt) afforded 550 mg of **219** as a brown oil (1.40 mmol, 79 %).

**TLC Rf:** 0.5 (AcOEt).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 1.41-1.46 (d, 18H, H<sub>12</sub>,H<sub>13</sub>), 1.94 (s, 3H, H<sub>1</sub>), 2.66 (dd,  $J= 17$  et 4.5 Hz, 1H, H<sub>7</sub>) 2.92-2.97 (m, 1H, H<sub>7'</sub>), 2.97-3.10 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 3.40 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 4.55 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 5.65 (d,  $J= 9.5$  Hz, 1H, C<sub>6</sub>-NH), 5.92 (br s, 1H, C<sub>3</sub>-NH).

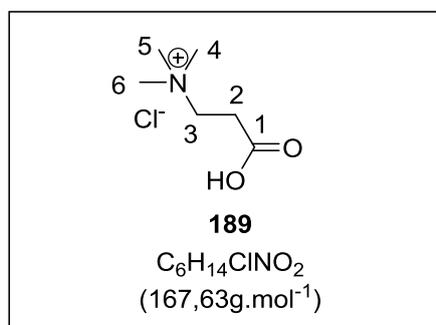
**(188) (S)-1-((2-acetamidoethyl)thio)-3-carboxy-1-oxopropan-2-aminium chloride**

Compound -- (647 mg, 1.65 mmol, 1eq.) was solubilized in HCl/dioxane 4M (4.7 mL, 19 mmol, 12 eq.) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 hours. Then, toluene was added (10 mL) and reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The white solid obtained was triturated in diethyl ether (3\*5 mL), filtered and dried under vacuum for 12 hours to give 451 mg of **188** as a white solid. (1.65 mmol, quantitative).

**TLC Rf:** 0.05 (AcOEt).

**RMN <sup>1</sup>H** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 1.77-1.82 (s, 3H, H1), 2.95-3.06 (m, 4H, H4,H7), 3.15-3.23 (m, 2H, H3), 3.53-3.59 (br s, 3H, C7-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) 4.35-4.45 (m, 1H, H5), 8.90 (m, 1H, C3-NH), 9.45 (br s, 1H, COOH).

**RMN <sup>13</sup>C** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz)  $\delta$  (ppm): 22.57 (C1), 28.44 (C3), 35.17 (C4), 37.76 (C7), 55.10 (C6), 169.51 (C2), 170.35 (C8), 195.31 (C5).

**(189) 2-carboxy-N,N,N-trimethylethanaminium chloride**

Protocol adapted from Fricker *et al.*<sup>134</sup>.

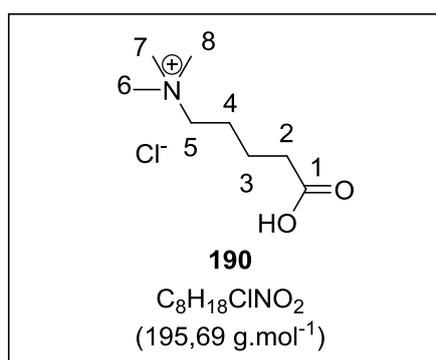
3-aminopropanoic acid (549 mg ; 6.16 mmol , 1eq.) and potassium bicarbonate (3.7 g ; 36.96 mmol ; 5 eq.) were added in 65 mL of methanol under N<sub>2</sub> under stirring. After 15 min, 2.1 mL of methyl iodide (33.89 mmol ; 5.5 eq.) were added. The reaction was stirred for 48 h at ambient temperature then the solvent was removed by evaporation under reduced pressure. The resulting white solid was washed four times with 30 mL of dichloromethane. The solid was then dissolved into 50 mL of HCl solution 10% in water, followed by removal of water by evaporation under reduced pressure. The resultant orange residue was dried under high vacuum for 2-3 h then the amber residue was triturated four times with 30 mL of acetone. The acetone was removed by evaporation under reduced pressure yielding an oily amber residue. To this, 150 mL of anhydrous THF was added, and then the mixture was cooled to 0 °C for 30 minutes. The resulting solid was filtered and washed further with THF, then dried under vacuum to give 470 mg of **189** as a white solid (2.8 mmol ; 45%).

**TLC Rf:** 0.88 (CTUU).

**RMN <sup>1</sup>H** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) δ (ppm): 2.87-2.99 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, H2), 3.12-3.17 (s, 9H, H4,H5,H6), 3.61-3.70 (t, *J*=7.6 Hz, 2H , H3).

**RMN <sup>13</sup>C** (D<sub>2</sub>O , 75 MHz): δ (ppm) : 28.91 (C2), 53.71 (C4,C5,C6), 62.43 (C3), 173.87 (C1).

**(190) 4-carboxy-*N,N,N*-trimethylbutan-1-aminium chloride**



The protocol was identical to the one used for the xx synthesis.

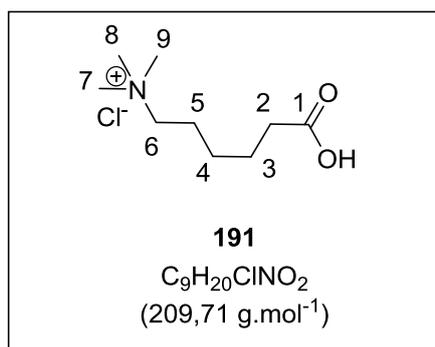
Yield: 80%.

**TLC Rf:** 0.93 (CTUU).

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 1.55-1.69 (m, 2H, H3), 1.74-1.87 (m, 2H, H4), 2.43 (t,  $J=7.7$  Hz, 2H, H2), 3.08 (s, 9H, H6,H7,H8), 3.31 (t,  $J=8.5$  Hz, 2H, H5).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm) : 21.46 (C3), 22.31 (C4), 33.65 (C2) 53.57 (C6,C7,C8), 66.59 (C5), 178.40 (C1).

**(191) 5-carboxy-*N,N,N*-trimethylpentan-1-aminium chloride**



The protocol was identical to the one used for the xx synthesis.

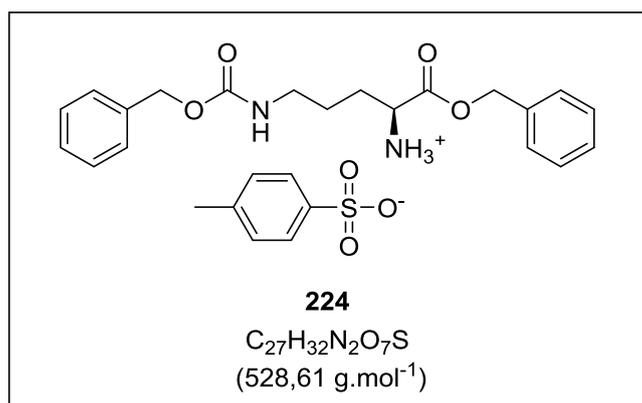
Yield: 59%.

**TLC Rf:** 0.94 (CTUU).

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 1.30-1.46 (m, 2H, H4), 1.56-1.72 (m, 2H, H3), 1.72-1.87 (m, 2H, H5) 2.38 (t,  $J=7.5$  Hz, 2H, H2), 3.09 (s, 9H, H7,H8,H9), 3.30 (t,  $J=8.5$  Hz, 2H, H6).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 75 MHz)  $\delta$  (ppm): 22.53 (C3), 24.17 (C4), 25.36 (C5), 34.02 (C2), 53.44 (C7,C8,C9), 66.87 (C6), 179.10 (C1).

**(224) (*S*)-1-(benzyloxy)-5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-1-oxopentan-2-aminium-4-methyl benzenesulfonate**



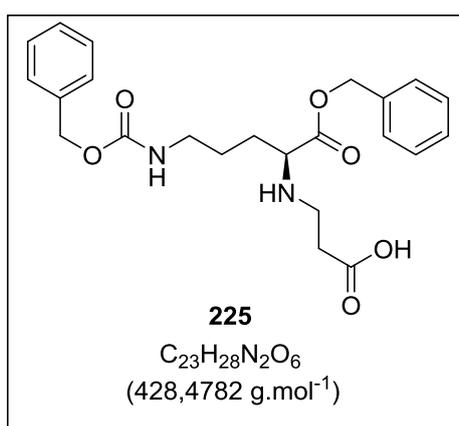
Protocol from Lloyd *et al.*<sup>135</sup>.

Quantitative yield.

**TLC Rf:** 0.46 (AcOEt / NH<sub>3</sub> saturated).

<sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C in CDCl<sub>3</sub> were consistent with those previously reported<sup>135</sup>.

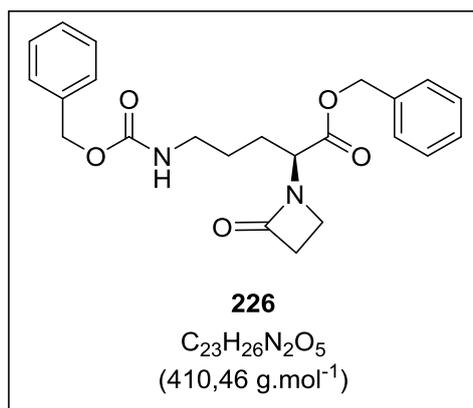
**(225) (S)-3-((1-(benzyloxy)-5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-1-oxopentan-2-yl)amino)propanoic acid**



Yield: 42%.

**TLC Rf:** 0.12 (AcOEt / MeOH 90/10).

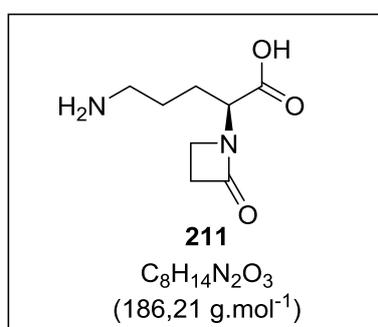
<sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C in CDCl<sub>3</sub> were consistent with those previously reported<sup>135</sup>.

**(226) (S)-benzyl 5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-(2-oxoazetidin-1-yl)pentanoate**

Yield: 73%.

**TLC Rf:** 0.72 (AcOEt).

<sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C in CDCl<sub>3</sub> were consistent with those previously reported<sup>135</sup>.

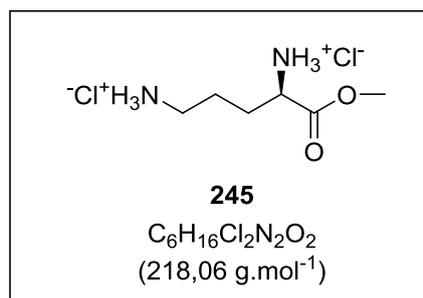
**(211) (S)-5-amino-2-(2-oxoazetidin-1-yl)pentanoic acid**

Protocol adapted from Bajwa<sup>136</sup>.

To a solution of compound **(4)** (69 mg; 0.17 mmol; 1 eq.) in ethanol (3 mL) under N<sub>2</sub> at room temperature, were successively added palladium on charcoal (138 mg ; 200 % by weight) and 1,4-cyclohexadiene (324 μL; 3.4 mmol; 20 eq.). The reaction mixture was stirred for 16 hours at room temperature under N<sub>2</sub>. Pd/C was then filtered on celite and the filtrate was evaporated under reduced pressure to afford 22 mg of – as a yellowish oil (0.12 mmol; 71%).

**TLC Rf:** 0.28 AcOEt/acetone/H<sub>2</sub>O/HCO<sub>2</sub>H 5/3/1/1 (CTUU).

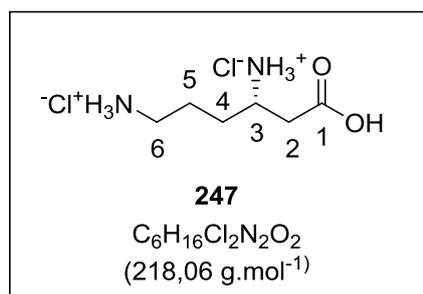
<sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C in CDCl<sub>3</sub> were consistent with those previously reported<sup>135</sup>.

**(245) (R)-5-methoxy-5-oxopentane-1,4-diaminium chloride**

Protocol from Stranyx *et al.*<sup>151</sup>.

Yield: 98%.

<sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C in DMSO-d<sub>6</sub> were consistent with those previously reported<sup>151</sup>.

**(247) (S)-5-carboxypentane-1,4-diaminium chloride**

Compound **246** (150 mg, 0.32 mmol, 1eq) was solubilized in a solution of piperidine 0.5% in DMF (10 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 36 hours and then concentrated under reduced pressure. HCl 4M in dioxane (0.95 mL, 3.84 mmol, 12 eq.) was added and the reaction mixture was stirred for 60 minutes at room temperature. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure to yield a white solid. The solid was triturated in petroleum ether (3\*10 mL) and DCM (3\*10 mL) then dried under vacuum to give 69 mg of **247** as a white solid (0.32 mmol, quantitative).

**TLC Rf:** 0.30 (CTUU).

**RMN <sup>1</sup>H** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 1.67-1.84 (m, 4H, H<sub>4</sub>,H<sub>5</sub>), 2.63-2.89 (m, 2H, H<sub>2</sub>), 2.96-3.07 (m, 2H, H<sub>6</sub>), 3.53-3.72 (m, 1H, H<sub>3</sub>).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 75 MHz)  $\delta$  (ppm): 23.21 (C5), 29.28 (C4), 36.05 (C2), 39.23 (C6), 48.14 (C3), 174.41 (C1).

**D- High throughput screening**

## Part 1: enzymatic reaction

The enzymatic reactions were performed in 220  $\mu\text{L}$  containing 1 mM  $\alpha$ -ketoglutarate, 2.5 mM or 10 mM sodium ascorbate, 1 mM Mohr's salt, cell lysate from 0.04 mg/mL to 0.54 mg/mL protein, 5 mM substrate in 50 mM HEPES or TRIS buffer pH 7.5 (Table 26) at room temperature for 18 h under orbital stirring

initial concentration	volume for first screening ( $\mu\text{L}$ )	final concentration for first screening	volume for second screening ( $\mu\text{L}$ )	final concentration for second screening
HEPES pH 7.5 1M	0		11	
TRIS pH 7.5 1M	11	50 mM	0	50 mM
Pool 4 substrate (12.5 mM each)	88	5 mM each	88	5 mM each
$\alpha$ -ketoglutarate 100 mM	2.2	1 mM	2.2	1 mM
ascorbate 100 mM	22	10 mM	5.5	2.5 mM
H <sub>2</sub> O	79.6		96.1	
lysat	15	0.04-0.15 mg/ml	15	0.15-0.40 mg/mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 100 mM	2.2	1 mM	2,2	1 mM
total volume	220		220	

Table 26: conditions for first and second screening

## Part 2: detection of activities

90  $\mu\text{L}$  of each well were transferred out to a 96 micro-well daughter plate. 130  $\mu\text{L}$  of a mixture containing 600  $\mu\text{M}$  NADH, 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 18.18  $\mu\text{g}/\text{mL}$  glutamate dehydrogenase in 50 mM TRIS buffer pH 7.5 were added. The oxidation of NADH, which absorbs at 340 nm, could be monitored to evaluate the remaining  $\alpha$ -ketoglutarate by spectrophotometry using a SpectraMax Plus384 absorbancemicroplate reader (Molecular Devices).

<b>initial concentration</b>	<b>volume (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>final concentration</b>
1M TRIS pH 7.5	6.5	50 mM
NADH 30 mM	4.4	600 $\mu\text{M}$
$\text{NH}_4\text{Cl}$ (250 mM)	44	50 mM
glutamate deshydrogenase (4 mg/ml)	1	18.18 $\mu\text{g}/\text{ml}$
$\text{H}_2\text{O}$	74.1	
initial reaction mix	90	
total volume	220	

Table 27: conditions for detection of the dioxygenase activity

**E- Isolation and characterisation of LDO1 product: (3S)-3-hydroxy-L-lysine****Optimization of enzymatic reaction conditions**

Optimization was performed by modifying each parameter one after another. Chosen conditions were in red in the figures. Seven ratios L-lysine/ $\alpha$ -ketoglutarate were tested (5mM/5mM, 5mM/10mM, 5mM/15mM, 5mM/20mM, 10mM/15mM, 10mM/30mM, 15mM/15mM). Conversions after 3 hours were determined by HPLC after derivatisation with Fmoc-Cl according to protocol A.

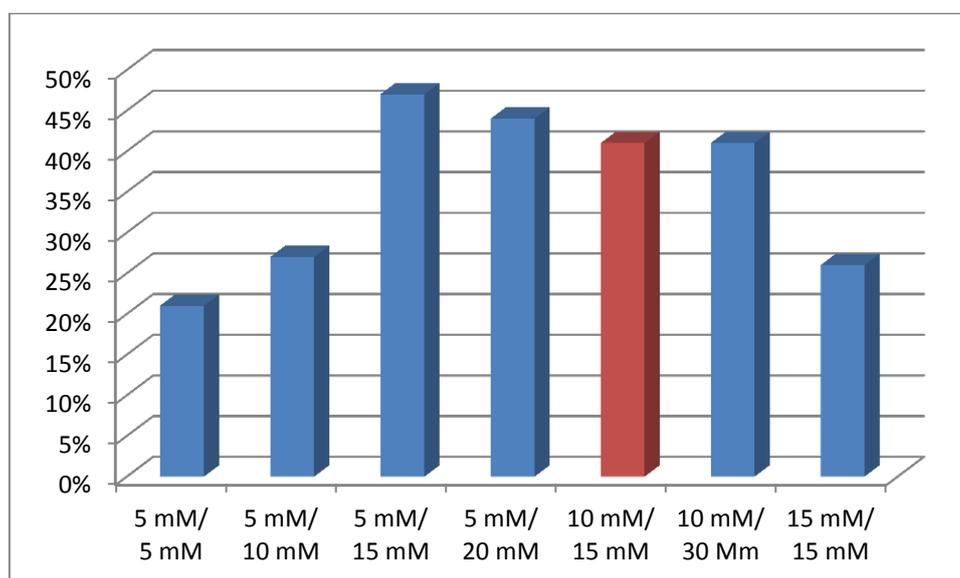


Figure 53

Four enzyme concentrations were tested (0.012 mg/mL, 0.024 mg/mL, 0.048 mg/mL, 0.096 mg/mL). Conversions after 3 hours and 18 hours were determined by HPLC after derivatisation with Fmoc-Cl according to protocol A.

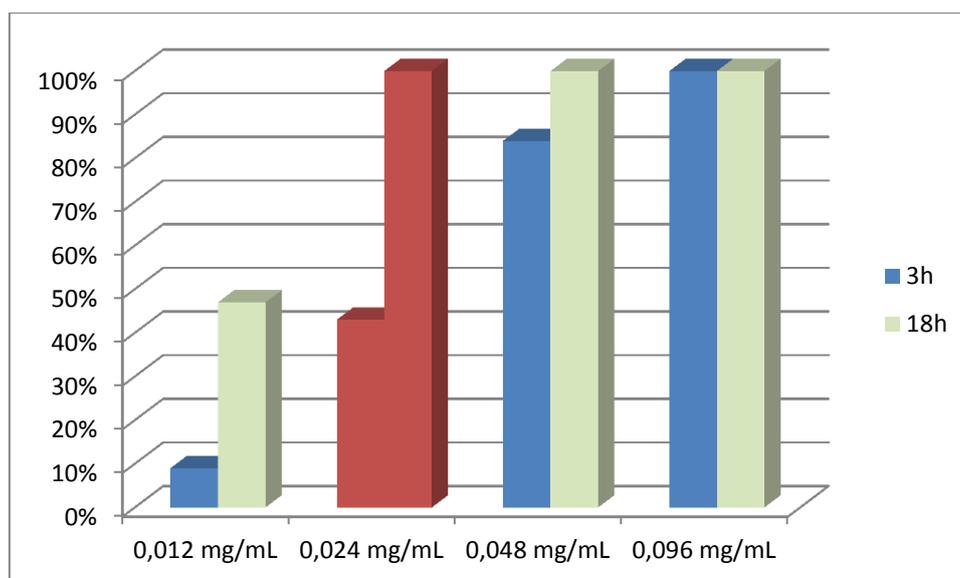


Figure 54

Three sources of ferrous iron cofactor were tested ( $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Mohr's salt) 1 or 2 mM,  $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mM,  $\text{FeCl}_2$  1mM). Conversions after 3h40 were determined by HPLC after derivatisation with Fmoc-Cl according to protocol A.

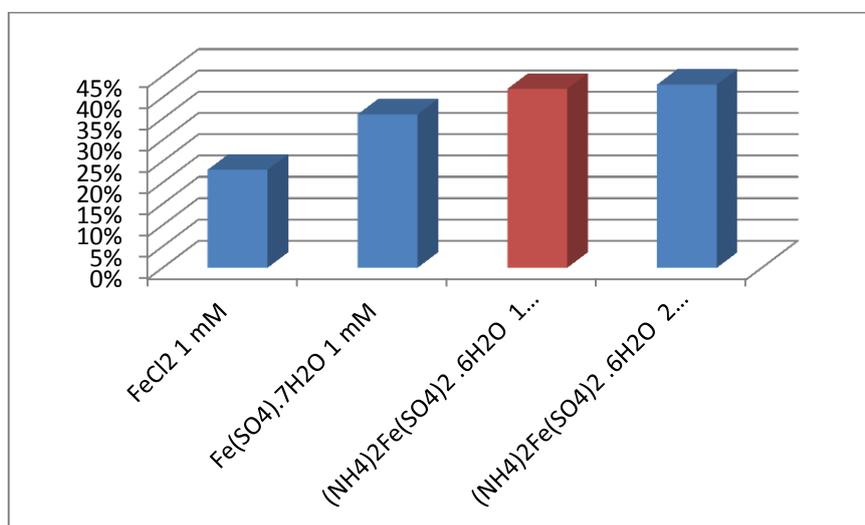


Figure 55

Seven sodium ascorbate concentrations were tested (0 mM, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM). Conversions after 3 hours were determined by HPLC after derivatisation with Fmoc-Cl according to protocol A.

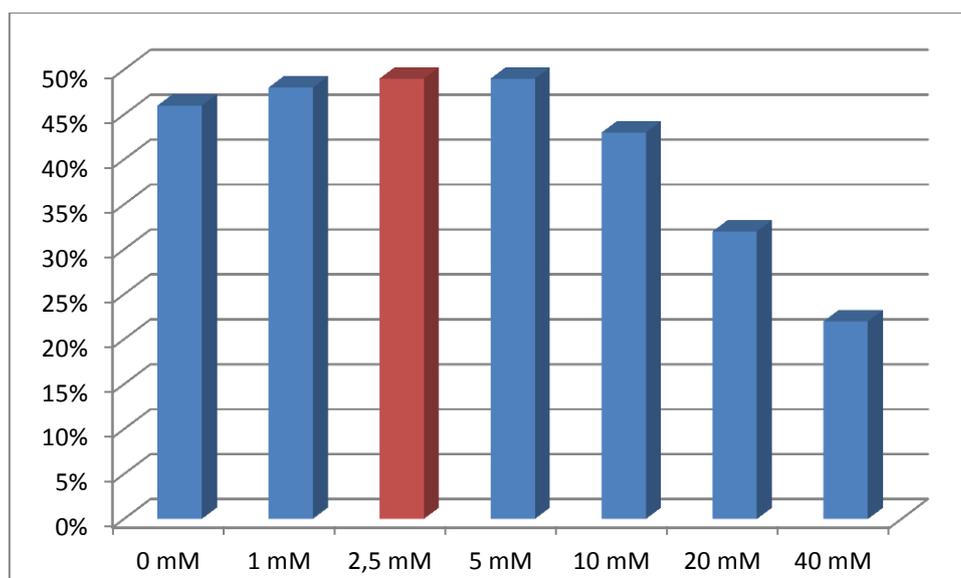
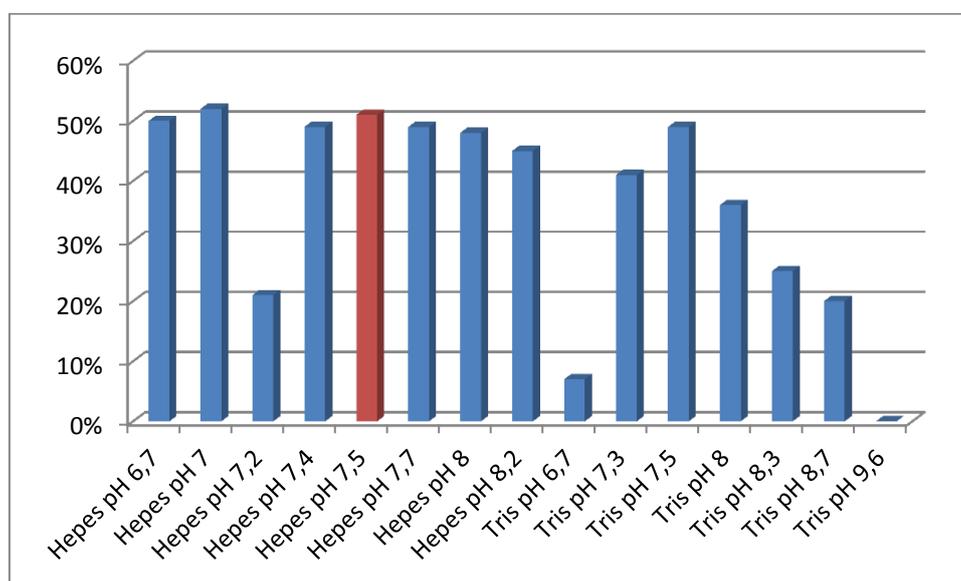


Figure 56

The nature of the buffer and pH values were tested (Hepes 50 mM pH from 6.70 to 8.20 and TRIS 50 mM from 6.70 to 9.60). Conversions after 3 hours were determined by HPLC after derivatisation with Fmoc-Cl according to protocol A.



The influence of the temperature was tested (22°C opened Eppendorf, 30°C opened and closed Eppendorf, 37°C closed Eppendorf, 42°C closed eppendorf). Conversions after 3 hours were determined by HPLC after derivatisation with Fmoc-Cl according to protocol A.

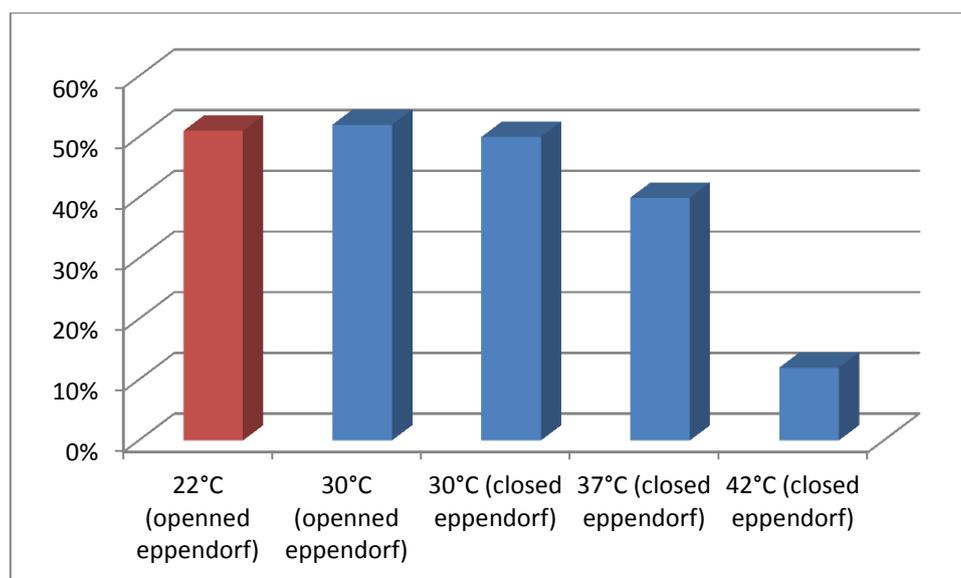
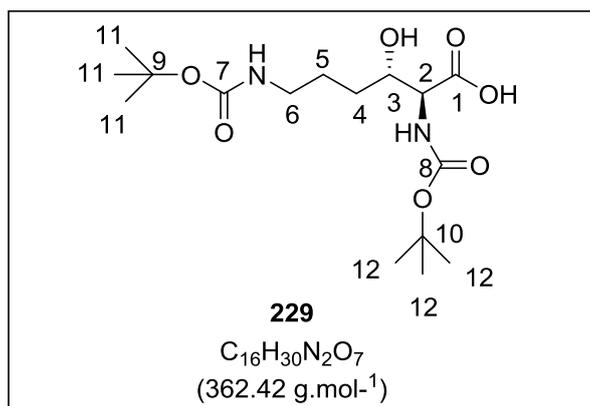


Figure 57

### Scale-up

Enzymatic reaction was carried out in 250 mL glass erlenmeyer flask for a total volume of 4x10 mL. Water (4.8 mL), HEPES buffer 1M pH 7.50 (0.5 mL, 50 mM), L-lysine 50 mM (2 mL, 10 mM),  $\alpha$ -ketoglutarate 150 mM (1 mL, 15 mM), sodium ascorbate 100 mM (0.25 mL, 2.5 mM), ammonium Iron(II) sulfate hexahydrate 10 mM (1 mL, 1 mM) were poured into the erlenmeyer flask. The reaction was started by the enzyme addition (0.53 mg/mL, 0.45 mL, final concentration 0.024 mg/mL). The reaction mixture was orbitally shaken (300 rpm) at room temperature for 18h. The conversion of L-lysine into 3-hydroxy-L-lysine (94%) was determined by HPLC after derivatization with Fmoc-Cl according to protocol A. The assembled reaction mixtures were acidified with 500  $\mu$ L of a 1% TFA in water solution then centrifuged. The supernatant was collected and freeze-dried. The crude product was diluted in the minimum of water and eluted through a cation-exchange resin (DOWEX 50WX8-200) with a pH gradient from HCl 0.1 M to 3.5% NH<sub>3</sub> in water solution. The fractions containing the product were assembled and the solvent was evaporated under reduced pressure to give crude 3-hydroxy-L-lysine.

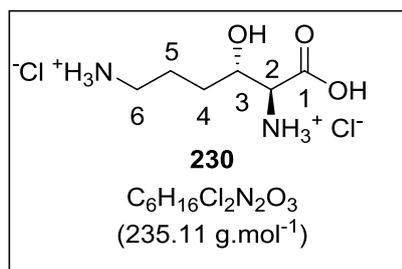
**(229) (2*S*,3*S*)-2,6-bis((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-hydroxyhexanoic acid**

The crude residue from the enzymatic reaction (3-hydroxy-L-lysine/L-lysine 94/6, 0.376/0.024 mmole, 1 eq.) was solubilized in a 10% NaOH in water solution (400  $\mu$ L, 0.8 mmole, 2 eq) and the solution was cooled to 0°C. Boc<sub>2</sub>O 4M in ethanol (400  $\mu$ L, 1.6 mmoles, 4 eq) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature for 4 hours. 3mL of water were added and the aqueous layer was extracted with petroleum ether (3\*3 mL) to eliminate the Boc<sub>2</sub>O excess. The aqueous layer was acidified with HCL 1M until pH 2 and extracted with ethyl acetate (3\*3 mL). The assembled organic layers were dried over anhydrous magnesium sulphate, filtered, and evaporated to give a yellowish oil. Purification by flash chromatography with the gradient 85-35% hexane + 0.3% HCO<sub>2</sub>H/AcOEt + 0.3% HCO<sub>2</sub>H in 20 minutes afforded *N* $\alpha$ -Boc-*N* $\epsilon$ -Boc-(3*S*)-hydroxy-L-lysine as a yellowish oil (106 mg, 78%).

**TLC Rf:** 0.36 (petroleum ether /AcOEt 1/1 + 1% HCO<sub>2</sub>H).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 1.36-1.44 (s, 18H, H11,H12), 1.49-1.72 (m, 4H, H4,H5), 3.02-3.14 (m, 2H, H6), 3.82-3.95 (m, 1H, H3), 4.26-4.36 (m, 1H, H2), 5.71-5.84 (m, 1H, C8N-H).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  (ppm): 26.85 (C5), 28.49 (C11 or C12), 28.59 (C12 or C11), 30.19 (C4), 40.70 (C6), 58.61 (C2), 73.03 (C3), 80.61 (C9,C10), 156.47 (C7,C8), 173.22 (C1).

**(230) (1*S*,2*S*)-1-carboxy-2-hydroxypentane-1,5-diaminium chloride**

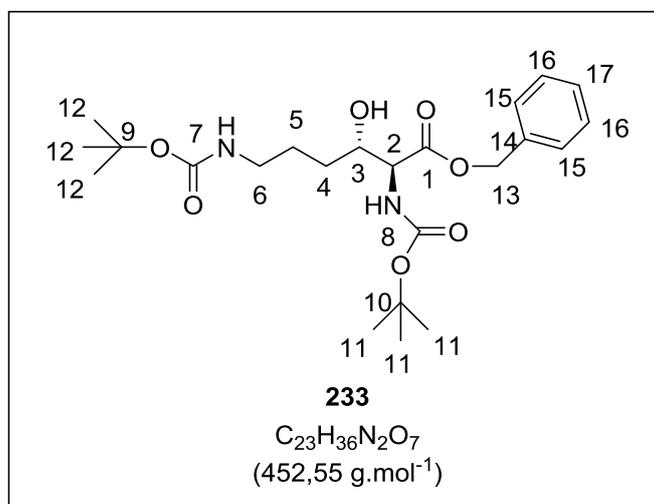
*N*α-Boc-*N*ε-Boc-(3*S*)-hydroxy-L-lysine (42mg, 0.116 mmole, 1eq.) was solubilized in HCl 4M in dioxane solution (345 μL, 1.38 mmole, 11.5 eq) and the reaction mixture was stirred at room temperature for one hour. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was triturated in toluene (3\*1 mL), diethyl ether (3\*1 mL), dichloromethane (3\*1 mL) successively and dried under vacuum overnight to afford the (3*S*)-hydroxy-L-lysine dihydrochloride as a white solid (27 mg, quantitative).

**TLC Rf:** 0.31 AcOEt/acetone/H<sub>2</sub>O/HCO<sub>2</sub>H 5/3/2/2 (CTDD).

**HRMS** (M+H)<sup>+</sup>: 163.20681

**RMN <sup>1</sup>H** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) δ (ppm): 1.56-1.92 (m, 4H, H4,H5), 2.95-3.05 (t, J= 7.2 Hz, 2H, H6), 3.98-4.02 (d, J= 3.3 Hz, 1H, H2), 4.04-4.11 (m, 1H, H3).

**RMN <sup>13</sup>C** (D<sub>2</sub>O with MeOH as standard, 75 MHz) δ (ppm): 24.20 (C5), 29.23 (C4), 39.61 (C6), 58.65 (C2), 69.55 (C3), 170.77 (C1).

**Determination of the C3 absolute configuration****(233)benzyl (2S,3S)-2,6-bis((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-hydroxyhexanoate**

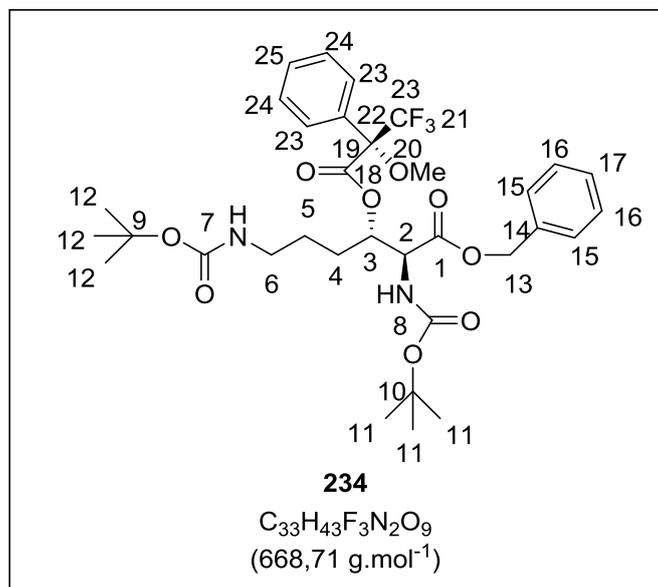
*N*α-Boc-*N*ε-Boc-(3*S*)-hydroxy-L-lysine (30mg, 0.08 mmole, 1eq.) was solubilized in DMF (1 mL) under N<sub>2</sub>. NaHCO<sub>3</sub> (40mg, 0.48 mmol, 6eq.) and BnBr (14.3μL, 0.12 mmol, 1.5eq.) were added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 8 hours. The solvent was removed under reduced pressure to give a colorless oil. Purification by flash chromatography with the gradient 72-30% petroleum ether/AcOEt afforded *N*α-Boc-*N*ε-Boc-(3*S*)-hydroxy-L-lysine benzyl ester as a colorless oil (28 mg, 78%).

**TLC Rf:** 0.63 (petroleum ether /AcOEt 1/1).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm): 1.35-1.45 (s, 18H, H11,H12), 1.46-1.70 (m, 4H, H4,H5), 2.94-3.14 (m, 2H, H6), 3.83-3.94 (m, 1H, H3), 4.30-4.41(m, 1H, H2), 5.06-5.25 (m, 2H, H13) 5.41-5.62 (m, 1H, C7-NH), 7.25-7.36 (m, 5H, H14,H15,H16,H17,H18).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ (ppm): 26.65 (C5), 28.44 (C11 or C12), 28.60 (C12 or C11), 30.27 (C4), 40.51 (C6), 58.80 (C2), 67.47 (C13), 72,89 (C3), 79.57 (C9 or C10), 80,61 (C10 or C9), 128.59 (C15 or C16 or C17), 128.70 (C15 or C16 or C17), 128.79 (C15 or C16 or C17), 135.30 (C14), 156.43 (C7,C8), 170.64 (C1).

**(234) benzyl (2S)-2,6-bis((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(((S)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenyl propanoyl)oxy)hexanoate**



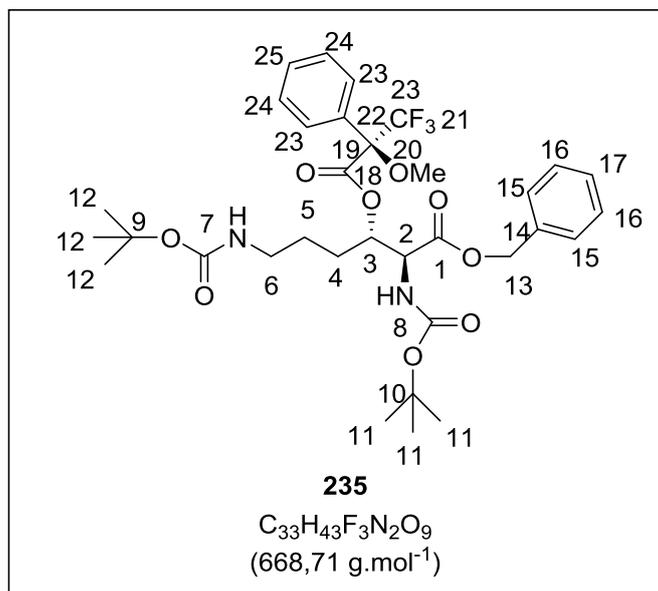
*N*α-Boc-*N*ε-Boc-(3*S*)-hydroxy-L-lysine benzyl ester (7.3mg, 0.016 mmole, 1eq.) was solubilized in DMF/THF 2/1 (0.5 mL) under N<sub>2</sub> and the solution was cooled to 0°C., DCC (3.7 mg, 0.018 mmol, 1.1 eq.), DMAP (0.5 mg, cat.) and (*S*)-Mosher (4.2 mg, 0.018 mmol, 1.1 eq.) dissolved in DMF/THF 1/2 (0.5 mL) were added. The reaction mixture was allowed to warm up to RT and stirred for 4 hours. The solvents were removed under reduced pressure to give a colorless oil. Purification by preparative chromatography afforded the (*S*)-Mosher ester derivative as a colorless oil (6.5 mg, 62%).

**TLC Rf:** 0.55 (petroleum ether /AcOEt 7/3).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm): 1.39-1.41 (s, 9H, H11 or H12), 1.41-1.43 (s, 9H, H12 or H11), 1.45-1.80 (m, 4H, H4,H5), 2.85-2.90 (m, 2H, H6), 3.45-3.52 (s, 3H, H20), 4.24-4.37 (m, 1H, C7-NH), 4.61-4.69 (m, 1H, H2), 5.04-5.24 (m, 2H, H13), 5.26-5.36 (m, 1H, H3), 7.26-7.57 (m, 10H, H14,H15,H16,H17,H22,H23,H24,H25).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ (ppm): 25.86 (C5), 27.80 (C4), 28.46 (C11 or C12), 28.61 (C12 or C11), 40.03 (C6), 55.83 (C22), 56.05 (C2), 67.96 (C13), 77.29 (C3) 79,40 (C9 or C10), 80.75 (C10 or C9), 127.58 (C21), 128.67 (C15 or C16 or C17 or C23 or C24 or C25), 128.77 (C15 or C16 or C17 or C23 or C24 or C25), 128.89 (C15 or C16 or C17 or C23 or C24 or C25), 129.91 (C14), 135.02 (C22), 155.21 (C7 or C8), 156.03 (C8 or C7), 166.49 (C18), 168.97 (C1).

**(235) benzyl (2*S*,3*S*)-2,6-bis((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(((*R*)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoyl)oxy)hexanoate**



Following the same protocol, the (*R*)-mosher derivative was obtained as a colorless oil (6.1 mg, 58%).

**TLC Rf:** 0.55 (petroleum ether /AcOEt 7/3).

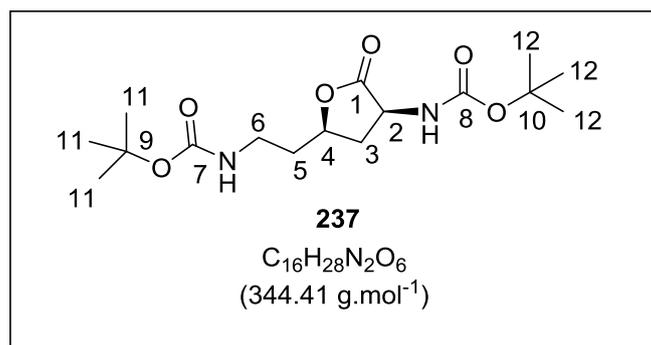
**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm): 1.39-1.40 (s, 9H, H11 or H12), 1.41-1.43 (s, 9H, H12 or H11), 1.45-1.81 (m, 4H, H4,H5), 2.98-3.09 (m, 2H, H6),3.41-3.46 (s, 3H, H20), 4.41-4.50 (m, 1H, C7-NH), 4.57-4.65 (m, 1H, H2), 4.98-5.16 (m, 2H, H13) 5.27-5.36 (m, 1H, H3), 7.26-7.56 (m, 10H, H14,H15,H16,H17,H22,H23,H24,H25).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ (ppm): 26.27 (C5), 28.24 (C4), 28.48 (C11 or C12), 28.62 (C12 or C11), 40.13 (C6), 55.71 (C22), 56.09 (C2), 67.80 (C13), 77.29 (C3), 80.70 (C9,C10), 127.61 (C21), 128.71 (C15 or C16 or C17 or C23 or C24 or C25), 128.87 (C15 or C16 or C17 or C23 or C24 or C25), 129.95 (C14), 135.08 (C22), 155.05 (C7 or C8), 156.11 (C8 or C7), 166.43 (C18), 168.63 (C1).



**F- Isolation and characterisation of LDO2 and LDO3 product: cyclic derivative of (4R)-4-hydroxy-L-lysine****Scale-up**

The protocol used was the same as the one described above for the hydroxylation by LDO1 with different enzyme concentrations (LDO2: 0.031 mg/mL; LDO3: 0.086 mg/mL). The conversions were determined by HPLC after derivatization with Fmoc-Cl according to protocol A as described above. The conversion of L-lysine into (4R)-hydroxy-L-lysine was 96% with LDO2 and 91% with LDO3. Crude (4R)-hydroxy-L-lysine was obtained as a yellowish oil.

**(237) tert-butyl ((3S,5R)-5-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)-2-oxotetrahydrofuran-3-yl)carbamate**

The derivatization with Boc group was then performed as described above for (3S)-hydroxy-L-Lysine with Boc<sub>2</sub>. The crude yellowish oil was stirred overnight in DCM to ensure the total lactonization. The resulting product was purified by flash chromatography with the gradient 85-35% hexane + 0.3% HCO<sub>2</sub>H/AcOEt + 0.3% HCO<sub>2</sub>H, whereby di-tert-butyl (3S,5R)-5-(2-ammonioethyl)-2-oxotetrahydrofuran-3-amine was obtained as an uncolored oil.

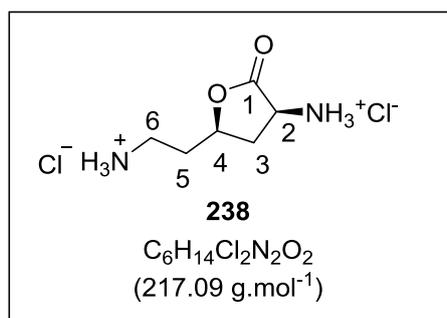
LDO2 product (103 mg, 78%); LDO3 (92 mg, 71%).

**TLC Rf:** 0.54 (petroleum ether /AcOEt 1/1 + 1% HCO<sub>2</sub>H).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm): 1.38-1.47 (d, 18H, H11,H12), 1.74-2.05 (m, 3H, H3,H5), 2.76-2.90 (m, 1H, H3'), 3.23-3.35 (m, 2H, H6), 4.31-4.53 (br s, 2H, H2,H4), 4.65-4.82 (m, 1H, C7N-H), 5.00-5.14 (m,1H, C8N-H).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  (ppm): 28.41 (C11 or C12), 28.53 (C12 or C11), 35.63 (C3 or C5), 36.40 (C5 or C3), 37.36 (C6), 51.41 (C2), 76.22 (C4), 79.66 (C9 or C10), 80.59 (C10 or C9), 155.51 (C7 or C8), 156.17 (C8 or C7), 174.91 (C1).

**(238) (3*S*,5*R*)-5-(2-ammonioethyl)-2-oxotetrahydrofuran-3-aminium chloride**



The Boc groups were cleaved by HCl in dioxane using the standard protocol described hereabove for (3*S*)-hydroxy-L-lysine. The (3*S*,5*R*)-5-(2-aminoethyl)-2-oxotetrahydrofuran-3-aminium chloride was obtained as white solid.

LDO2 product (22 mg, quantitative); LDO3 product (19 mg, quantitative).

**TLC Rf value:** 0.35 (CTDD).

**Mp:** 228°C.

**HRMS** ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>: 145.09677

**RMN  $^1\text{H}$**  (DMSO, 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 1.91-2.16 (m, 3H, H5, H3), 2.63-2.77 (br s, 1H, H3'), 2.78-2.96 (m, 2H, H6), 4.33-4.48 (m, 1H, H2), 4.55-4.73 (m, 1H, H4).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (DMSO, 75 MHz)  $\delta$  (ppm): 32.00 (C3), 32.28 (C5), 35.15 (C6), 48.60 (C2), 75.69 (C4), 172.29 (C1).

**G - Isolation and characterisation of E12 product: (3S)-3-hydroxy-L-ornithine****Optimization of enzymatic reaction conditions**

Optimization was performed by modifying each parameter one after another. Chosen conditions are in red in the figures. Three enzyme concentrations were tested (0.238 mg/mL, 0.476 mg/mL, 0.952 mg/mL). Conversions after 18 hours were determined by HPLC after derivatisation with FDAA according to protocol C.

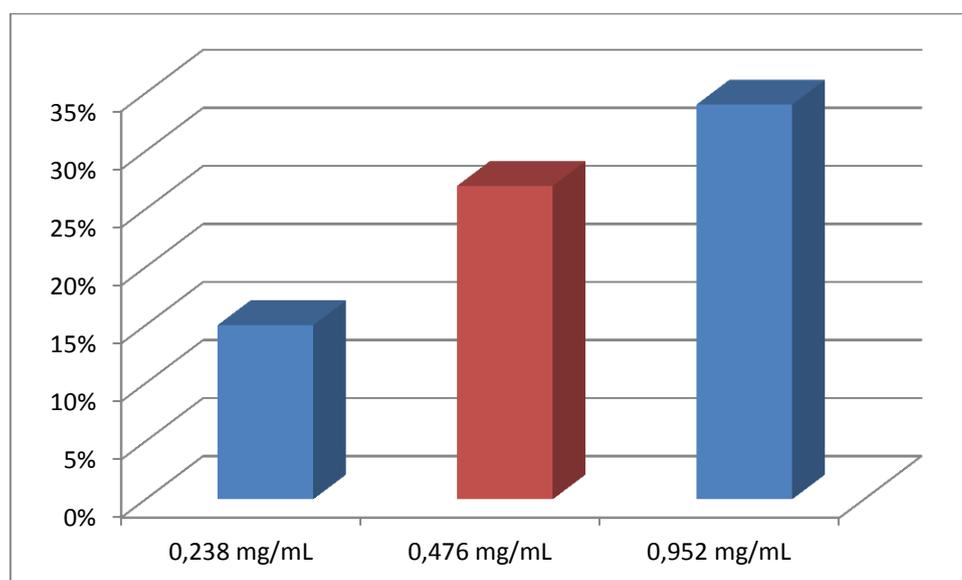


Figure 58

Five substrate/ $\alpha$ -ketoglutarate ratios were tested (5mM/15mM, 10mM/10mM, 10mM/15mM, 10mM/30mM, 10mM/45mM). The conversions after 18 hours were determined by HPLC after derivatisation with FDAA according to protocol C.

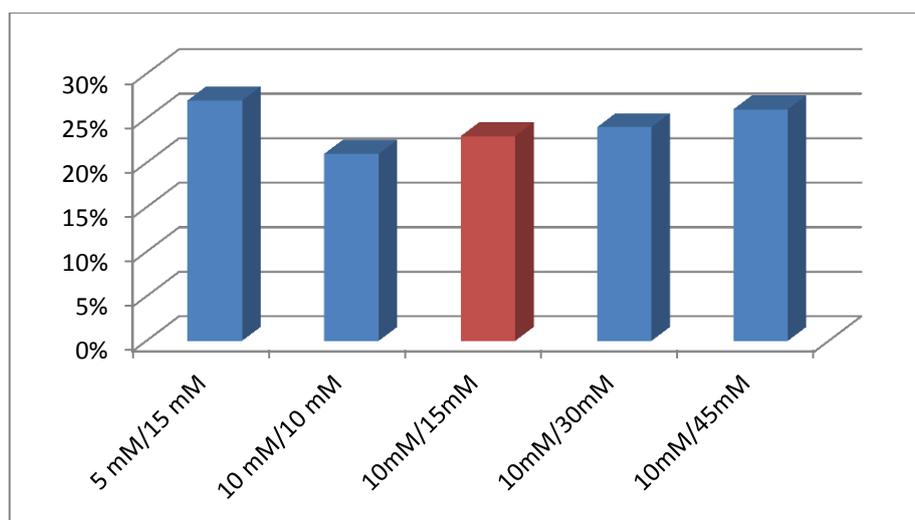


Figure 59

Four sodium ascorbate concentrations were tested (0 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM). Conversions after 18 hours were determined by HPLC after derivatisation with FDAA according to protocol C.

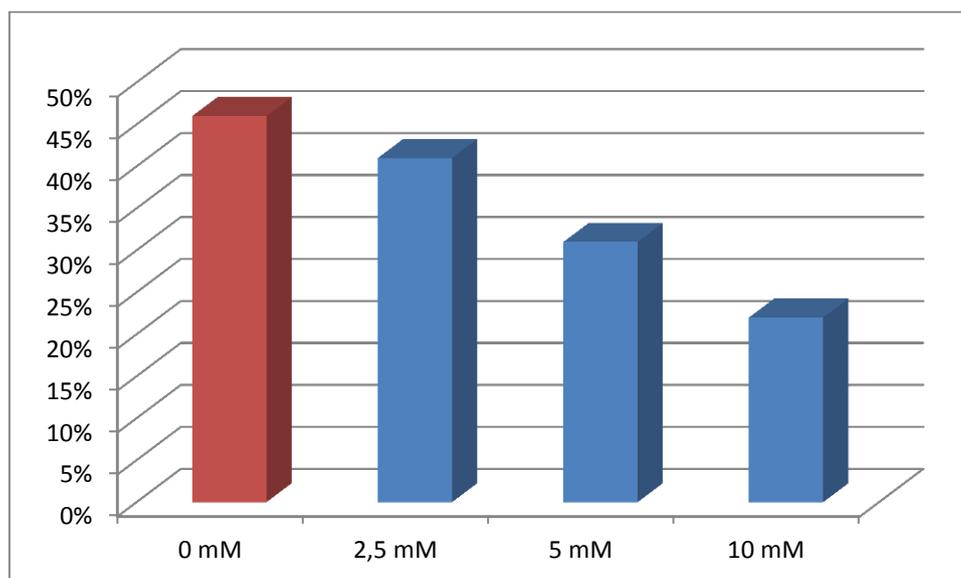


Figure 60

The nature of the buffer and pH values were tested (Hepes 50 mM pH from 6.90 to 8.10, TRIS 50 mM from 7.27 to 7.97, Phosphate 50 mM from 3.96 to 8.16). Conversions after 18 hours were determined by HPLC after derivatisation with FDAA according to protocol C.

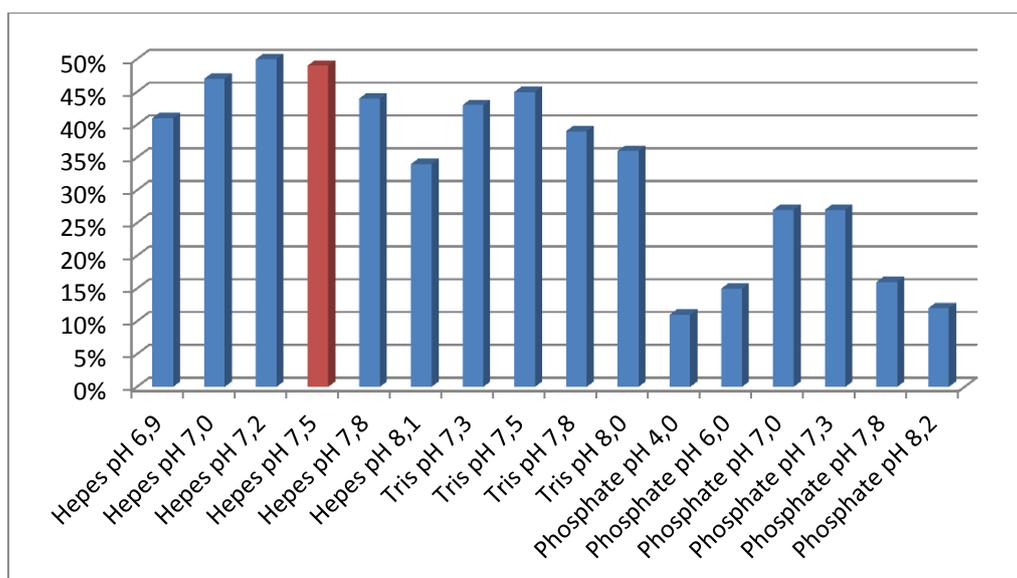


Figure 61

Three buffer concentrations were tested (Hepes pH 7.50 50 mM, 100 mM, 200 mM). Conversions after 18 hours were determined by HPLC after derivatisation with FDAA according to protocol C.

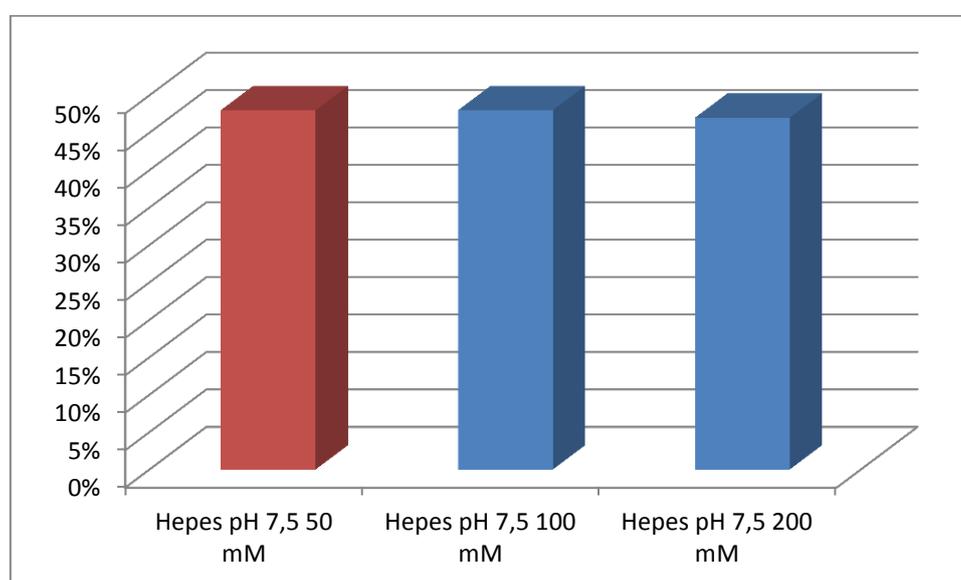


Figure 62

Two sources of ferrous iron cofactor were tested ( $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Mohr's salt) 0 mM, 1 mM or 10 mM,  $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1mM). Conversions after 18 hours were determined by HPLC after derivatisation with FDAA according to protocol C.

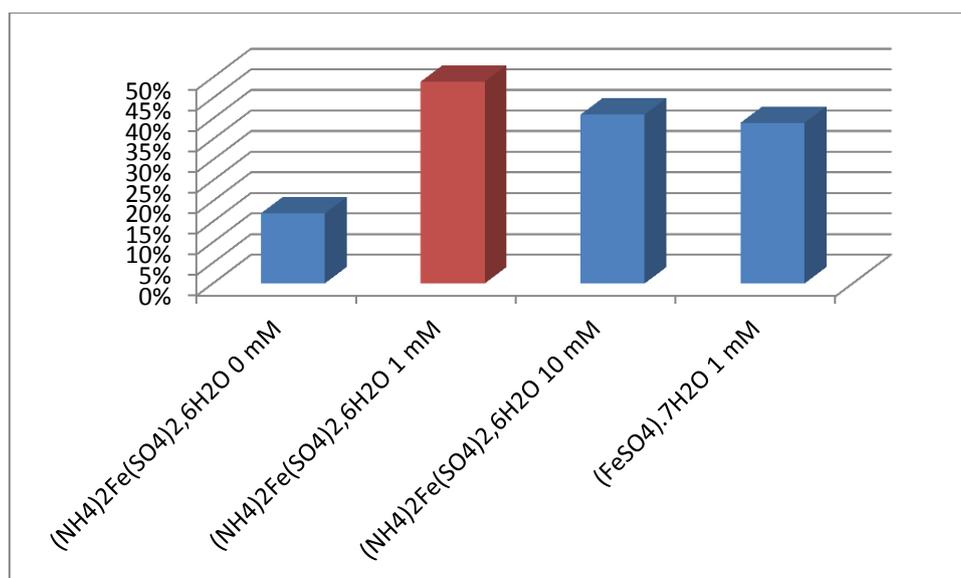
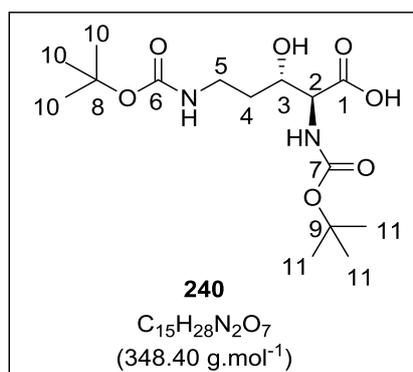


Figure 63

### Scale-up

Enzymatic reaction was carried out in 250 mL glass erlenmeyer flask for a total volume of 10 mL for FDNB derivatization or 4\*10 mL for product isolation. The protocol for L-ornithine hydroxylation was the same as that described above for the hydroxylation of L-lysine by LDO1 except that the enzyme concentration was 0.595 mg/mL for OADO and the reaction was carried without sodium ascorbate. The conversion of L-ornithine into hydroxylated product (68%) was determined by HPLC after derivatization with Fmoc-Cl according to protocol A. The hydroxylated product was obtained as a crude yellowish oil.

### (240) (2*S*,3*S*)-2,5-bis((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-hydroxypentanoic acid



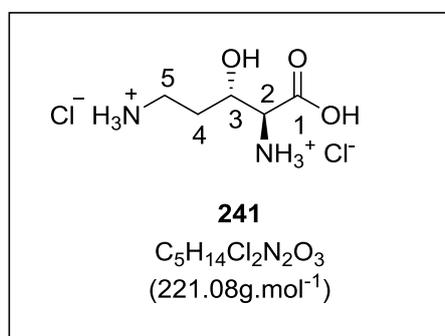
The four reaction media (4x10 mL) were assembled, acidified with 500  $\mu$ L of 1% TFA in water solution, centrifuged and the supernatant was collected and freeze-dried. The resulting residue was purified according to the general protocol described above for the crude (3*S*)-hydroxy-L-lysine. Briefly, the residue was derivatized with a Boc group. The resulting product was purified by flash chromatography with the gradient 85-35% hexane + 0.3% HCO<sub>2</sub>H/AcOEt + 0.3% HCO<sub>2</sub>H afforded *N* $\alpha$ -Boc-*N* $\delta$ -Boc-(3*S*)-hydroxy-L-ornithine as a yellowish oil (58 mg, 62%).

**TLC Rf:** 0.25 (petroleum ether /AcOEt 1/1 + 1% HCO<sub>2</sub>H).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 1.32-1.46 (s, 18H, H10, H11), 1.64-1.81 (m, 2H, H4), 3.10-3.38 (m, 2H, H5), 3.89-4.01 (m, 1H, H3), 4.25-4.35 (m, 1H, H2), 5.71-5.84 (m, 1H, N-H).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  (ppm): 28.47 (C10 or C11), 28.56 (C11 or C10), 33.46 (C4), 37.69 (C5), 58.46 (C2), 70.91 (C3), 80.66 (C8, C9), 156.43 (C6, C7), 172.93 (C1).

**(241) (1*S*,2*S*)-1-carboxy-2-hydroxybutane-1,4-diaminium chloride**

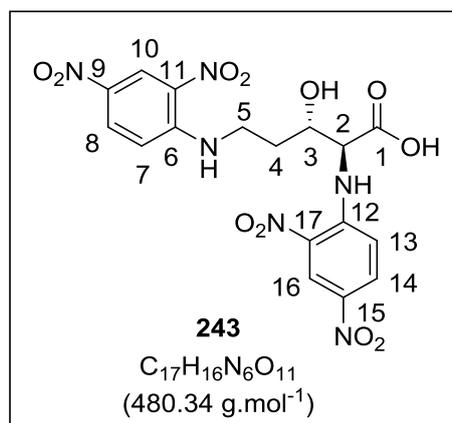


The Boc groups were cleaved by HCl in dioxane using the standard protocol described hereabove for (3*S*)-hydroxy-L-lysine. The (3*S*)-3-hydroxy-L-ornithine was obtained as a white solid (15 mg, quantitative).

**TLC Rf:** 0.31 (CTDD).

**RMN <sup>1</sup>H** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 1.86-2.12 (m, 2H, H4), 3.08-3.21 (m, 2H, H5), 4.09-4.14 (d, J= 3.3 Hz, 1H, H2), 4.18-4.27 (m, 1H, H3).

**RMN <sup>13</sup>C** (D<sub>2</sub>O with MeOH as standard, 75 MHz)  $\delta$  (ppm): 30.03 (C4), 37.65 (C5), 39.74 (C6), 58.32 (C2), 68.05 (C3), 170.04 (C1).

**(243) (2*S*,3*R*)-2,5-bis((2,4-dinitrophenyl)amino)-3-hydroxypentanoic acid**

For FDNB derivatization, a fraction of the reaction medium was acidified with 125  $\mu$ L of 1% TFA in water solution, centrifugated, the supernatant was collected and freeze-dried. The resulting residue (3-OH-L-ornithine/L-ornithine 5.5/4.5 0.055/0.045 mmole, 1eq.) was solubilized in a 2% NaHCO<sub>3</sub> solution in water (10 mL, 2.4 moles, 24 eq.) and a 0.25% FDNB solution in ethanol (60 mL, 0.7 mmoles, 7eq) was added. The reaction mixture was stirred at 50°C for 2 hours and then acidified with HCl 1M (1mL). The solvents were removed under reduced pressure to give the crude product as a yellow powder. Purification by preparative HPLC using Xbridge prep C18 5 $\mu$ m OBD 19\*150 mm with gradient 0-65% Eluent B (MeCN+ 0.1% TFA) and eluent A (H<sub>2</sub>O +0.1% TFA) in 17 minutes afforded (2*S*,3*R*)-2,5-bis((2,4-dinitrophenyl)amino)-3-hydroxypentanoic acid as a yellow solid (18.7 mg, 71%, rt: 12.76 min).

**HRMS** (M-H)<sup>-</sup>:479.07981

**RMN <sup>1</sup>H** (DMSO d<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 1.85-2.09 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 3.55-3.72 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 4.06-4.15 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 4.68-4.78 (dd, J= 7.6 Hz, J= 2.7 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 7.18-7.33 (m, 2H, H<sub>7</sub>,H<sub>13</sub>), 8.20-8.32 (m, 2H,H<sub>8</sub>,H<sub>14</sub>), 8.82-8.99 (dd, J= 2.7 Hz, J= 10.4 Hz, 2H, H<sub>10</sub>, H<sub>16</sub>), 9.00-9.08 (t, J=5.8 Hz, 1H, C<sub>5</sub>N-H), 9.14-9.21 (d, J= 7.6 Hz, 1H, C<sub>2</sub>N-H).

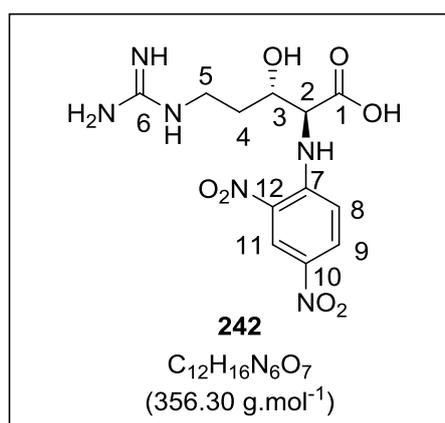
**RMN <sup>13</sup>C** (DMSO, 75 MHz)  $\delta$  (ppm): 31.22 (C<sub>4</sub>), 40.53 (C<sub>5</sub>), 60.46 (C<sub>3</sub>), 69.27 (C<sub>2</sub>), 115.12 (C<sub>7</sub> or C<sub>13</sub>), 116.25 (C<sub>13</sub> or C<sub>7</sub>), 123.43 (C<sub>10</sub> or C<sub>16</sub>), 123.57 (C<sub>16</sub> or C<sub>10</sub>), 129.74 (C<sub>8</sub> or C<sub>14</sub>), 129.77 (C<sub>14</sub> or C<sub>8</sub>), 129.91 (C<sub>9</sub> or C<sub>15</sub>), 130.23 (C<sub>15</sub> or C<sub>9</sub>), 134.65 (C<sub>11</sub> or C<sub>17</sub>), 135.31 (C<sub>17</sub> or C<sub>11</sub>), 147.28 (C<sub>6</sub> or C<sub>12</sub>), 148.02 (C<sub>12</sub> or C<sub>6</sub>), 170.06 (C<sub>1</sub>).

## H - Isolation and characterisation of E12 product: (3S)-3-hydroxy-L-arginine as its DNB derivative

### Scale-up

The protocol for L-arginine hydroxylation was the same as the one described for the hydroxylation of L-lysine with different enzyme concentration (0.595 mg/mL for OADO) and the reaction was carried without sodium ascorbate. The conversion of L-arginine into hydroxylated product (50%) was determined by HPLC after derivatization with FDAA according to protocol B.

### (242) (2*S*,3*S*)-2-((2,4-dinitrophenyl)amino)-5-guanidino-3-hydroxypentanoic acid



The hydroxylated product was characterized as its DNB derivative, as described above for hydroxylated L-ornithine (conditions: 0.25% FDNB solution in ethanol (30 mL, 0.35 mmole, 3.5eq)). The resulting product was purified by preparative HPLC using Xbridge prep C18 5  $\mu$ m OBD 19\*150 mm with 0-100% in 20 minutes of eluent B (MeCN) and eluent A (H<sub>2</sub>O) afforded (2*S*,3*R*)-2-((2,4-dinitrophenyl)amino)-5-guanidino-3-hydroxypentanoic acid as a yellow solid (13.3 mg, 75%, rt: 11.00 min).

**HRMS** (M+H)<sup>+</sup>: 355.09871

**RMN** <sup>1</sup>H (DMSO d<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 1.58-1.77 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 3.04-3.28 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 4.08-4.18 (br s, 1H, H<sub>3</sub>), 4.27-4.35 (dd, J= 7.2 Hz, J= 3.1 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 5.20-5.28 (br s, 1H, OH), 7.32-7.39 (d, J= 9.9 Hz, 1H, H<sub>8</sub>), 7.46-7.67 (br s, 4H, H<sub>2</sub>N-C=NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 8,12-8,20 (dd, J=

9.9 Hz,  $J_2 = 2.7$  Hz, 1H, H9), 8.71-8.80 (m, 1H, C6-NH), 8.85-8.89 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, H11), 9.53-9.61 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H, C2-NH).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (DMSO, 75 MHz)  $\delta$  (ppm): 31.14 (C4), 37.83 (C5), 62.68 (C2), 69.76 (C3), 117.20 (C8), 123.55 (C11), 129.13 (C9), 129.46 (C10), 134.29 (C12), 147.98 (C7), 157.18 (C6), 171.04 (C1).

## I- Isolation and characterization of the LDO1 – LDO3 cascade product: (3R,4R)-3,4-dihydroxy-L-lysine as its cyclic derivative

### Scale-up

Enzymatic reaction was carried out in 250 mL glass erlenmeyer flask for a total volume of 4x10 mL. Water (5.6 mL), Hepes buffer 1M pH 7.50 (0.5 mL, 50 mM), L-lysine 10 mM (1 mL, 10 mM),  $\alpha$ -ketoglutarate 150 mM (1 mL, 15 mM), sodium ascorbate 100 mM (0.25 mL, 2,5 mM), ammonium Iron(II) sulfate hexahydrate 10 mM (1 mL, 1 mM) were poured into the erlenmeyer. The reaction was started by LDO1 addition (1.99 mg/mL, 0.65 mL, final concentration 0.13 mg/mL). The reaction mixture was orbitally shaken (600 rpm) at room temperature for 3h then  $\alpha$ -ketoglutarate 150 mM (1.37 mL), sodium ascorbate 100 mM (0.34 mL), ammonium Iron(II) sulfate hexahydrate 100 mM (1 mL) were added followed by LDO3 addition (2.29 mg/mL, 1.85 mL). The reaction mixture was orbitally shaken (600 rpm) at room temperature for 18 h. The conversion (90%) was determined by HPLC after derivatization with Fmoc-Cl according to protocol A (Figure 64). The assembled reaction mixtures were acidified with 500  $\mu$ L of a TFA 1% in water solution then centrifuged. The supernatant was collected and freeze-dried. The crude product was diluted in the minimum of water and eluted through a cation-exchange resin (DOWEX 50WX8-200) with a pH gradient from HCl 0.1 M to 3.5% NH<sub>3</sub> in water solution. The fractions containing the product were assembled and the solvent was evaporated under reduced pressure to give crude to give crude 3,4-diOH-L-lysine.

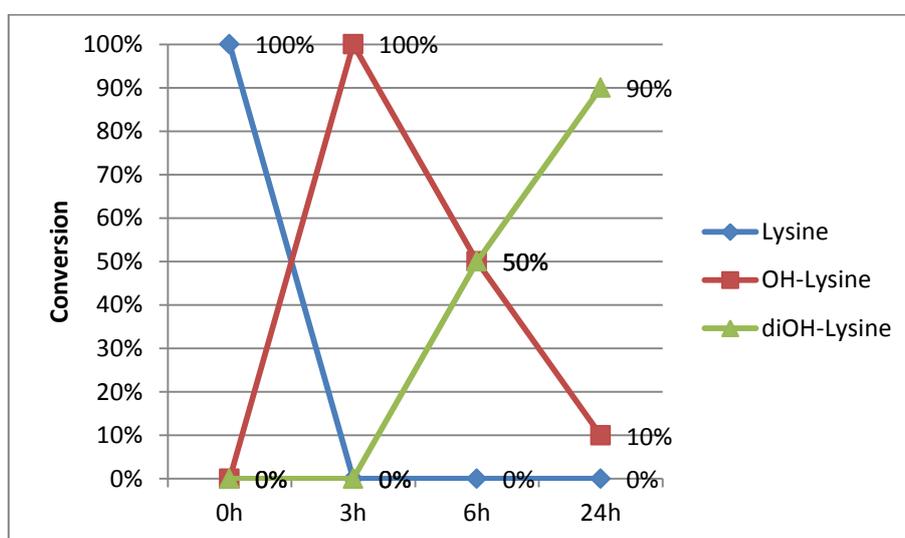
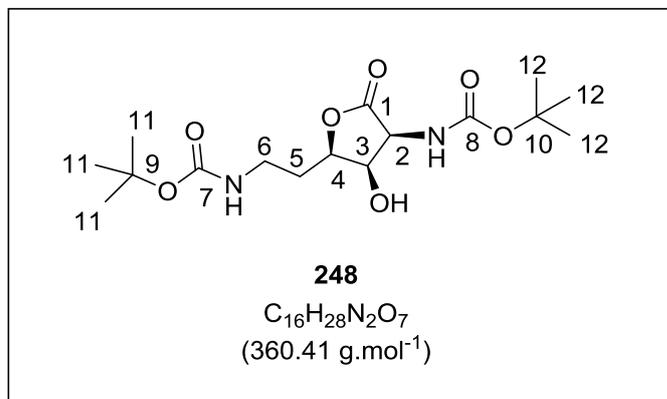


Figure 64

**(248) *tert*-butyl ((3*S*,4*R*,5*R*)-5-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)-4-hydroxy-2-oxotetrahydrofuran-3-yl)carbamate**



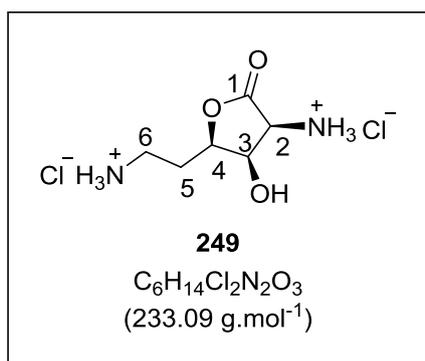
The derivatization with Boc group was then performed as described above for (3*S*)-hydroxy-L-Lysine. The crude yellowish oil was stirred in DCM overnight at room temperature to ensure the total lactonization. The purification was performed by flash chromatography with the gradient 75-25% hexane + 0.3% HCO<sub>2</sub>H/AcOEt + 0.3% HCO<sub>2</sub>H afforded di-*tert*-butyl *tert*-butyl ((3*S*,5*S*)-5-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-1-hydroxyethyl)-2-oxotetrahydrofuran-3-yl) carbamate as an uncolored oil (76 mg, 59%).

**TLC Rf:** 0.50 (petroleum ether /AcOEt 5/7 + 1% HCO<sub>2</sub>H).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm): 1.37-1.48 (d, 18H, H11,H12), 1.92-2.18 (m, 2H, H5), 3.15-3.36 (m, 2H, H6), 3.51-4.03 (br s, 1H, OH), 4.37-4.70 (m, 3H, H2,H3,H4), 4.91-5.16 (m, 1H, C7-NH), 5.30-5.49 (m,1H, C8-NH).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ (ppm): 28.45 (C11 or C12), 28.57 (C12 or C11), 28.67 (C5), 36.77 (C6), 55.82 (C3), 69.91 (C2), 80.00 (C4), 80.26 (C9 or C10), 81.15 (C10 or C9), 156.00 (C7 or C8), 156.79 (C8 or C7), 174.11 (C1).

**(249) (3*S*,4*R*,5*R*)-5-(2-ammonioethyl)-4-hydroxy-2-oxotetrahydrofuran-3-aminium chloride**



The Boc groups were cleaved by HCl in dioxane using the standard protocol described hereabove for (3*S*)-hydroxy-L-lysine. The (3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxy-L-lysine was obtained as a white solid (16 mg, quantitative)

**TLC Rf:** 0.35 (CTDD).

**RMN <sup>1</sup>H** (DMSO, 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 1.91-2.13 (m, 2H, H5), 2.81-3.07 (m, 2H, H6), 4.46-4.58 (m, 2H, H2, H3), 4.60-4.69 (m, 1H, H4), 6.59-6.81 (br s, 1H, OH), 8.06-8.38 (br s, 3H, C6-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8.46-9.06 (br s, 3H, C2-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>).

**RMN <sup>13</sup>C** (DMSO, 75 MHz)  $\delta$  (ppm): 26.35 (C5), 35.31 (C6), 52.55 (C3), 67.70 (C2), 80.19 (C4), 171.87 (C1).



**J- Enzymatic synthesis of (2S)-1,5-diamino-2-pentanol, 1,5-diamino-3-pentanol, (S)-1,4-diamino-2-butanol and (2R,3R)-1,5-diamino-2,3-pentanediol.**

The conversions were determined by HPLC after Fmoc-Cl derivatization (protocol A). Atlantis T3 (3 $\mu$ m 4.5\*150 mm) at 35°C with the gradient 50-86% eluent B (MeCN + 0.1% TFA) and eluent A (H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA) in 20 min at 1 mL/min.

**(251) (2S)-1,5-diamino-2-pentanol**

L-lysine was converted into (3S)-3-hydroxy-L-lysine by LDO1 in conditions described previously. 30  $\mu$ L pyridoxal 5'-phosphate (PLP) 10 mM, 3  $\mu$ L dithiothreitol (DTT) 100 mM and A5FF25 enzyme 50  $\mu$ L 1.5 mg/mL were then added in the reaction medium. The mixture was stirred (1000 rpm) for 18h at 37 °C.

Retention time of (2S)-1,5-diamino-2-pentanol after derivatization with Fmoc: 14.82 min.

**Conversion:** >95%.

Figure 65 shows the monitoring of the enzymatic conversion of L-lysine into (2S)-1,5-diamino-2-pentanol by HPLC according to protocol A (Fmoc derivatization). From bottom to top: HPLC chromatogram obtained for the reaction medium before hydroxylation of L-lysine with LDO1, HPLC chromatogram of the reaction medium after hydroxylation and HPLC chromatogram obtained for the reaction medium after decarboxylation.

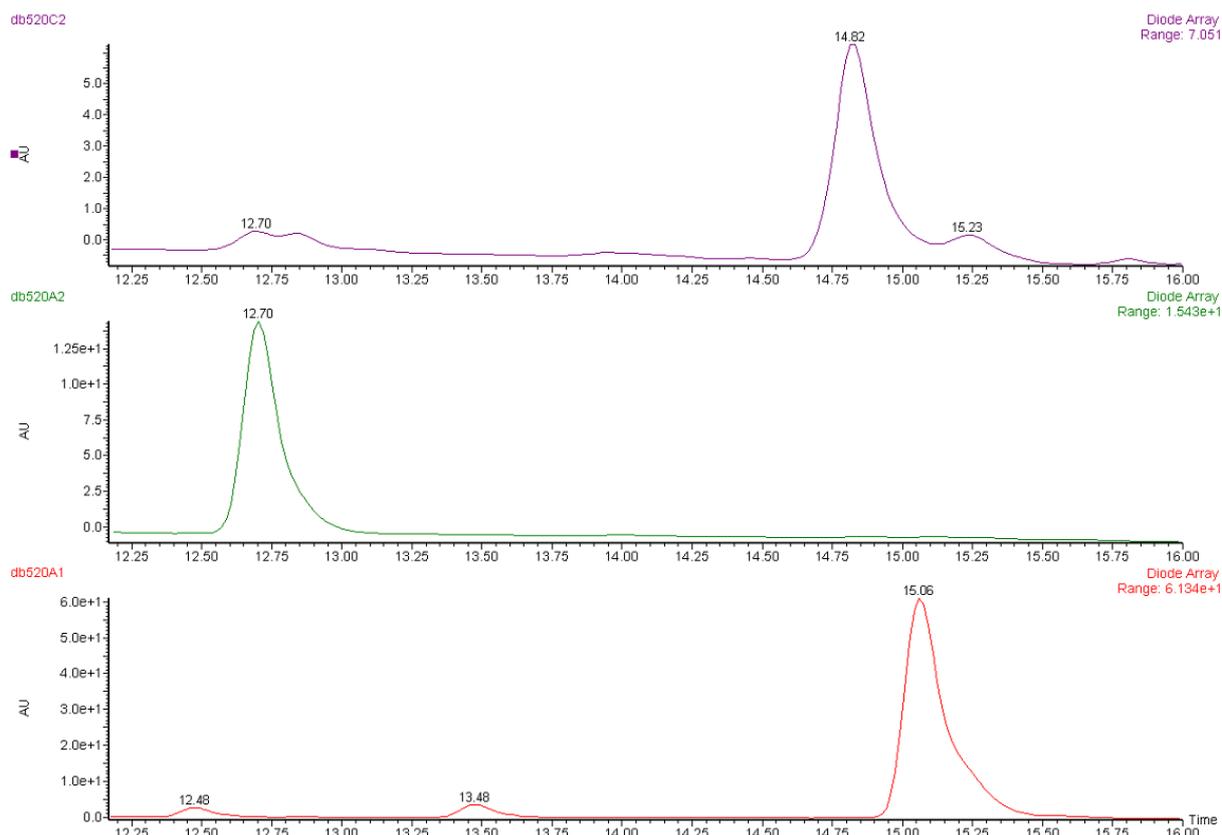


Figure 65

### (252) 1,5-diamino-3-pentanol

Lysine was converted by LDO2 or LDO3 into (4*R*)-4-hydroxy-L-lysine in conditions described previously. 30  $\mu$ L PLP 10 mM, 3  $\mu$ L DTT 100 mM and A5FF25 enzyme 50  $\mu$ L 1.5 mg/mL were then added in the reaction medium to perform decarboxylation. The mixture was stirred (1000 rpm) for 18h at 37 °C.

Retention time of 1,5-diamino-3-pentanol after derivatization with Fmoc: 15.12 min.

**Conversion:** 100%.

Figure 66 shows the monitoring of the enzymatic conversion of L-lysine into 1,5-diamino-3-pentanol by HPLC according to protocol A (Fmoc derivatization). From bottom to top: chromatogram obtained for the reaction medium before hydroxylation (starting product), chromatogram of the reaction medium after hydroxylation of L-lysine with LDO3 and chromatogram obtained for the reaction medium after decarboxylation (final product).

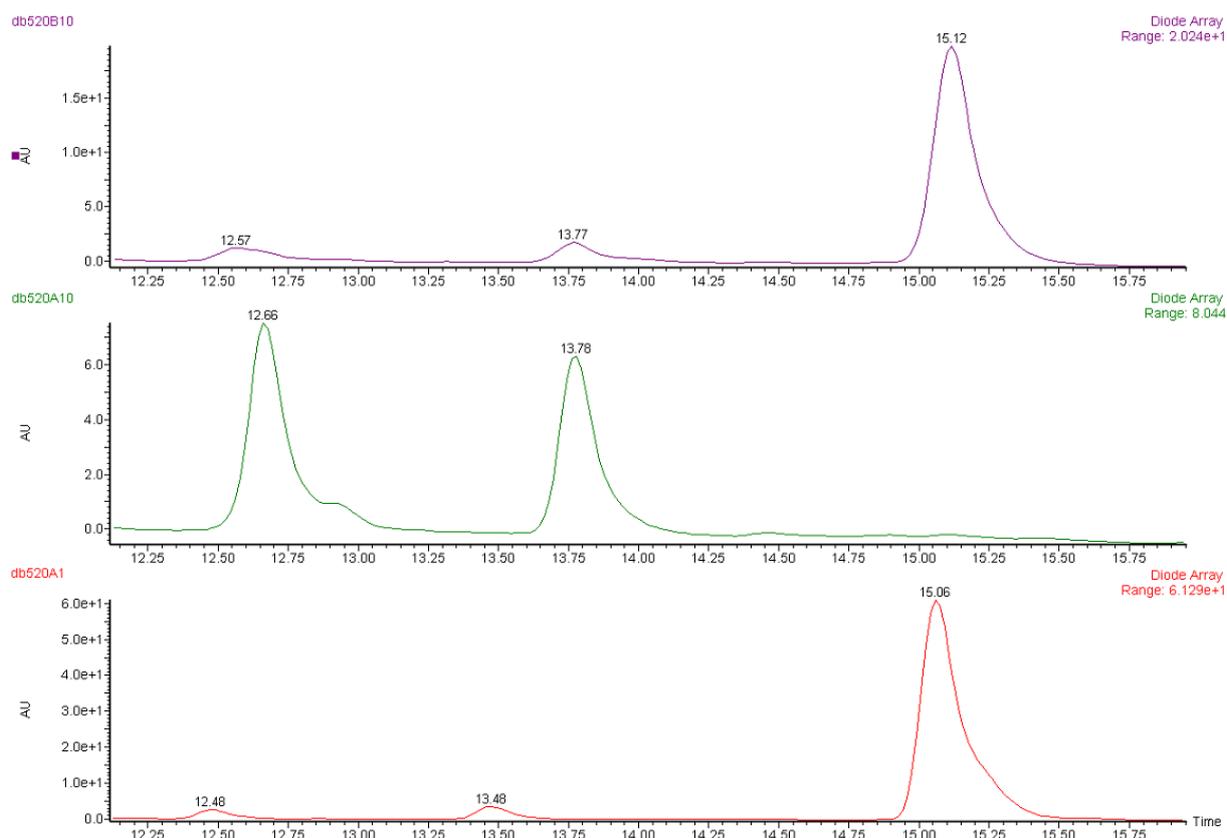


Figure 66

### (2S)-1,4-diamino-2-butanol

Ornithine was converted by OADO into (3S)-3-hydroxy-L-ornithine in conditions described previously. 30  $\mu$ L PLP 10 mM, 3  $\mu$ L DTT 100 mM and A5FF25 enzyme 50  $\mu$ L (lysate) were then added to perform decarboxylation. The mixture was stirred (1000 rpm) for 18h at 37  $^{\circ}$ C.

Retention time of (2S)-1,4-diamino-2-butanol after derivatization with Fmoc: 14.68 min.

**Conversion:** 50%.

Figure 67 shows the monitoring of the enzymatic conversion of L-ornithine into (2S)-1,4-diamino-2-butanol by HPLC according to protocol A (Fmoc derivatization). From bottom to top: chromatogram obtained for the reaction medium before hydroxylation (starting product), chromatogram of the reaction medium after hydroxylation of L-ornithine with OADO and chromatogram obtained for the reaction medium after decarboxylation (final product).

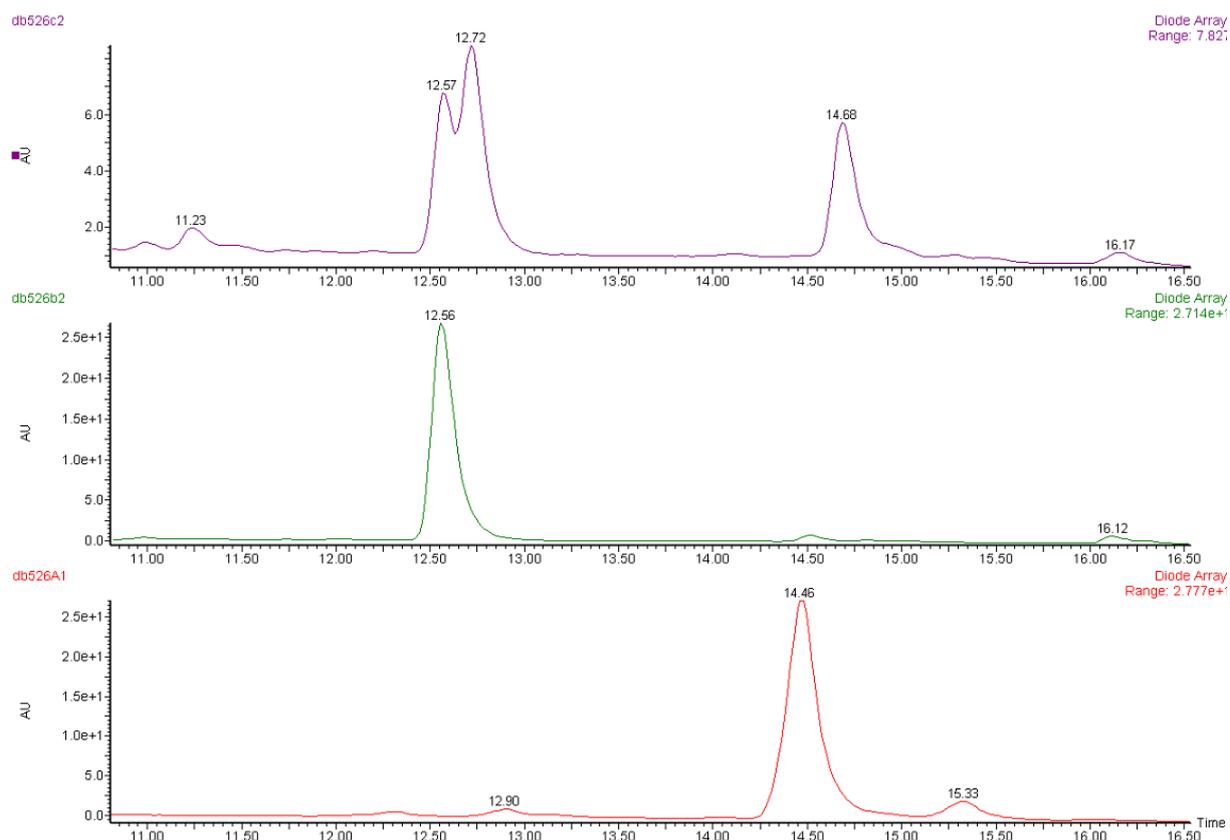


Figure 67

**(254) (2R,3R)-1,5-diamino-2,3-pentanediol**

Lysine was converted into (3R,4R)-3,4-dihydroxy-L-lysine in conditions described previously, by cascade reaction with LDO1 and LDO3. The volume of the reaction medium was reduced to 180  $\mu$ L using a speedvac. 26  $\mu$ L PLP 10 mM, 2.6  $\mu$ L DTT 100 mM A5FF23 enzyme 50  $\mu$ L (lysate) were then added to perform decarboxylation. The mixture was stirred (1000 rpm) for 18h at 37  $^{\circ}$ C.

Retention time of (2R,3R)-1,5-diamino-2,3-pentanediol after derivatization with Fmoc: 12.62 min.

**Conversion:** >90%.

Figure 68 shows the monitoring of the enzymatic conversion of L-lysine into (2R,3R)-1,5-diamino-2,3-pentanediol by HPLC according to protocol A (Fmoc derivatization). From bottom to top: chromatogram obtained for the starting reaction medium, chromatogram obtained after hydroxylation with LDO1, chromatogram obtained for the reaction medium

after the 2<sup>nd</sup> hydroxylation by LDO3 and chromatogram obtained for the reaction medium after decarboxylation (final product).

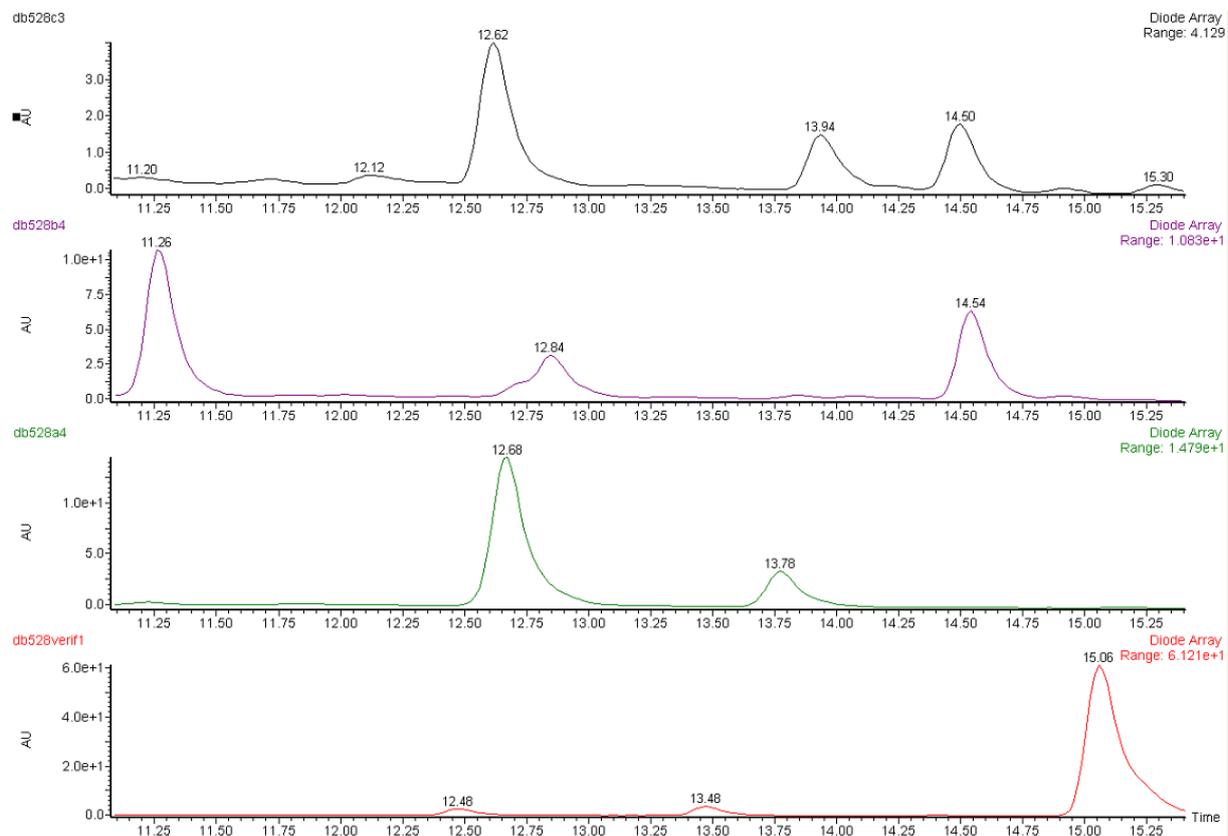
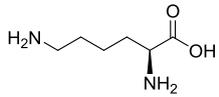
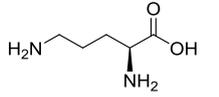
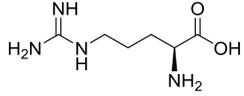
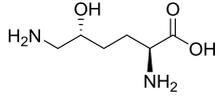
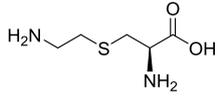
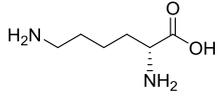
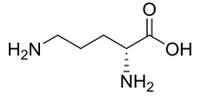
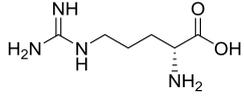
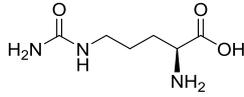


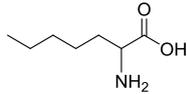
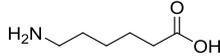
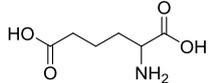
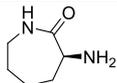
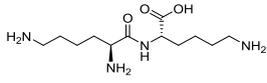
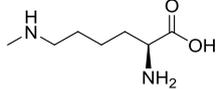
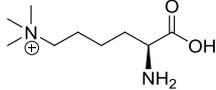
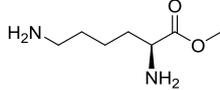
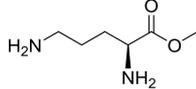
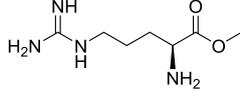
Figure 68

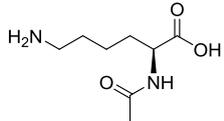
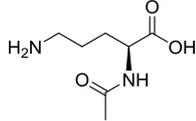
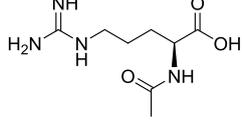
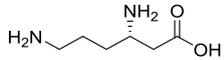


### K- Exploration of substrate promiscuity

Enzymes (0.08 mg/mL) were screened against substrates (ratio  $\alpha$ -ketoglutarate/substrate 15/10) in Hepes buffer 50 mM pH 7.5, with Mohr's salt at 1mM and without sodium ascorbate at room temperature for three hours. Conversions were determined by HPLC after Fmoc-Cl derivatization.

Substrates		LDO1	LDO3	LDO2	OADO
L-lysine		<b>61%</b>	<b>49%</b>	<b>65%</b>	negative
L-ornithine		negative	negative	negative	<b>11%</b>
L-arginine		negative	negative	negative	<b>10%</b>
(5R)-hydroxy-L-lysine		<b>56%</b>	<b>11%</b>	<b>15%</b>	negative
thia-L-lysine		negative	<b>31%</b>	<b>56%</b>	negative
D-lysine		negative	negative	negative	negative
D-ornithine		negative	negative	negative	negative
D-arginine		negative	negative	negative	negative
L-citrulline		negative	negative	negative	negative

Substrates		LDO1	LDO3	LDO2	OADO
2-aminoheptanoic acid		negative	negative	negative	negative
6-aminohexanoic acid		negative	negative	negative	negative
2-aminoadipic acid		negative	negative	negative	negative
cadaverine		negative	negative	negative	negative
putrescine		negative	negative	negative	negative
L-(-)- $\alpha$ -Amino- $\epsilon$ -caprolactam		negative	negative	negative	negative
L-lysyl-L-lysine		negative	negative	negative	negative
<i>N</i> $\epsilon$ -Me-L-lysine		negative	negative	negative	negative
<i>N</i> $\epsilon$ -Me <sub>3</sub> -L-lysine		negative	negative	negative	negative
L-lysine methyl ester		negative	negative	negative	negative
L-ornithine methyl ester		negative	negative	negative	negative
L-arginine methyl ester		negative	negative	negative	negative

Substrates		LDO1	LDO3	LDO2	OADO
<i>N</i> $\alpha$ -acetyl-L-lysine		negative	negative	negative	negative
<i>N</i> $\alpha$ -acetyl-L-ornithine		negative	negative	negative	negative
<i>N</i> $\alpha$ -acetyl-L-arginine		negative	negative	negative	negative
$\beta$ -L-lysine		negative	negative	negative	negative



## **L- General protocols for the derivatization and HPLC conditions**

### Protocol A: Fmoc-cl

Enzymatic reaction (0.2  $\mu$ mole, 1eq.), borate buffer 0,2 M pH 7.7 (80  $\mu$ L) and Fmoc-Cl solution 7.5 mM in acetone (100  $\mu$ L, 0.75  $\mu$ mole, 3.75 eq) were hand shaken in a closed 1.50 mL eppendorf for one minute. The aqueous layer was extracted with petroleum ether (3\*1 mL) to eliminate excess of Fmoc-Cl. 70  $\mu$ L of the aqueous phase were withdrawn, diluted with 70  $\mu$ L of acetonitrile and injected into the HPLC. For substrates with two amine functions, 100  $\mu$ L of Fmoc-cl solution 15 mM were used.

### Protocol B: FDAA

Enzymatic reaction (0.2  $\mu$ mole, 1eq), 1% FDAA solution in acetone (50  $\mu$ L, 1.5  $\mu$ moles, 7.5 eq) and NaHCO<sub>3</sub> solution 1M (10  $\mu$ L, 10  $\mu$ moles, 50 eq.) were stirred in a closed 1.50 mL eppendorf at 43°C, 1000 rpm for 90 minutes. HCl 1M (25  $\mu$ L) was added. 100  $\mu$ L were withdrawn, filtered and injected into the HPLC. For substrates with two amine functions, 120  $\mu$ L of 1% FDAA in acetone were used.

### HPLC conditions for Fmoc-Cl derivatization

Atlantis T3 (3 $\mu$ m 4.5\*150 mm) at 35°C with the gradient 50-86% eluent B (MeCN + 0.1% TFA) and eluent A (H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA) in 20 min at 1 mL/min.

Retention times after derivatization: L-lysine 15.37 min; 3OH-L-lysine 12.88 min; 4OH-L-lysine 12.86 min; 3,4 diOH-L-lysine 11.37 min; L-ornithine 14.69 min; 3OH-L-ornithine 12.72 min.

### HPLC conditions for FDAA derivatization

Atlantis T3 (3  $\mu$ m 4.5\*150 mm) at 35°C the gradient 0% up to 50% in 17 and up to 70% in 2 minutes of eluent B (MeCN + 0.1% TFA) and eluent A (H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA) at 1 mL/min.

Retention times after derivatization: L-arginine 12.70 min; 3-OH-L-arginine 12.09 min



# **Bibliographie**



## Bibliographie

1. Savile, C. K.; Janey, J. M.; Mundorff, E. C.; Moore, J. C.; Tam, S.; Jarvis, W. R.; Colbeck, J. C.; Krebber, A.; Fleitz, F. J.; Brands, J.; Devine, P. N.; Huisman, G. W.; Hughes, G. J., Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. *Science* **2010**, *329* (5989), 305-9.
2. Dumas, J., Ueber die Einwirkung des Chlors auf den aus essigsuren Salzen entstehenden Kohlenwasserstoff. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1840**, *33* (2), 187-189.
3. Walling, C.; Jacknow, B. B., Positive Halogen Compounds. I. The Radical Chain Halogenation of Hydrocarbons by t-Butyl Hypochlorite<sup>1</sup>. *Journal of the American Chemical Society* **1960**, *82* (23), 6108-6112.
4. Walling, C.; Padwa, A., Positive Halogen Compounds. V. t-Butyl Hypobromite and Two New Techniques for Hydrocarbon Bromination<sup>1</sup>. *The Journal of organic chemistry* **1962**, *27* (9), 2976-2977.
5. Schreiner, P. R.; Lauenstein, O.; Kolomitsyn, I. V.; Nadi, S.; Fokin, A. A., Selective C–H Activation of Aliphatic Hydrocarbons under Phase-Transfer Conditions. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37* (13-14), 1895-1897.
6. Fokin, A. A.; Lauenstein, O.; Gunchenko, P. A.; Schreiner, P. R., Halogenation of cubane under phase-transfer conditions: single and double C-H-bond substitution with conservation of the cage structure. *J Am Chem Soc* **2001**, *123* (9), 1842-7.
7. Montoro, R.; Wirth, T., Direct iodination of alkanes. *Organic letters* **2003**, *5* (24), 4729-31.
8. Bergamn, R. G., 4,746,760, **1998**.
9. Stössel, P., 1363 963 B1, **2002**.
10. Nishina, Y.; Hashimoto, H.; Kimura, N.; Miyata, N.; Fujii, T.; Ohtani, B.; Takada, J., Biogenic manganese oxide: effective new catalyst for direct bromination of hydrocarbons. *RSC Advances* **2012**, *2* (16), 6420-6423.
11. Lyakin, O. Y.; Shteinman, A. A., Oxo complexes of high-valence iron in oxidation catalysis. *Kinet Catal* **2012**, *53* (6), 694-713.
12. Liu, W.; Groves, J. T., Manganese Porphyrins Catalyze Selective C–H Bond Halogenations. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (37), 12847-12849.
13. Zhang, L.; Deng, L., C-H bond amination by iron-imido/nitrene species. *Chin. Sci. Bull.* **2012**, *57* (19), 2352-2360.
14. Hennessy, E. T.; Betley, T. A., Complex N-Heterocycle Synthesis via Iron-Catalyzed, Direct C–H Bond Amination. *Science* **2013**, *340* (6132), 591-595.
15. Murray, R. W.; Jeyaraman, R.; Mohan, L., Chemistry of dioxiranes. 4. Oxygen atom insertion into carbon-hydrogen bonds by dimethyldioxirane. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108* (9), 2470-2472.
16. Mello, R.; Fiorentino, M.; Fusco, C.; Curci, R., Oxidations by methyl(trifluoromethyl)dioxirane. 2. Oxyfunctionalization of saturated hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111* (17), 6749-6757.

17. Curci, R.; Detomaso, A.; Lattanzio, M. E.; Carpenter, G. B., Oxidation of Natural Targets by Dioxiranes. 4.1 High Stereo- and Regioselective Conversion of Vitamin D2 to Its (all-R) Tetraepoxide and C-25 Hydroxy Derivative. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (45), 11089-11092.
18. Curci, R.; D'Accolti, L.; Fusco, C., A novel approach to the efficient oxygenation of hydrocarbons under mild conditions. Superior oxo transfer selectivity using dioxiranes. *Acc Chem Res* **2006**, *39* (1), 1-9.
19. DesMarteau, D. D.; Donadelli, A.; Montanari, V.; Petrov, V. A.; Resnati, G., Mild and selective oxyfunctionalization of hydrocarbons by perfluorodialkyloxaziridines. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115* (11), 4897-4898.
20. McNeill, E.; Bois, J. D., Ruthenium-Catalyzed Hydroxylation of Unactivated Tertiary C–H Bonds. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (29), 10202-10204.
21. Lee, S.; Fuchs, P. L., Chemospecific Chromium[VI] Catalyzed Oxidation of C–H Bonds at –40 °C. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (47), 13978-13979.
22. Zhang, S.-Y.; He, G.; Zhao, Y.; Wright, K.; Nack, W. A.; Chen, G., Efficient Alkyl Ether Synthesis via Palladium-Catalyzed, Picolinamide-Directed Alkoxylation of Unactivated C(sp<sup>3</sup>)–H and C(sp<sup>2</sup>)–H Bonds at Remote Positions. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (17), 7313-7316.
23. Ren, Z.; Mo, F.; Dong, G., Catalytic Functionalization of Unactivated sp<sup>3</sup> C–H Bonds via exo-Directing Groups: Synthesis of Chemically Differentiated 1,2-Diols. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (41), 16991-16994.
24. Chen, M. S.; White, M. C., A Predictably Selective Aliphatic C–H Oxidation Reaction for Complex Molecule Synthesis. *Science* **2007**, *318* (5851), 783-787.
25. Zhan, J.; Guo, H.; Dai, J.; Zhang, Y.; Guo, D., Microbial transformations of artemisinin by *Cunninghamella echinulata* and *Aspergillus niger*. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43* (25), 4519-4521.
26. Bigi, M. A.; Reed, S. A.; White, M. C., Diverting non-haem iron catalysed aliphatic C–H hydroxylations towards desaturations. *Nat Chem* **2011**, *3* (3), 216-222.
27. Ottenbacher, R. V.; Samsonenko, D. G.; Talsi, E. P.; Bryliakov, K. P., Highly Efficient, Regioselective, and Stereospecific Oxidation of Aliphatic C–H Groups with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Catalyzed by Aminopyridine Manganese Complexes. *Organic letters* **2012**, *14* (17), 4310-4313.
28. Simmons, E. M.; Hartwig, J. F., Catalytic functionalization of unactivated primary C–H bonds directed by an alcohol. *Nature* **2012**, *483* (7387), 70-73.
29. Shen, B.; Hutchinson, C. R., Tetracenomycin F1 monooxygenase: oxidation of a naphthacene to a naphthacenequinone in the biosynthesis of tetracenomycin C in *Streptomyces glaucescens*. *Biochemistry* **1993**, *32* (26), 6656-63.
30. Fetzner, S., Oxygenases without requirement for cofactors or metal ions. *Applied microbiology and biotechnology* **2002**, *60* (3), 243-57.
31. Green, J.; Dalton, H., Substrate specificity of soluble methane monooxygenase. Mechanistic implications. *J Biol Chem* **1989**, *264* (30), 17698-703.
32. Merckx, M.; Kopp, D. A.; Sazinsky, M. H.; Blazyk, J. L.; Muller, J.; Lippard, S. J., Dioxygen Activation and Methane Hydroxylation by Soluble Methane Monooxygenase: A Tale of Two Irons and Three Proteins A list of abbreviations can be found in Section 7. *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40* (15), 2782-2807.
33. Torres Pazmino, D. E.; Winkler, M.; Glieder, A.; Fraaije, M. W., Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *J Biotechnol* **2010**, *146* (1-2), 9-24.

34. Klinman, J. P., The Copper-Enzyme Family of Dopamine  $\beta$ -Monooxygenase and Peptidylglycine  $\alpha$ -Hydroxylating Monooxygenase: Resolving the Chemical Pathway for Substrate Hydroxylation. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281* (6), 3013-3016.
35. Balasubramanian, R.; Rosenzweig, A. C., Structural and mechanistic insights into methane oxidation by particulate methane monooxygenase. *Acc Chem Res* **2007**, *40* (7), 573-80.
36. van Berkel, W. J.; Kamerbeek, N. M.; Fraaije, M. W., Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J Biotechnol* **2006**, *124* (4), 670-89.
37. Feng, L.; Wang, W.; Cheng, J.; Ren, Y.; Zhao, G.; Gao, C.; Tang, Y.; Liu, X.; Han, W.; Peng, X.; Liu, R.; Wang, L., Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104* (13), 5602-7.
38. Li, L.; Liu, X.; Yang, W.; Xu, F.; Wang, W.; Feng, L.; Bartlam, M.; Wang, L.; Rao, Z., Crystal structure of long-chain alkane monooxygenase (LadA) in complex with coenzyme FMN: unveiling the long-chain alkane hydroxylase. *J Mol Biol* **2008**, *376* (2), 453-65.
39. Danielson, P. B., The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab* **2002**, *3* (6), 561-97.
40. Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Schlichting, I., Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem Rev* **2005**, *105* (6), 2253-77.
41. Persans, M. W.; Wang, J.; Schuler, M. A., Characterization of Maize Cytochrome P450 Monooxygenases Induced in Response to Safeners and Bacterial Pathogens. *Plant Physiol* **2001**, *125*(2) (12), 1126.
42. Urlacher, V. B.; Girhard, M., Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol* **2012**, *30* (1), 26-36.
43. Nelson, D. R.; Schuler, M. A.; Paquette, S. M.; Werck-Reichhart, D.; Bak, S., Comparative genomics of rice and Arabidopsis. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiol* **2004**, *135* (2), 756-72.
44. Nelson, D. R.; Zeldin, D. C.; Hoffman, S. M.; Maltais, L. J.; Wain, H. M.; Nebert, D. W., Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* **2004**, *14* (1), 1-18.
45. Goldstone, J. V.; McArthur, A. G.; Kubota, A.; Zanette, J.; Parente, T.; Jonsson, M. E.; Nelson, D. R.; Stegeman, J. J., Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish. *BMC Genomics* **2010**, *11* (643), 1471-2164.
46. Lamb, D. C.; Ikeda, H.; Nelson, D. R.; Ishikawa, J.; Skaug, T.; Jackson, C.; Omura, S.; Waterman, M. R.; Kelly, S. L., Cytochrome p450 complement (CYPome) of the avermectin-producer *Streptomyces avermitilis* and comparison to that of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochemical and biophysical research communications* **2003**, *307* (3), 610-9.
47. Kumar, S.; Liu, H.; Halpert, J. R., Engineering of cytochrome P450 3A4 for enhanced peroxide-mediated substrate oxidation using directed evolution and site-directed mutagenesis. *Drug Metab Dispos* **2006**, *34* (12), 1958-65.
48. Hasemann, C. A.; Kurumbail, R. G.; Boddupalli, S. S.; Peterson, J. A.; Deisenhofer, J., Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* **1995**, *3* (1), 41-62.
49. Meunier, B.; de Visser, S. P.; Shaik, S., Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. *Chem Rev* **2004**, *104* (9), 3947-80.

50. Woithe, K.; Geib, N.; Zerbe, K.; Li, D. B.; Heck, M.; Fournier-Rousset, S.; Meyer, O.; Vitali, F.; Matoba, N.; Abou-Hadeed, K.; Robinson, J. A., Oxidative Phenol Coupling Reactions Catalyzed by OxyB: A Cytochrome P450 from the Vancomycin Producing Organism. Implications for Vancomycin Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (21), 6887-6895.
51. Shyadehi, A. Z.; Lamb, D. C.; Kelly, S. L.; Kelly, D. E.; Schunck, W. H.; Wright, J. N.; Corina, D.; Akhtar, M., The mechanism of the acyl-carbon bond cleavage reaction catalyzed by recombinant sterol 14 alpha-demethylase of *Candida albicans* (other names are: lanosterol 14 alpha-demethylase, P-45014DM, and CYP51). *J Biol Chem* **1996**, *271* (21), 12445-50.
52. Vaz, A. D.; McGinnity, D. F.; Coon, M. J., Epoxidation of olefins by cytochrome P450: evidence from site-specific mutagenesis for hydroperoxo-iron as an electrophilic oxidant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95* (7), 3555-60.
53. Kim, T.-W.; Hwang, J.-Y.; Kim, Y.-S.; Joo, S.-H.; Chang, S. C.; Lee, J. S.; Takatsuto, S.; Kim, S.-K., Arabidopsis CYP85A2, a Cytochrome P450, Mediates the Baeyer-Villiger Oxidation of Castasterone to Brassinolide in Brassinosteroid Biosynthesis. *The Plant Cell Online* **2005**, *17* (8), 2397-2412.
54. Newcomb, M.; Shen, R.; Lu, Y.; Coon, M. J.; Hollenberg, P. F.; Kopp, D. A.; Lippard, S. J., Evaluation of norcarane as a probe for radicals in cytochrome p450- and soluble methane monooxygenase-catalyzed hydroxylation reactions. *J Am Chem Soc* **2002**, *124* (24), 6879-86.
55. Lewis, D. F.; Eddershaw, P. J.; Dickins, M.; Tarbit, M. H.; Goldfarb, P. S., Structural determinants of cytochrome P450 substrate specificity, binding affinity and catalytic rate. *Chem Biol Interact* **1998**, *115* (3), 175-99.
56. Deman, A. L., WO96/40863, **1997**.
57. Abhilash, P. C.; Jamil, S.; Singh, N., Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. *Biotechnol Adv* **2009**, *27* (4), 474-88.
58. Kumar, S., Engineering cytochrome P450 biocatalysts for biotechnology, medicine and bioremediation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2010**, *6* (2), 115-31.
59. Fasan, R., Tuning P450 Enzymes as Oxidation Catalysts. *ACS Catalysis* **2012**, *2* (4), 647-666.
60. Landwehr, M.; Hochrein, L.; Otey, C. R.; Kasrayan, A.; Backvall, J. E.; Arnold, F. H., Enantioselective alpha-hydroxylation of 2-arylacetic acid derivatives and buspirone catalyzed by engineered cytochrome P450 BM-3. *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (18), 6058-9.
61. Hanson, R. L.; Parker, W. L.; Brzozowski, D. B.; Tully, T. P.; Liu, M.; Kotnis, A.; Patel, R. N., Preparation of (R)- and (S)-6-hydroxybuspirone by enzymatic resolution or hydroxylation. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16* (16), 2711-2716.
62. Sawayama, A. M.; Chen, M. M.; Kulanthaivel, P.; Kuo, M. S.; Hemmerle, H.; Arnold, F. H., A panel of cytochrome P450 BM3 variants to produce drug metabolites and diversify lead compounds. *Chemistry* **2009**, *15* (43), 11723-9.
63. Shoji, O.; Fujishiro, T.; Nakajima, H.; Kim, M.; Nagano, S.; Shiro, Y.; Watanabe, Y., Hydrogen Peroxide Dependent Monooxygenations by Tricking the Substrate Recognition of Cytochrome P450BS $\beta$ . *Angewandte Chemie* **2007**, *119* (20), 3730-3733.
64. Munzer, D. F.; Meinhold, P.; Peters, M. W.; Feichtenhofer, S.; Griengl, H.; Arnold, F. H.; Glieder, A.; de Raadt, A., Stereoselective hydroxylation of an achiral cyclopentanecarboxylic acid derivative using engineered P450s BM-3. *Chem Commun* **2005**, *28* (20), 2597-9.
65. Yoshida, Y., The 50th anniversary and new horizons of cytochrome P450 research: expanding knowledge on the multiplicity and versatility of P450 and its industrial applications. Foreword. *Biol Pharm Bull* **2012**, *35* (6), 811.

66. Bureik, M.; Schiffler, B.; Hiraoka, Y.; Vogel, F.; Bernhardt, R., Functional expression of human mitochondrial CYP11B2 in fission yeast and identification of a new internal electron transfer protein, *etp1*. *Biochemistry* **2002**, *41* (7), 2311-21.
67. Ro, D.-K.; Paradise, E. M.; Ouellet, M.; Fisher, K. J.; Newman, K. L.; Ndungu, J. M.; Ho, K. A.; Eachus, R. A.; Ham, T. S.; Kirby, J.; Chang, M. C. Y.; Withers, S. T.; Shiba, Y.; Sarpong, R.; Keasling, J. D., Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* **2006**, *440* (7086), 940-943.
68. Purpero, V.; Moran, G. R., The diverse and pervasive chemistries of the alpha-keto acid dependent enzymes. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **2007**, *12* (5), 587-601.
69. Tahiliani, M.; Koh, K. P.; Shen, Y.; Pastor, W. A.; Bandukwala, H.; Brudno, Y.; Agarwal, S.; Iyer, L. M.; Liu, D. R.; Aravind, L.; Rao, A., Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science (New York, N.Y.)* **2009**, *324* (5929), 930-5.
70. Griffin, S. L.; Godbey, J. A.; Oman, T. J.; Embrey, S. K.; Karnoup, A.; Kuppannan, K.; Barnett, B. W.; Lin, G.; Harpham, N. V. J.; Juba, A. N.; Schafer, B. W.; Cicchillo, R. M., Characterization of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12, a Nonheme Fe(II)/ $\alpha$ -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenase, Expressed in Transgenic Soybean and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61* (27), 6589-6596.
71. Cultrone, A.; Scazzocchio, C.; Rochet, M.; Montero-Moran, G.; Drevet, C.; Fernandez-Martin, R., Convergent evolution of hydroxylation mechanisms in the fungal kingdom: molybdenum cofactor-independent hydroxylation of xanthine via alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Molecular microbiology* **2005**, *57* (1), 276-90.
72. Gazitua, M. C.; Slater, A. W.; Melo, F.; Gonzalez, B., Novel alpha-ketoglutarate dioxygenase *tfdA*-related genes are found in soil DNA after exposure to phenoxyalkanoic herbicides. *Environ Microbiol* **2010**, *12* (9), 2411-25.
73. Duncan, T.; Trewick, S. C.; Koivisto, P.; Bates, P. A.; Lindahl, T.; Sedgwick, B., Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99* (26), 16660-5.
74. Meza, T. J.; Moen, M. N.; Vagbo, C. B.; Krokan, H. E.; Klungland, A.; Grini, P. E.; Falnes, P. O., The DNA dioxygenase ALKBH2 protects *Arabidopsis thaliana* against methylation damage. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40* (14), 6620-31.
75. Sedgwick, B.; Robins, P.; Lindahl, T., Direct removal of alkylation damage from DNA by AlkB and related DNA dioxygenases. *Methods Enzymol* **2006**, *408*, 108-20.
76. Leung, I. K. H.; Krojer, T. J.; Kochan, G. T.; Henry, L.; von Delft, F.; Claridge, T. D. W.; Oppermann, U.; McDonough, M. A.; Schofield, C. J., Structural and Mechanistic Studies on <sup>3</sup>-Butyrobetaine Hydroxylase. *Chemistry & biology* **2010**, *17* (12), 1316-1324.
77. Rippha, S.; Zhao, Y.; Merlier, F.; Charrier, A.; Perrin, Y., The carnitine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana* shares similar features with the pathway of mammals and fungi. *Plant Physiol Biochem* **2012**, *60*, 109-14.
78. Rebouche, C. J.; Broquist, H. P., Carnitine biosynthesis in *Neurospora crassa*: enzymatic conversion of lysine to epsilon-N-trimethyllysine. *J Bacteriol* **1976**, *126* (3), 1207-14.
79. Lindstedt, G.; Lindstedt, S.; Nordin, I., Purification and properties of gamma-butyrobetaine hydroxylase from *Pseudomonas* sp AK 1. *Biochemistry* **1977**, *16* (10), 2181-8.
80. Myllyharju, J., Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix Biol* **2003**, *22* (1), 15-24.
81. Suokas, M.; Lampela, O.; Juffer, A. H.; Myllyla, R.; Kellokumpu, S., Retrieval-independent localization of lysyl hydroxylase in the endoplasmic reticulum via a peptide fold in its iron-binding domain. *Biochem J* **2003**, *370* (Pt 3), 913-20.

82. Mizuno, M.; Kitafima, T.; Tomita, M.; Kuboki, Y., The osteoblastic MC3T3-E1 cells synthesized C-terminal propeptide of type I collagen, which promoted cell-attachment of osteoblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1996**, *1310* (1), 97-102.
83. Prescott, A. G.; Lloyd, M. D., The iron(II) and 2-oxoacid-dependent dioxygenases and their role in metabolism. *Natural product reports* **2000**, *17* (4), 367-83.
84. Yamada, Y.; Matsuda, J.; Hashimoto, T., *FEBS J* **1993**, *1*(2), 35-39.
85. Strieker, M.; Kopp, F.; Mahlert, C.; Essen, L. O.; Marahiel, M. A., Mechanistic and structural basis of stereospecific C $\beta$ -hydroxylation in calcium-dependent antibiotic, a daptomycin-type lipopeptide. *ACS Chem Biol* **2007**, *2* (3), 187-96.
86. Helmetag, V.; Samel, S. A.; Thomas, M. G.; Marahiel, M. A.; Essen, L. O., Structural basis for the erythro-stereospecificity of the L-arginine oxygenase VioC in viomycin biosynthesis. *FEBS J* **2009**, *276* (13), 3669-82.
87. Haltli, B.; Tan, Y.; Magarvey, N. A.; Wagenaar, M.; Yin, X.; Greenstein, M.; Hucul, J. A.; Zabriskie, T. M., Investigating  $\beta$ -Hydroxyenduracididine Formation in the Biosynthesis of the Mannopeptimycins. *Chemistry & biology* **2005**, *12* (11), 1163-1168.
88. Singh, G. M.; Fortin, P. D.; Koglin, A.; Walsh, C. T., beta-Hydroxylation of the aspartyl residue in the phytotoxin syringomycin E: characterization of two candidate hydroxylases AspH and SyrP in *Pseudomonas syringae*. *Biochemistry* **2008**, *47* (43), 11310-20.
89. Salowe, S. P.; Marsh, E. N.; Townsend, C. A., Purification and characterization of clavaminic synthase from *Streptomyces clavuligerus*: an unusual oxidative enzyme in natural product biosynthesis. *Biochemistry* **1990**, *29* (27), 6499-6508.
90. Borowski, T.; Broclawik, E.; Schofield, C. J.; Siegbahn, P. E., Epimerization and desaturation by carbapenem synthase (CarC). A hybrid DFT study. *J Comput Chem* **2006**, *27* (6), 740-8.
91. Hamed, R. B.; Gomez-Castellanos, J. R.; Henry, L.; Ducho, C.; McDonough, M. A.; Schofield, C. J., The enzymes of beta-lactam biosynthesis. *Natural product reports* **2013**, *30* (1), 21-107.
92. Hara, R.; Kino, K., Characterization of novel 2-oxoglutarate dependent dioxygenases converting L-proline to cis-4-hydroxy-L-proline. *Biochemical and biophysical research communications* **2009**, *379* (4), 882-6.
93. Prabhu, J.; Schauwecker, F.; Grammel, N.; Keller, U.; Bernhard, M., Functional expression of the ectoine hydroxylase gene (thpD) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongata*. *Applied and environmental microbiology* **2004**, *70* (5), 3130-2.
94. Hibi, M.; Kawashima, T.; Kodera, T.; Smirnov, S. V.; Sokolov, P. M.; Sugiyama, M.; Shimizu, S.; Yokozeki, K.; Ogawa, J., Characterization of *Bacillus thuringiensis* L-isoleucine dioxygenase for production of useful amino acids. *Applied and environmental microbiology* **2011**, *77* (19), 6926-30.
95. Hibi, M.; Kawashima, T.; Sokolov, P. M.; Smirnov, S. V.; Kodera, T.; Sugiyama, M.; Shimizu, S.; Yokozeki, K.; Ogawa, J., L-leucine 5-hydroxylase of *Nostoc punctiforme* is a novel type of Fe(II)/ $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenase that is useful as a biocatalyst. *Applied microbiology and biotechnology* **2013**, *97* (6), 2467-72.
96. Hibi, M.; Kawashima, T.; Yajima, H.; Smirnov, S. V.; Kodera, T.; Sugiyama, M.; Shimizu, S.; Yokozeki, K.; Ogawa, J., Enzymatic synthesis of chiral amino acid sulfoxides by Fe(II)/ $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenase. *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24* (17), 990-994.
97. Vaz, F. M.; Ofman, R.; Westinga, K.; Back, J. W.; Wanders, R. J., Molecular and Biochemical Characterization of Rat epsilon -N-Trimethyllysine Hydroxylase, the First Enzyme of Carnitine Biosynthesis. *J Biol Chem* **2001**, *276* (36), 33512-7.

98. Montero-Moran, G. M.; Li, M.; Rendon-Huerta, E.; Jourdan, F.; Lowe, D. J.; Stumpff-Kane, A. W.; Feig, M.; Scazzocchio, C.; Hausinger, R. P., Purification and characterization of the FeII- and alpha-ketoglutarate-dependent xanthine hydroxylase from *Aspergillus nidulans*. *Biochemistry* **2007**, *46* (18), 5293-304.
99. Bankel, L.; Holme, E.; Lindstedt, G.; Lindstedt, S., Oxygenases involved in thymine and thymidine metabolism in *Neurospora crassa*. *FEBS Letters* **1972**, *21* (2), 135-138.
100. You, Z.; Omura, S.; Ikeda, H.; Cane, D. E.; Jogl, G., Crystal structure of the non-heme iron dioxygenase PtlH in pentalenolactone biosynthesis. *J Biol Chem* **2007**, *282* (50), 36552-60.
101. Foulon, V.; Asselberghs, S.; Geens, W.; Mannaerts, G. P.; Casteels, M.; Van Veldhoven, P. P., Further studies on the substrate spectrum of phytanoyl-CoA hydroxylase: implications for Refsum disease? *J Lipid Res* **2003**, *44* (12), 2349-55.
102. Steffan, N.; Grundmann, A.; Afiyatullo, S.; Ruan, H.; Li, S. M., FtmOx1, a non-heme Fe(II) and alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase, catalyses the endoperoxide formation of verruculogen in *Aspergillus fumigatus*. *Org Biomol Chem* **2009**, *7* (19), 4082-7.
103. Sucipto, H.; Kudo, F.; Eguchi, T., The last step of kanamycin biosynthesis: unique deamination reaction catalyzed by the alpha-ketoglutarate-dependent nonheme iron dioxygenase KanJ and the NADPH-dependent reductase KanK. *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, *51* (14), 3428-31.
104. Ding, Y.; Bojja, R. S.; Du, L., Fum3p, a 2-ketoglutarate-dependent dioxygenase required for C-5 hydroxylation of fumonisins in *Fusarium verticillioides*. *Applied and environmental microbiology* **2004**, *70* (4), 1931-4.
105. Li, J.; van Belkum, M. J.; Vederas, J. C., Functional characterization of recombinant hyoscyamine 6beta-hydroxylase from *Atropa belladonna*. *Bioorg Med Chem* **2012**, *20* (14), 4356-63.
106. Eichhorn, E.; van der Ploeg, J. R.; Kertesz, M. A.; Leisinger, T., Characterization of alpha-ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **1997**, *272* (37), 23031-6.
107. Zhang, Z.; Ren, J.; Harlos, K.; McKinnon, C. H.; Clifton, I. J.; Schofield, C. J., Crystal structure of a clavamate synthase-Fe(II)-2-oxoglutarate-substrate-NO complex: evidence for metal centered rearrangements. *FEBS Lett* **2002**, *517* (1-3), 7-12.
108. Simmons, J. M.; Muller, T. A.; Hausinger, R. P., Fe(II)/alpha-ketoglutarate hydroxylases involved in nucleobase, nucleoside, nucleotide, and chromatin metabolism. *Dalton Trans* **2008**, *14* (38), 5132-42.
109. Ozaki, A., 6,617,140 B2, **2003**.
110. Hüttel, W., Biocatalytic Production of Chemical Building Blocks in Technical Scale with  $\alpha$ -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. *Chemie Ingenieur Technik* **2013**, *85* (6), 809-817.
111. Hibi, M.; Kawashima, T.; Kasahara, T.; Sokolov, P. M.; Smirnov, S. V.; Kodera, T.; Sugiyama, M.; Shimizu, S.; Yokozeki, K.; Ogawa, J., A novel Fe(II)/alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase from *Burkholderia ambifaria* has beta-hydroxylating activity of N-succinyl l-leucine. *Letters in applied microbiology* **2012**, *12* (10).
112. Behrens, G. A.; Hummel, A.; Padhi, S. K.; Schätzle, S.; Bornscheuer, U. T., Discovery and Protein Engineering of Biocatalysts for Organic Synthesis. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2011**, *353* (13), 2191-2215.
113. Zhang, J.-H.; Dawes, G.; Stemmer, W. P. C., Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *94* (9), 4504-4509.
114. Yip, S. H.-C.; Foo, J.-L.; Schenk, G.; Gahan, L. R.; Carr, P. D.; Ollis, D. L., Directed evolution combined with rational design increases activity of GpdQ toward a non-

- physiological substrate and alters the oligomeric structure of the enzyme. *Protein Engineering Design and Selection* **2011**, *24* (12), 861-872.
115. McIntosh, J. A.; Coelho, P. S.; Farwell, C. C.; Wang, Z. J.; Lewis, J. C.; Brown, T. R.; Arnold, F. H., Enantioselective Intramolecular C-H Amination Catalyzed by Engineered Cytochrome P450 Enzymes In Vitro and In Vivo. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (35), 9309-9312.
116. Bloom, J. D.; Meyer, M. M.; Meinhold, P.; Otey, C. R.; MacMillan, D.; Arnold, F. H., Evolving strategies for enzyme engineering. *Current Opinion in Structural Biology* **2005**, *15* (4), 447-452.
117. Steiner, K., Schwab, H., Recent advances in rational approaches for enzyme engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **2012**, *2*(3), 1-12.
118. Hilvert, D., Design of protein catalysts. *Annu Rev Biochem* **2013**, *82*, 447-70.
119. Kries, H.; Blomberg, R.; Hilvert, D., De novo enzymes by computational design. *Current Opinion in Chemical Biology* **2013**, *17* (2), 221-228.
120. Strieker, M.; Nolan, E. M.; Walsh, C. T.; Marahiel, M. A., Stereospecific synthesis of threo- and erythro-beta-hydroxyglutamic acid during kutzneride biosynthesis. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (37), 13523-30.
121. Shibasaki, T.; Sakurai, W.; Hasegawa, A.; Uosaki, Y.; Mori, H.; Yoshida, M.; Ozaki, A., Substrate selectivities of proline hydroxylases. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40* (28), 5227-5230.
122. Reuter, K.; Pittelkow, M.; Bursy, J.; Heine, A.; Craan, T.; Bremer, E., Synthesis of 5-hydroxyectoine from ectoine: crystal structure of the non-heme iron(II) and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase EctD. *PLoS one* **2010**, *5* (5), 0010647.
123. Lloyd, M. D.; Lee, H. J.; Harlos, K.; Zhang, Z. H.; Baldwin, J. E.; Schofield, C. J.; Charnock, J. M.; Garner, C. D.; Hara, T.; Terwisscha van Scheltinga, A. C.; Valegard, K.; Viklund, J. A.; Hajdu, J.; Andersson, I.; Danielsson, A.; Bhikhabhai, R., Studies on the active site of deacetoxycephalosporin C synthase. *J Mol Biol* **1999**, *287* (5), 943-60.
124. Aslanidis, C.; de Jong, P. J., Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res* **1990**, *18* (20), 6069-74.
125. Banerjee, A.; Kaul, P.; Sharma, R.; Banerjee, U. C., A high-throughput amenable colorimetric assay for enantioselective screening of nitrilase-producing microorganisms using pH sensitive indicators. *J Biomol Screen* **2003**, *8* (5), 559-65.
126. Suarez, A. S.; Stefan, A.; Lemma, S.; Conte, E.; Hochkoepller, A., Continuous enzyme-coupled assay of phosphate- or pyrophosphate-releasing enzymes. *Biotechniques* **2012**, *53* (2), 99-103.
127. Hopkinson, R. J.; Hamed, R. B.; Rose, N. R.; Claridge, T. D. W.; Schofield, C. J., Monitoring the Activity of 2-Oxoglutarate Dependent Histone Demethylases by NMR Spectroscopy: Direct Observation of Formaldehyde. *ChemBioChem* **2010**, *11* (4), 506-510.
128. Flashman, E.; Hoffart, L. M.; Hamed, R. B.; Bollinger, J. M., Jr.; Krebs, C.; Schofield, C. J., Evidence for the slow reaction of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 with oxygen. *FEBS J* **2010**, *277* (19), 4089-99.
129. Flashman, E.; Davies, S. L.; Yeoh, K. K.; Schofield, C. J., Investigating the dependence of the hypoxia-inducible factor hydroxylases (factor inhibiting HIF and prolyl hydroxylase domain 2) on ascorbate and other reducing agents. *Biochem J* **2010**, *427* (1), 135-42.
130. Zhang, J.-H.; Qi, R. C. C.; Chen, T.; Chung, T. D. Y.; Stern, A. M.; Hollis, G. F.; Copeland, R. A.; Oldenburg, K. R., Development of a Carbon Dioxide-Capture Assay in Microtiter Plate for Aspartyl- $\beta$ -hydroxylase. *Analytical Biochemistry* **1999**, *271* (2), 137-142.
131. Kanelakis, K. C.; Palomino, H. L.; Li, L.; Wu, J.; Yan, W.; Rosen, M. D.; Rizzolio, M. C.; Trivedi, M.; Morton, M. F.; Yang, Y.; Venkatesan, H.; Rabinowitz, M. H.; Shankley, N.

- P.; Barrett, T. D., Characterization of a robust enzymatic assay for inhibitors of 2-oxoglutarate-dependent hydroxylases. *J Biomol Screen* **2009**, *14* (6), 627-35.
132. Bontoux, M. C.; Gelo-Pujic, M., Microbial screening in hydroxylation of l-proline. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47* (51), 9073-9076.
133. Bailey, J.; Bell, E. T.; Bell, J. E., Regulation of bovine glutamate dehydrogenase. The effects of pH and ADP. *J Biol Chem* **1982**, *257* (10), 5579-83.
134. Morano, C.; Zhang, X.; Fricker, L. D., Multiple Isotopic Labels for Quantitative Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (23), 9298-9309.
135. Lloyd, M. D.; Merritt, K. D.; Lee, V.; Sewell, T. J.; Wha-Son, B.; Baldwin, J. E.; Schofield, C. J.; Elson, S. W.; Baggaley, K. H.; Nicholson, N. H., Product-substrate engineering by bacteria: Studies on clavaminic synthase, a trifunctional dioxygenase. *Tetrahedron* **1999**, *55* (33), 10201-10220.
136. Bajwa, J. S., Chemoselective deprotection of benzyl esters in the presence of benzyl ethers, benzyloxymethyl ethers and n-benzyl groups by catalytic transfer hydrogenation. *Tetrahedron Letters* **1992**, *33* (17), 2299-2302.
137. Kahnert, A.; Kertesz, M. A., Characterization of a Sulfur-regulated Oxygenative Alkylsulfatase from *Pseudomonas putida* S-313. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275* (41), 31661-31667.
138. Hibi, M., WO 2011/021717 A2, **2011**.
139. Bhushan, R.; Bruckner, H., Marfey's reagent for chiral amino acid analysis: a review. *Amino Acids* **2004**, *27* (3-4), 231-47.
140. Melucci, D.; Xie, M.; Reschiglian, P.; Torsi, G., Fmoc-Cl as derivatizing agent for the analysis of amino acids and dipeptides by the absolute analysis method. *Chromatographia* **1999**, *49* (5-6), 317-320.
141. Dale, J. A.; Dull, D. L.; Mosher, H. S., .alpha.-Methoxy-.alpha.-trifluoromethylphenylacetic acid, a versatile reagent for the determination of enantiomeric composition of alcohols and amines. *The Journal of organic chemistry* **1969**, *34* (9), 2543-2549.
142. Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R., The Assignment of Absolute Configuration by NMR†. *Chemical Reviews* **2004**, *104* (1), 17-118.
143. Masse, C. E.; Morgan, A. J.; Panek, J. S., An Asymmetric Aminohydroxylation Approach to the Azepine Core of (-)-Balanol. *Organic letters* **2000**, *2* (17), 2571-2573.
144. Izumiya, N.; Fujita, Y.; Irreverre, F.; Witkop, B., The Synthesis of erythro-γ-Hydroxy-L-lysine and Its Nonoccurrence in Collagen\*. *Biochemistry* **1965**, *4* (11), 2501-2507.
145. Yang, R.; Pasunooti, K. K.; Li, F.; Liu, X.-W.; Liu, C.-F., Dual Native Chemical Ligation at Lysine. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (38), 13592-13593.
146. Marin, J.; Briand, J.-P.; Guichard, G., Synthesis of a Galactosylated 4-Hydroxylysine Building Block and Its Incorporation into a Collagen Immunodominant Glycopeptide. *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, *2008* (6), 1005-1012.
147. Wityak, J.; Gould, S. J.; Hein, S. J.; Keszler, D. A., A 1,3-dipolar cycloaddition route to the 3(R)- and 3(S)-hydroxy-2(S)-arginines. *The Journal of organic chemistry* **1987**, *52* (11), 2179-2183.
148. Ju, J.; Ozanick, S. G.; Shen, B.; Thomas, M. G., Conversion of (2S)-arginine to (2S,3R)-capreomycin by VioC and VioD from the viomycin biosynthetic pathway of *Streptomyces* sp. strain ATCC11861. *ChemBioChem* **2004**, *5* (9), 1281-5.
149. Jetten, M.; Peters, C. A. M.; van Nispen, J. W. F. M.; Ottenheijm, H. C. J., A one-pot N-protection of L-arginine. *Tetrahedron Letters* **1991**, *32* (42), 6025-6028.
150. Gregory, N., WO0127084, **2000**.
151. Stranix, B. R., 0151546 A1, **2002**.
152. Gualtieri, M., WO2013045600A1, **2013**.

153. Marino, S. T.; Stachurska-Buczek, D.; Huggins, D. A.; Krywult, B. M.; Sheehan, C. S.; Nguyen, T.; Choi, N.; Parsons, J. G.; Griffiths, P. G.; James, I. W.; Bray, A. M.; White, J. M.; Boyce, R. S., Synthesis of chiral building blocks for use in drug discovery. *Molecules* **2004**, *9* (6), 405-26.
154. Kind, S.; Wittmann, C., Bio-based production of the platform chemical 1,5-diaminopentane. *Applied microbiology and biotechnology* **2011**, *91* (5), 1287-96.
155. Schneider, J.; Wendisch, V. F., Biotechnological production of polyamines by bacteria: recent achievements and future perspectives. *Applied microbiology and biotechnology* **2011**, *91* (1), 17-30.
156. Lindstedt, S.; Lindstedt, G., The Stereochemical Configuration of 5-Hydroxylysine and Synthesis of (+)-1,5-Diamino-2-hydroxypentane (Hydroxycadaverine)1. *The Journal of organic chemistry* **1963**, *28* (1), 251-252.
157. Kayatani, T.; Hayashi, Y.; Suzuki, M.; Uehara, A.,  $\mu$ -Peroxo Dicobalt Complexes Containing an Unsymmetrical Dinucleating Ligand : Synthesis, Characterization, and Oxygen Affinity. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1994**, *67* (11), 2980-2989.
158. Gude, M., WO 2010 041219, **2009**.
159. Chikauchi, K., EP 1985620, **2008**.
160. Lee, J.; Michael, A. J.; Martynowski, D.; Goldsmith, E. J.; Phillips, M. A., Phylogenetic diversity and the structural basis of substrate specificity in the beta/alpha-barrel fold basic amino acid decarboxylases. *J Biol Chem* **2007**, *282* (37), 27115-25.
161. Takatsuka, Y.; Yamaguchi, Y.; Ono, M.; Kamio, Y., Gene cloning and molecular characterization of lysine decarboxylase from *Selenomonas ruminantium* delineate its evolutionary relationship to ornithine decarboxylases from eukaryotes. *J Bacteriol* **2000**, *182* (23), 6732-41.
162. Takatsuka, Y.; Onoda, M.; Sugiyama, T.; Muramoto, K.; Tomita, T.; Kamio, Y., Novel characteristics of *Selenomonas ruminantium* lysine decarboxylase capable of decarboxylating both L-lysine and L-ornithine. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **1999**, *63* (6), 1063-9.
163. Médici, R.; de María, P. D.; Otten, L. G.; Straathof, A. J. J., A High-Throughput Screening Assay for Amino Acid Decarboxylase Activity. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2011**, *353* (13), 2369-2376.

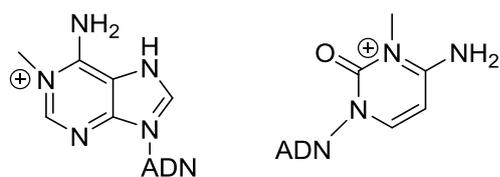
# **Annexes**



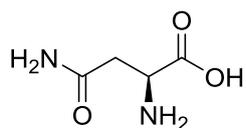
# Annexes

## Annexe 1 : nom des $\alpha$ -KAO et leur substrat

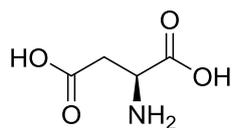
ABH2 : alkylation repair homolog 2 dioxygenase



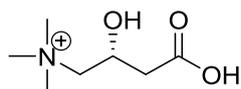
AsnO : asparagine oxygenase



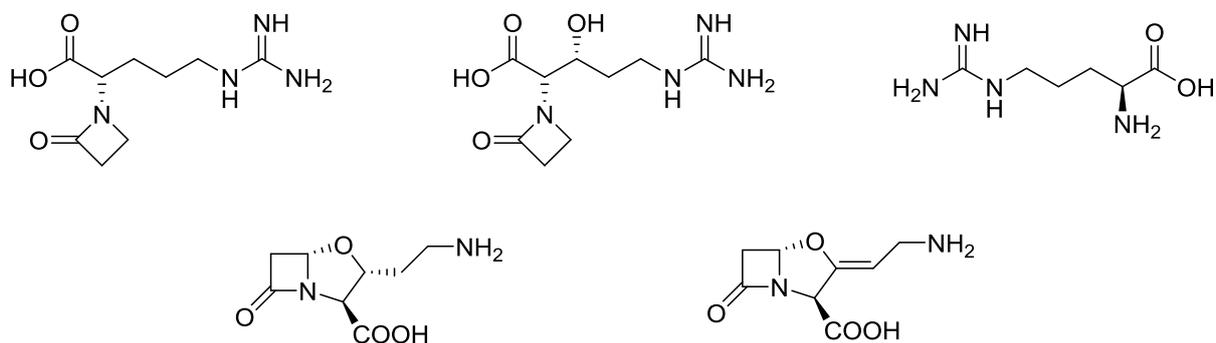
AspH : aspartic acid hydroxylase



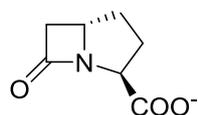
BBOX :  $\gamma$ -butyrobetaine dioxygenase



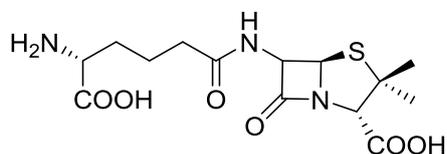
CAS : clavamate synthase



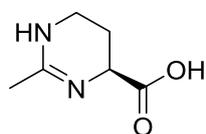
CarC : carbapenem synthase



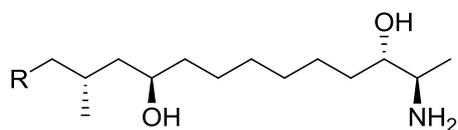
DAOCS : deacetoxycephalosporine synthase



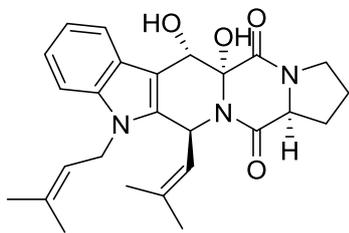
EctD : ectoine hydroxylase D



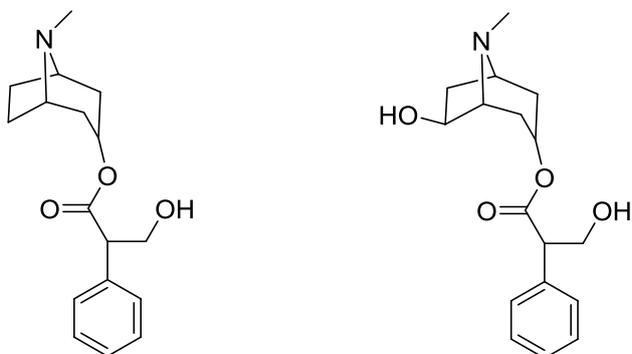
Fum3p : fumonisin B3 hydroxylase



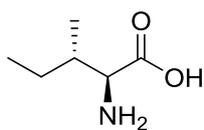
FtmOx1 : fumitremorgin B oxygénase



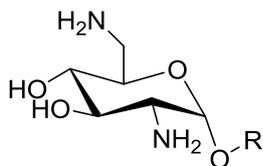
H6H : hyoscyamin-6 $\beta$ -hydroxylase



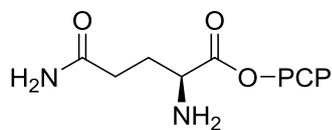
IDO : isoleucine dioxygenase



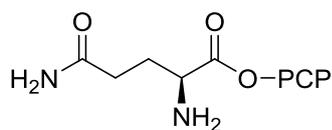
KanJ : kanamycin B dioxygenase



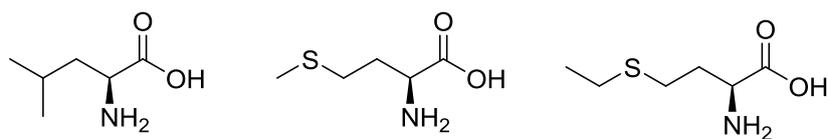
KtzO : glutamate-PCP dioxygenase



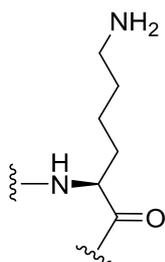
KtzP : glutamate-PCP dioxygenase



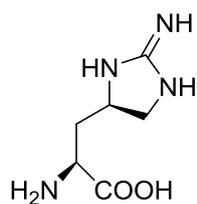
LdoA : leucine dioxygenase A



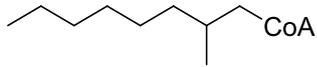
LH : lysil hydroxylase



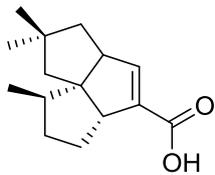
MppO : L-enduracididine hydroxylase



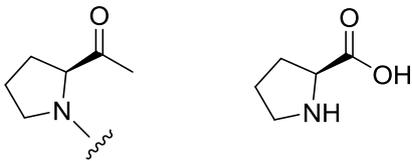
PHAX : phytanoyl-CoA hydroxylase



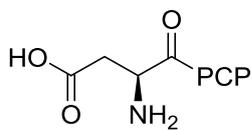
PtIH : 1-deoxypentalenic acid hydroxylase



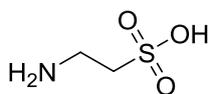
P3H et P4H : prolyl et proline 3-hydroxylase et prolyl et proline 4-hydroxylase



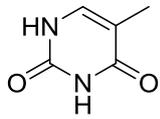
SyrP : Aspartic acid dioxygenase



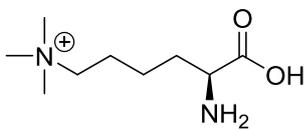
TauD : taurine dioxygénase



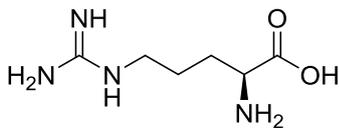
TH : thymine hydroxylase



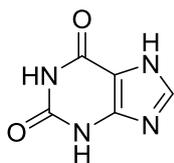
TMLH : trimethyllysine hydroxylase



VioC : L-arginine 3-hydroxylase



XanA : xanthine dioxygenase



## Annexe 2 : tableau récapitulatif des enzymes du premier criblage

Noms	UniprotKB	Organisme	Annotation
DKG_1_A1	A5F9W3	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> (strain ATCC 17061 / DSM 2064 / UW101)	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase
DKG_1_A2	A5FF23	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> (strain ATCC 17061 / DSM 2064 / UW101)	Uncharacterized protein
DKG_1_A3	B2J7U7	<i>Nostoc punctiforme</i> (strain ATCC 29133 / PCC 73102)	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase
DKG_1_A4	B2VF28	<i>Erwinia tasmaniensis</i> (strain DSM 17950 / Et1/99)	Clavamate synthase
DKG_1_A5	Q3M1M9	<i>Anabaena variabilis</i> (strain ATCC 29413 / PCC 7937)	Phytanoyl-CoA dioxygenase
DKG_1_A6	Q3M5N5	<i>Anabaena variabilis</i> (strain ATCC 29413 / PCC 7937)	putative SyrP protein
DKG_1_A7	Q5X263	<i>Legionella pneumophila</i> (strain Paris)	Uncharacterized protein
DKG_1_A8	Q7N1E7	<i>Photobacterium luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i>	peptidyl-amino acid modification
DKG_1_A9	A1U1R2	<i>Marinobacter aquaeolei</i> (strain ATCC 700491 / DSM 11845 / VT8)	Ectoine hydroxylase

Noms	UniprotKB	Organisme	Annotation
DKG_1_A12	A3ZVE0	<i>Blastopirellula marina</i> DSM 3645	L-proline 4-hydroxylase
DKG_1_B1	A6C4T1	<i>Planctomyces maris</i> DSM 8797	Phytanoyl-CoA dioxygenase
DKG_1_B2	A6EZB4	<i>Marinobacter algicola</i> DG893	Ectoine hydroxylase
DKG_1_B3	A8FSQ1	<i>Shewanella sediminis</i> (strain HAW-EB3)	Sec-C motif domain protein
DKG_1_B4	A9AUJ2	<i>Herpetosiphon aurantiacus</i> (strain ATCC 23779 / DSM 785)	Taurine catabolism dioxygenase TauD/TfdA
DKG_1_B5	A9AW95	<i>Herpetosiphon aurantiacus</i> (strain ATCC 23779 / DSM 785)	Taurine catabolism dioxygenase TauD/TfdA
DKG_1_B6	A9KW67	<i>Shewanella baltica</i> (strain OS195)	Aspartyl/Asparaginyl b-hydroxylase
DKG_1_B7	B2J0Y8	<i>Nostoc punctiforme</i> (strain ATCC 29133 / PCC 73102)	Taurine catabolism dioxygenase TauD/TfdA
DKG_1_B8	B2J109	<i>Nostoc punctiforme</i> (strain ATCC 29133 / PCC 73102)	Taurine catabolism dioxygenase TauD/TfdA
DKG_1_B9	B2VKW7	<i>Erwinia tasmaniensis</i> (strain DSM 17950 / Et1/99)	Uncharacterized protein

Noms	UniprotKB	Organisme	Annotation
DKG_1_B10	B4RUG7	<i>Alteromonas macleodii</i> (strain DSM 17117 / Deep ecotype)	Uncharacterized protein
DKG_1_B11	B9JR97	<i>Agrobacterium vitis</i> (strain S4 / ATCC BAA-846)	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase
DKG_1_B12	B9K398	<i>Agrobacterium vitis</i> (strain S4 / ATCC BAA-846)	SyrP-like protein
DKG_1_C1	C7PEB5	<i>Chitinophaga pinensis</i> (strain ATCC 43595 / DSM 2588 / NCIB 11800 / UQM 2034)	Aspartyl/Asparaginyl b-hydroxylase
DKG_1_C2	C7PLM6	<i>Chitinophaga pinensis</i> (strain ATCC 43595 / DSM 2588 / NCIB 11800 / UQM 2034)	Uncharacterized protein
DKG_1_C3	C7PS53	<i>Chitinophaga pinensis</i> (strain ATCC 43595 / DSM 2588 / NCIB 11800 / UQM 2034)	Phytanoyl-CoA dioxygenase
DKG_1_C4	C7PT79	<i>Chitinophaga pinensis</i> (strain ATCC 43595 / DSM 2588 / NCIB 11800 / UQM 2034)	Taurine catabolism dioxygenase TauD/TfdA
DKG_1_C5	C7PT84	<i>Chitinophaga pinensis</i> (strain ATCC 43595 / DSM 2588 / NCIB 11800 / UQM 2034)	Taurine catabolism dioxygenase TauD/TfdA
DKG_1_C6	Q0C182	<i>Hyphomonas neptunium</i> (strain ATCC 15444)	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase

Noms	UniprotKB	Organisme	Annotation
DKG_1_C8	Q0VRL8	<i>Alcanivorax borkumensis</i> (strain SK2 / ATCC 700651 / DSM 11573)	Peptide-aspartate $\beta$ -dioxygenase
DKG_1_C9	Q0VTN7	<i>Alcanivorax borkumensis</i> (strain SK2 / ATCC 700651 / DSM 11573)	uncharacterized protein
DKG_1_C10	Q11R43	<i>Cytophaga hutchinsonii</i> (strain ATCC 33406 / NCIMB 9469)	uncharacterized protein
DKG_1_C11	Q13I30	<i>Burkholderia xenovorans</i> (strain LB400)	Putative membrane protein
DKG_1_C12	Q13YC5	<i>Burkholderia xenovorans</i> (strain LB400)	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase
DKG_1_D1	Q16CC3	<i>Roseobacter denitrificans</i> (strain ATCC 33942 / OCh 114)	Phytanoyl-CoA dioxygenase family protein
DKG_1_D2	Q1QT61	<i>Chromohalobacter salexigens</i> (strain DSM 3043 / ATCC BAA-138 / NCIMB 13768)	Ectoine hydroxylase
DKG_1_D3	Q3JAV4	<i>Nitrosococcus oceani</i> (strain ATCC 19707 / NCIMB 11848)	Phytanoyl-CoA dioxygenase
DKG_1_D4	Q7N7E0	<i>Photorhabdus luminescens subsp. laumondii</i>	oxidoreductase activity

Noms	UniprotKB	Organisme	Annotation
DKG_1_D5	A1TFU2	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	Ectoine hydroxylase
DKG_1_D6	A4TEX0	<i>Mycobacterium gilvum</i> (strain PYR-GCK)	Ectoine hydroxylase
DKG_1_D7	A4XWA2	<i>Pseudomonas mendocina</i> (strain ymp)	Taurine catabolism dioxygenase TauD/TfdA
DKG_1_D8	A5EB99	<i>Bradyrhizobium sp.</i> (strain BTAi1 / ATCC BAA-1182)	Putative ectoine hydroxylase (EctD)
DKG_1_D9	A6GAE5	<i>Plesiocystis pacifica</i> SIR-1	Uncharacterized protein
DKG_1_D10	A9BW12	<i>Delftia acidovorans</i> (strain DSM 14801 / SPH-1)	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase
DKG_1_D11	B1MAS4	<i>Mycobacterium abscessus</i> (strain ATCC 19977 / DSM 44196)	Probable hydroxylase/dioxygenase
DKG_1_D12	B7UXZ8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (strain LESB58)	Lipopolysaccharide biosynthetic protein LpxO2
DKG_1_E1	B7V919	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (strain LESB58)	Putative regulatory protein
DKG_1_E2	B8J5J2	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> (strain 2CP-1 / ATCC BAA-258)	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase

Noms	UniprotKB	Organisme	Annotation
DKG_1_E3	C1DGR0	<i>Azotobacter vinelandii</i> (strain DJ / ATCC BAA-1303)	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase family protein
DKG_1_E4	C1DGR3	<i>Azotobacter vinelandii</i> (strain DJ / ATCC BAA-1303)	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase family protein
DKG_1_E5	C1DIR0	<i>Azotobacter vinelandii</i> (strain DJ / ATCC BAA-1303)	Pyoverdine biosynthesis regulatory protein-TauD/TfdA family protein
DKG_1_E6	C1DMG4	<i>Azotobacter vinelandii</i> (strain DJ / ATCC BAA-1303)	Lipopolysaccharide biosynthetic protein
DKG_1_E7	C2AKI3	<i>Tsukamurella paurometabola</i> DSM 20162	Uncharacterized protein
DKG_1_E8	C4DT36	<i>Stackebrandtia nassauensis</i> DSM 44728	Uncharacterized protein
DKG_1_E9	C4DVR4	<i>Stackebrandtia nassauensis</i> DSM 44728	Uncharacterized protein
DKG_1_E10	C7NKC9	<i>Kytococcus sedentarius</i> (strain ATCC 14392 / DSM 20547 / CCM 314 / 541)	Ectoïne hydroxylase
DKG_1_E11	C7Q927	<i>Catenulispora acidiphila</i> (strain DSM 44928 / NRRL B-24433 / NBRC 102108 / JCM 14897)	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase

Noms	UniprotKB	Organisme	Annotation
DKG_1_E12	C7Q942	<i>Catenulispora acidiphila</i> (strain DSM 44928 / NRRL B-24433 / NBRC 102108 / JCM 14897)	Uncharacterized protein
DKG_1_F1	C7QJ42	<i>Catenulispora acidiphila</i> (strain DSM 44928 / NRRL B-24433 / NBRC 102108 / JCM 14897)	Clavamate synthase
DKG_1_F2	C7QKA8	<i>Catenulispora acidiphila</i> (strain DSM 44928 / NRRL B-24433 / NBRC 102108 / JCM 14897)	Oxygenase (Secreted protein)
DKG_1_F3	D0LJB3	<i>Haliangium ochraceum</i> (strain DSM 14365 / JCM 11303 / SMP-2)	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase
DKG_1_F4	D0LJY6	<i>Haliangium ochraceum</i> (strain DSM 14365 / JCM 11303 / SMP-2)	Taurine catabolism dioxygenase TauD/TfdA
DKG_1_F5	Q0B6W4	<i>Burkholderia ambifaria</i> (strain ATCC BAA-244 / AMMD)	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase
DKG_1_F6	Q0K0K1	<i>Ralstonia eutropha</i> (strain ATCC 17699 / H16 / DSM 428 / Stanier 337)	Pyoverdine biosynthesis regulatory protein
DKG_1_F7	Q0RGQ6	<i>Frankia alni</i> (strain ACN14a)	Putative clavamate synthase-like (Oxidase)
DKG_1_F8	Q0RMP5	<i>Frankia alni</i> (strain ACN14a)	Uncharacterized protein

Noms	UniprotKB	Organisme	Annotation
DKG_1_F9	Q1GNF8	<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase
DKG_1_F10	Q1GNW5	<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	Ectoine hydroxylase
DKG_1_F11	Q1R054	<i>Chromohalobacter salexigens</i> (strain DSM 3043 / ATCC BAA-138 / NCIMB 13768)	Ectoine hydroxylase
DKG_1_F12	Q4UZP4	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (strain 8004)	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase
DKG_1_G1	Q7NZT5	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Probable peptide-aspartate $\beta$ -dioxygenase
DKG_1_G2	Q82BT6	<i>Streptomyces avermitilis</i>	Putative oxygenase
DKG_1_G3	Q93H54	<i>Streptomyces avermitilis</i>	SyrP-like protein
DKG_1_G4	Q3M1M5	<i>Anabaena variabilis</i> (strain ATCC 29413 / PCC 7937)	Condensation domain protein
DKG_1_G5	ACIAD1600	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	Putative alkylsulfatase
DKG_1_G6	ACIAD1592	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	Putative alkylsulfatase

**Annexe 3 : tableau récapitulatif des enzymes du second criblage**

Noms	UniprotKB	Organisme	Annotation
DKG_2_A1	C5BK45	<i>Teredinibacter turnerae</i> (strain ATCC 39867 / T7901)	Taurine catabolism dioxygenase, TauD/TfdA family
DKG_2_A2	D3VKH2	<i>Xenorhabdus nematophila</i> (strain ATCC 19061 / DSM 3370 / LMG 1036 / NCIB 9965 / AN6)	Uncharacterized protein
DKG_2_A3	D4XLW7	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> ATCC 19194	$\beta$ -hydroxylase, aspartyl/asparaginyl family
DKG_2_A4	D4XT98	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> ATCC 19194	$\beta$ -hydroxylase, aspartyl/asparaginyl family
DKG_2_A5	Q72TN9	<i>Leptospira interrogans</i> serogroup <i>Icterohaemorrhagiae</i> serovar <i>copenhageni</i>	Syngomycin channel-forming protein
DKG_2_A6	Q81GX0	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579 / DSM 31)	Uncharacterized protein
DKG_2_A7	A4GAE2	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	Ectoine hydroxylase
DKG_2_A8	A4GAM9	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	Putative membrane-bound b-hydroxylase LpxO-like
DKG_2_A9	B7X454	<i>Comamonas testosteroni</i> KF-1	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase

Noms	UniprotKB	Organisme	Annotation
DKG_2_A10	D3VEV2	<i>Xenorhabdus nematophila</i> (strain ATCC 19061 / DSM 3370 / LMG 1036 / NCIB 9965 / AN6)	Putative Clavamate synthase
DKG_2_A11	D4XML8	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> ATCC 19194	Ectoine hydroxylase
DKG_2_A12	F0SKE3	<i>Planctomyces brasiliensis</i> (strain ATCC 49424 / DSM 5305 / JCM 21570 / NBRC 103401 / IFAM 1448)	Ectoine hydroxylase
DKG_2_B1		<i>Vibrio tapetis</i>	
DKG_2_B2	Q3KD02	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (strain Pf0-1)	Putative $\beta$ -hydroxylase
DKG_2_B3	Q5WC88	<i>Bacillus clausii</i> (strain KSM-K16)	L-proline 4-hydroxylase
DKG_2_B4	Q88K68	<i>Pseudomonas putida</i> (strain KT2440)	Uncharacterized protein
DKG_2_B5		Cloaca maxima	
DKG_2_B6	A1TTJ3	<i>Acidovorax avenae subsp. citrulli</i> (strain AAC00-1)	Taurine catabolism dioxygenase TauD/TfdA

Noms	UniprotKB	Organisme	Annotation
DKG_2_B7	A3JZE9	<i>Sagittula stellata</i> E-37	$\gamma$ -butyrobetaine hydroxylase
DKG_2_B8	A3SJD2	<i>Roseovarius nubinhibens</i> ISM	Putative L-proline 4-hydroxylase
DKG_2_B9	A4JNN7	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> (strain G4 / LMG 22486)	Phytanoyl-CoA dioxygenase
DKG_2_B10	A5G2W9	<i>Acidiphilium cryptum</i> (strain JF-5)	Ectoïne hydroxylase
DKG_2_B11	A5VB25	<i>Sphingomonas wittichii</i> (strain RW1 / DSM 6014 / JCM 10273)	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase
DKG_2_B12	A6WF32	<i>Kineococcus radiotolerans</i> (strain ATCC BAA-149 / DSM 14245 / SRS30216)	Clavamate synthase
DKG_2_C1	A9BM41	<i>Delftia acidovorans</i> (strain DSM 14801 / SPH-1)	Taurine catabolism dioxygenase TauD/TfdA
DKG_2_C2	A9IK00	<i>Bordetella petrii</i> (strain ATCC BAA-461 / DSM 12804 / CCUG 43448)	Putative L-proline 4-hydroxylase
DKG_2_C3	B1FLL7	<i>Burkholderia ambifaria</i> IOP40-10	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase

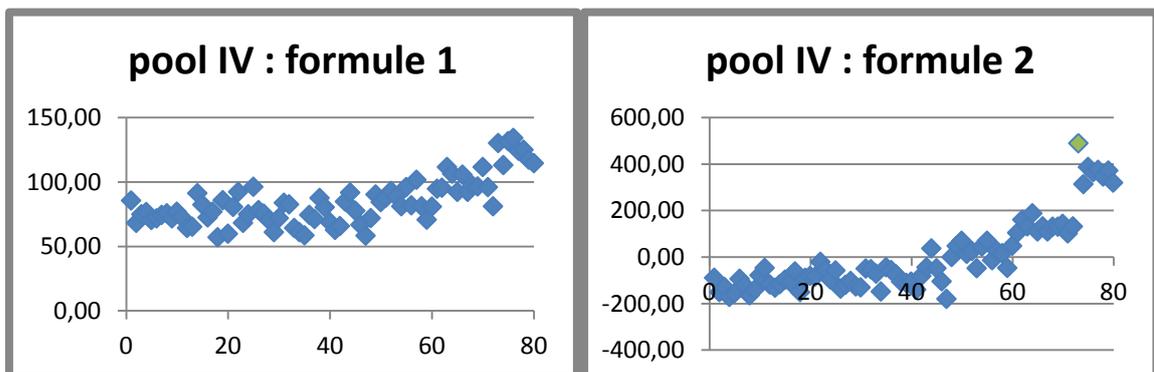
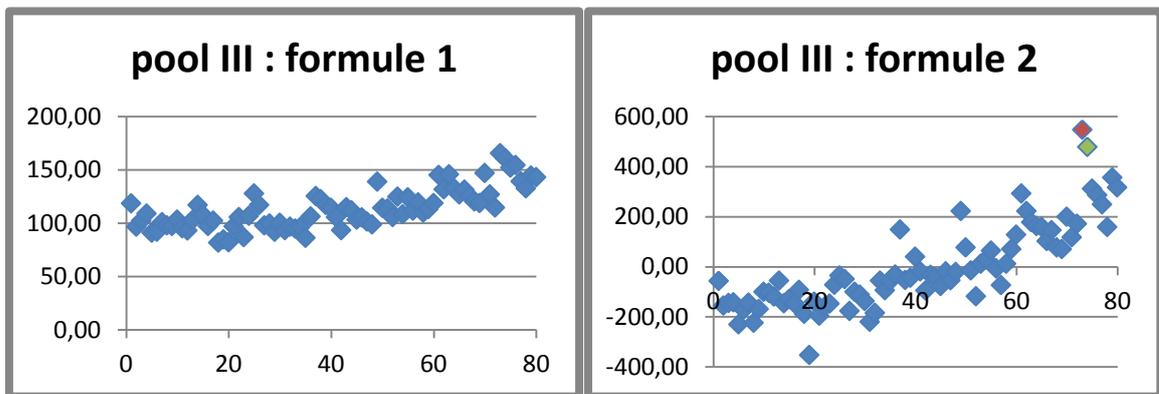
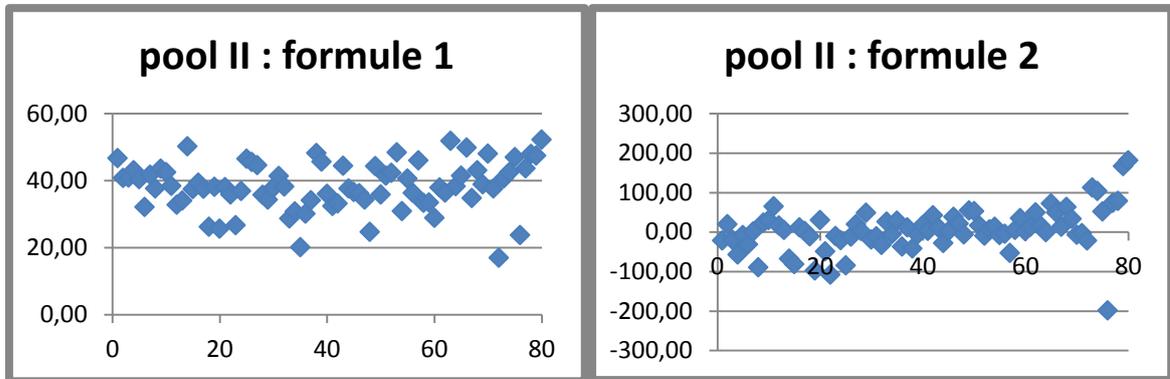
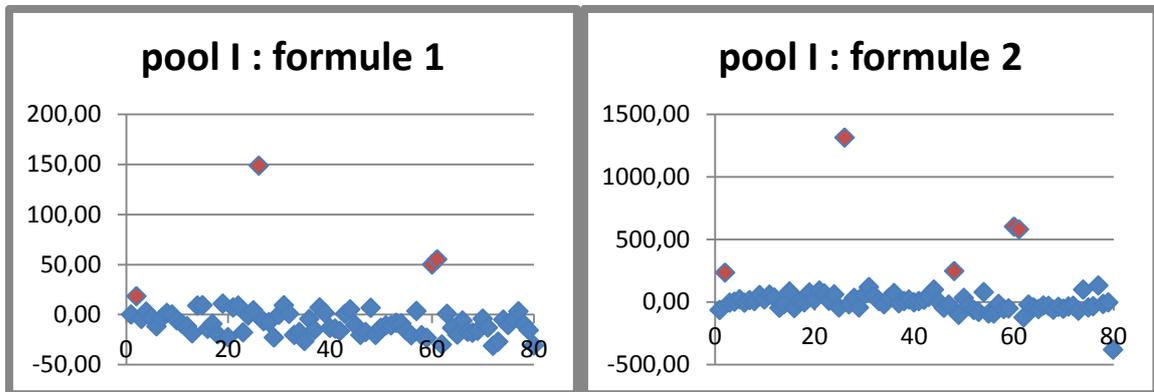
Noms	UniprotKB	Organisme	Annotation
DKG_2_C4	B1T8I0	<i>Burkholderia ambifaria</i> MEX-5	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase
DKG_2_C5	B9Z039	<i>Lutiella nitroferrum</i> 2002	Taurine catabolism dioxygenase TauD/TfdA
DKG_2_C6	C7N0A3	<i>Saccharomonospora viridis</i> (strain ATCC 15386 / DSM 43017 / JCM 3036 / NBRC 12207 / P101)	Taurine catabolism dioxygenase TauD, TfdA family
DKG_2_C7	D2PQ43	<i>Kribbella flavida</i> (strain DSM 17836 / JCM 10339 / NBRC 14399)	Phytanoyl-CoA dioxygenase
DKG_2_C8	D3PZ15	<i>Stackebrandtia nassauensis</i> (strain DSM 44728 / NRRL B-16338 / NBRC 102104 / LLR-40K-21)	Ectoine hydroxylase
DKG_2_C9	D6ZDI9	<i>Segniliparus rotundus</i> (strain ATCC BAA-972 / CDC 1076 / CIP 108378 / DSM 44985 / JCM 13578)	Oxygenase
DKG_2_C10	D7B734	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> (strain ATCC 23218 / DSM 43111 / IMRU 509 / JCM 7437 / NCTC 10488)	Ectoine hydroxylase
DKG_2_C11	D9T104	<i>Micromonospora aurantiaca</i> (strain ATCC 27029 / DSM 43813 / JCM 10878 / NBRC 16125 / INA 9442)	Taurine catabolism dioxygenase TauD/TfdA

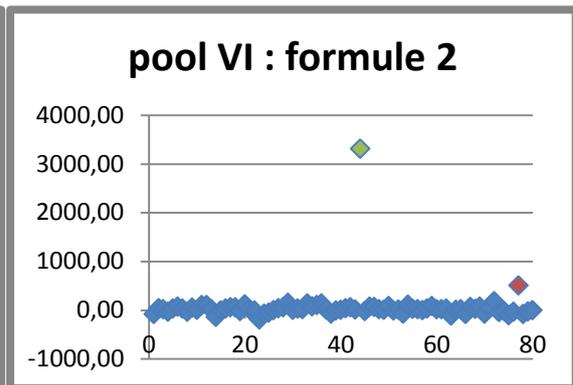
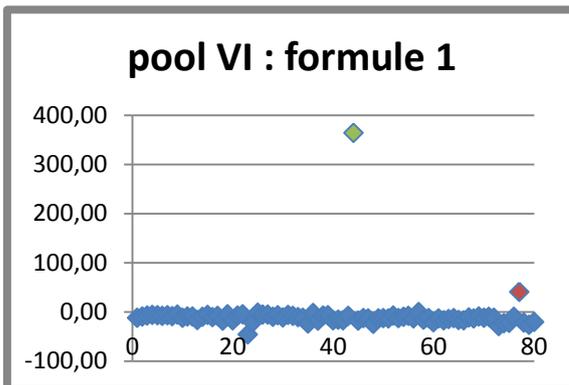
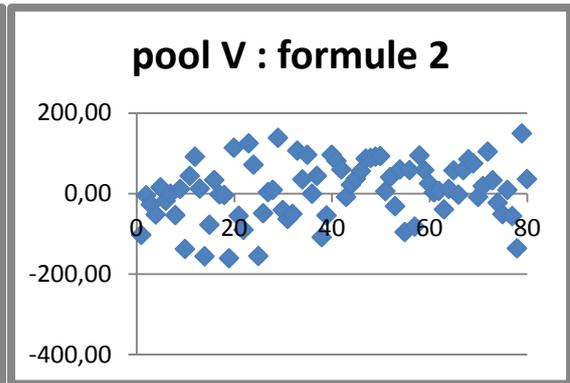
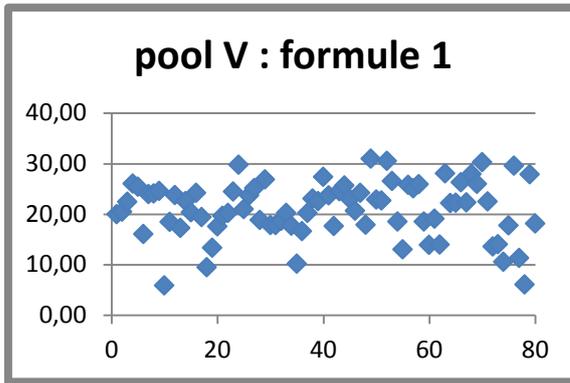
Noms	UniprotKB	Organisme	Annotation
DKG_2_C12	D9WZS0	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> DSM 40736	Ectoine hydroxylase
DKG_2_D1	E3I6L0	<i>Rhodomicrobium vannielii</i> (strain ATCC 17100 / ATH 3.1.1 / DSM 162 / LMG 4299)	Taurine catabolism dioxygenase TauD/TfdA
DKG_2_D2	E6UW98	<i>Variovorax paradoxus</i> EPS	Aspartyl/Asparaginyl $\beta$ -hydroxylase
DKG_2_D3		<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	
DKG_2_D4		<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	
DKG_2_D5		<i>Streptomyces cattleya</i>	
DKG_2_D6	Q0B2E6	<i>Burkholderia ambifaria</i> (strain ATCC BAA-244 / AMMD)	Taurine catabolism dioxygenase TauD/TfdA
DKG_2_D7	Q1AWV7	<i>Rubrobacter xylanophilus</i> (strain DSM 9941 / NBRC 16129)	Uncharacterized protein
DKG_2_D8	Q1QTU1	<i>Chromohalobacter salexigens</i> (strain DSM 3043 / ATCC BAA-138 / NCIMB 13768)	$\gamma$ -butyrobetaine,2-oxoglutarate dioxygenase

Noms	UniprotKB	Organisme	Annotation
DKG_2_D9	Q5LN32	<i>Silicibacter pomeroyi</i>	Putative $\gamma$ -butyrobetaine hydroxylase
DKG_2_D10	Q93H27	<i>Streptomyces avermitilis</i>	SyrP-like protein
DKG_2_D11	Q98KK0	<i>Rhizobium loti</i>	$\gamma$ -butyrobetaine,2-oxoglutarate dioxygenase
DKG_2_D12	Q9I1H2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Uncharacterized protein
DKG_2_E1	B9R6A0	<i>Labrenzia alexandrii</i> DFL-11	Taurine catabolism dioxygenase TauD, TfdA family

**Annexe 4 : résultats du premier criblage**

Code couleur : rouge pour les positifs et vert pour les faux positifs liés à la présence de bulles d'air.





**Annexe 5 : résultats du second criblage**

Code couleur : rouge pour les positifs et vert pour les faux positifs liés à la présence de bulles d'air.

