



Etude de la transcétolase de *Geobacillus stearothermophilus* et modification de son énantiosélectivité par ingénierie enzymatique

Juliane Abdoul-Zabar

► To cite this version:

Juliane Abdoul-Zabar. Etude de la transcétolase de *Geobacillus stearothermophilus* et modification de son énantiosélectivité par ingénierie enzymatique. Autre. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2014. Français. <NNT : 2014CLF22431>. <tel-01020606>

HAL Id: tel-01020606

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01020606>

Submitted on 8 Jul 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : D.U. 2431

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL
U.F.R. de Sciences et Technologies

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES
N°781

THÈSE

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Chimie Organique Biologique

Par

Juliane ABDOUL ZABAR

Ingénieur Chimiste CPE Lyon

**Etude de la transcétolase de *Geobacillus*
stearothermophilus et modification de son
énantiosélectivité par ingénierie enzymatique**

Soutenue publiquement le 10 Janvier 2014, devant la commission d'examen :

Président	M. Marius REGLIER, Directeur de Recherche à l'Institut des Sciences moléculaires de Marseille, Université Aix-Marseille
Rapporteur	Mme Magali REMAUD-SIMEON, Professeur au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes biologiques et des Procédés, INSA, Université de Toulouse
Examineurs	M. Wolf-Dieter FESSNER, Professeur au Laboratoire de Chimie de l'Université Technique de Darmstadt, Allemagne M. Bastien DOUMECHE, Maître de Conférences à l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, Université Lyon 1
Co-encadrant	M. Virgil HELAINE, Maître de Conférences à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, Université Blaise Pascal
Directrice de thèse	Mme Laurence HECQUET, Professeur à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, Université Blaise Pascal

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

A Bà Nôi, ma grand-mère, qui m'a donné force et courage pour avancer.

Elle restera pour toujours dans mon cœur.

Remerciements

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

Je remercie le Pr. Laurence Hecquet, ma directrice de thèse pour m'avoir fait confiance en me confiant ce projet à l'interface entre de nombreuses disciplines, en me sachant purement chimiste. J'ai énormément appris grâce à cette thèse et je lui en suis profondément reconnaissante. Je la remercie pour sa disponibilité et son implication tout au long de ces trois années de thèse.

J'adresse mes remerciements à mes co-encadrants, le Dr. Virgil Hélaine et le Dr. Franck Charmantray, pour leurs conseils notamment en synthèse enzymatique et sur le test de criblage, pour leur patience à répondre à mes nombreuses interrogations et pour leur relecture minutieuse de cette thèse.

Je suis sensible à l'honneur que m'ont fait les membres du Jury, le Pr. Marius Régliez, le Pr. Magali Remaud-Simeon, le Pr. Woody Fessner et le Dr Bastien Doumèche d'avoir accepté de juger mon travail et à l'intérêt qu'ils ont témoigné pour ce projet lors de ma soutenance.

Je tiens à remercier nos partenaires sur ce projet. Je remercie d'une part le Pr. Woody Fessner de l'Université Technique de Darmstadt et les membres de son équipe, le Dr. Titu Devamani et le Dr. Dong Yi. A special thank-you to Dong for sharing his knowledge with me during my mission in Darmstadt and for our many scientific and friendly exchanges since then. Je remercie d'autre part le Dr Véronique de Berardinis et le Dr. Dominique Louis, membres du Génoscope, CEA, Evry et le Dr. Philippe Marlière, de la société Isthmus. Un grand merci au Dr. Isabelle Sorel, qui a consacré son post-doc à la construction des banques de mutagenèse. Je la remercie également pour sa gentillesse et son aide lors de la préparation de ce manuscrit.

Merci à toute l'équipe biocatalyse pour la vie au laboratoire mais aussi pour les échanges scientifiques et conseils que chacun a su me prodiguer tout au long de ma thèse. Je remercie les deux étudiants en stage qui ont contribué à ce projet, Camille Bertrand (stage de Master 1) et Marion Lorillière (stage de Master 2). Un immense merci à Marion pour son implication exceptionnelle sur ce projet mais aussi pour son amitié sincère.

Je tiens à remercier chaleureusement Agnès Rambourdin, technicienne du laboratoire, grâce à qui je n'ai jamais manqué de rien, Martine Sancelme, responsable du service microbiologie, pour la préparation des cultures bactériennes et pour sa gentillesse, le Dr. Vincent Théry et Lionel Nauton pour les travaux de modélisation moléculaire. J'adresse un merci tout particulier à Lionel qui n'a pas compté son temps pour m'aider à réaliser les images de modélisation de ce manuscrit.

Je remercie Régis Egrot pour les analyses par RMN et Bertrand Légeret, le Dr. Cyril Jousse et Angélique Abila, pour les analyses par Spectrophotométrie de masse. Un merci tout particulier Angélique, pour son amitié ! Enfin, un grand merci à Carole Turpin et Stéphanie Bonnefoi, pour leur grande réactivité et leur aide précieuse au niveau administratif.

Merci à mes collègues et camarades de thèse pour tous les bons moments passés au labo. Même si nos conditions de non-permanents nous a parfois géographiquement séparés au cours de ces 3 ans, des liens d'amitié se sont créés que je n'oublierai pas. Mrs Karima (mon égérie ;)), Flora (ma copine de shopping), MC Sibel (We are sexy and we know it !), Marion (Ma Ginette !!!), Thomas et Yuan-Yuan (Allez Saint-Leu !), Angélique, Thomas « Guy », Julie, Nuno, Claire, Stéphane, Camille D., Marion B., Clem, Johan, Paulo et tous les autres, merci infiniment. Un clin d'œil spécial aux « IFMAliens » et/ou « Michelins » qui se reconnaîtront, alliés indispensables pour faire la fête à Clermont-Ferrand et décompresser, surtout pendant lors des moments les plus ardues de la thèse !

Je remercie mes parents, Carime et Béatrice, pour leur soutien moral tout au long de ma thèse. Merci du fond du cœur d'avoir toujours cru en moi et pour vos encouragements sans relâche qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici. Un immense merci à mes grands-parents, mes sœur et frères, mes tantes et à toute ma merveilleuse famille !

Enfin je remercie le Dr. Israel Sanchez-Moreno. Isra, thank you for all your help, first in the lab and also after. I thank you with all my heart for the priceless support you gave me in every moment, without you this would not have been possible.

Sommaire

ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION GENERALE.....	17
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	23
1. LES ENZYMES THIAMINE DIPHOSPHATE-DEPENDANTES.....	25
2. LA TRANSCETOLASE	27
2.1. Rôle de la TK <i>in vivo</i>	27
2.1.1. Réaction catalysée <i>in vivo</i> par la TK	27
2.1.2. Rôle de la TK chez les micro-organismes et les organismes supérieurs.....	28
2.1.3. Rôle de la TK chez les végétaux.....	29
2.2. Identification et production des TK.....	30
2.2.1. TK de <i>S. cerevisiae</i>	31
2.2.2. TK d' <i>E. coli</i>	31
2.3. Etudes cristallographiques des TK.....	32
2.3.1. Structures tridimensionnelles	32
2.3.2. Etudes du site actif de la TK	33
2.3.2.1. Interactions avec les cofacteurs	34
2.3.2.2. Interactions avec les substrats physiologiques.....	35
2.3.3. Comparaison des résidus clés des sites actifs des TK de <i>S. cerevisiae</i> , et d' <i>E. coli</i>	37
2.4. Mécanisme de la Transcétolase	39
2.5. Potentiel synthétique de la TK.....	41
2.5.1. Spécificité de substrat de la TK	41
2.5.1.1. Substrats donneurs	41
2.5.1.2. Substrats accepteurs.....	44
2.5.2. Applications de la TK en synthèse	46
2.6. Immobilisation de la TK	49
2.7. Conclusion	50
3. AMELIORATION ET MODIFICATION DES PROPRIETES DES ENZYMES.....	51
3.1. Introduction sur l'évolution dirigée	51
3.2. Création de la diversité au niveau des gènes	53
3.2.1. Approche aléatoire.....	53
3.2.1.1. Mutagenèse aléatoire.....	53
3.2.1.2. "DNA shuffling"	54

3.2.2.	Approche rationnelle	54
3.2.2.1.	Mutagenèse dirigée	54
3.2.2.2.	Mutagenèse par saturation de site.....	55
3.2.2.3.	Mutagenèse par cassette.....	57
3.2.3.	Conclusion	58
3.3.	Sélection et criblage	59
3.3.1.	Méthodes de sélection.....	60
3.3.2.	Méthodes de criblage.....	60
3.3.2.1.	Criblage avec des substrats chromogéniques ou fluorogéniques	61
3.3.2.2.	Criblage avec des chimiodetecteurs	61
3.3.2.3.	Criblage par des méthodes spectrométriques.....	61
3.3.3.	Conclusion	62
3.4.	Applications de l'évolution dirigée	62
3.5.	Amélioration et modification des propriétés de la TK.....	63
3.5.1.	Tests d'activité de la TK.....	64
3.5.1.1.	Introduction	64
3.5.1.2.	Tests en présence de NADH.....	64
3.5.1.3.	Tests en présence de substrats modifiés	66
3.5.1.4.	Test colorimétrique.....	67
3.5.1.5.	Dosages indirects des substrats ou des produits	68
3.5.1.6.	Test de sélection de la TK	68
3.5.1.7.	Conclusion.....	70
3.5.2.	Ingénierie de la TK.....	70
3.5.2.1.	Introduction	70
3.5.2.2.	Construction des banques de TK par mutagenèse	70
3.5.2.3.	Amélioration de l'activité de la TK pour des substrats accepteurs non- naturels	72
3.5.2.4.	Conclusion.....	75
	OBJECTIFS ET STRATEGIE.....	77
	<i>Objectifs</i>	79
	<i>Stratégie</i>	80
	RESULTATS ET DISCUSSION.....	83
	1. PRODUCTION ET CARACTERISATION D'UNE NOUVELLE TK THERMOSTABLE	85
1.1.	Introduction	85
1.2.	Obtention d'une nouvelle TK thermostable.....	86
1.2.1.	Microorganismes thermophiles comme sources potentielles de TK	86
1.2.2.	Production de TK _{gst} et TK _{gth}	86
1.2.2.1.	Identification des gènes par homologie de séquence	87
1.2.2.2.	Clonage et Surexpression.....	88
1.2.2.3.	Purification.....	89

1.2.3.	Comparaison de la thermostabilité de TK _{gst} et TK _{gth}	92
1.3.	Etude et caractérisation de mTK_{gst}	94
1.3.1.	Etude de l'activité de mTK _{gst}	94
1.3.1.1.	Etude du pH et de la température optimales	94
1.3.1.2.	Etude de la thermostabilité au cours du temps	96
1.3.1.3.	Etude de la stabilité de mTK _{gst} en présence de co-solvants.....	98
1.3.1.4.	Détermination des constantes cinétiques vis-à-vis du L-érythrose et du D-ribose-5-phosphate 102	
1.3.2.	Etude de la spécificité de substrat de mTK _{gst}	104
1.3.2.1.	Etudes préliminaires sur le Li-HPA	105
1.3.2.2.	Détermination des vitesses relatives vis-à-vis de différents aldéhydes	107
1.3.2.1.	Détermination des constantes cinétiques et du facteur d'énantiosélectivité <i>E</i>	110
1.3.3.	Etude de la stéréochimie en C3 et C4 des produits formés par la mTK _{gst}	112
1.3.3.1.1.	Introduction.....	112
1.3.3.2.	Etude de la stéréosélectivité de mTK _{gst} au niveau du C3 formé	114
1.3.3.3.	Etude de la stéréosélectivité de mTK _{gst} au niveau du C4 formé	115
1.3.3.4.	Conclusion.....	116
1.4.	Conclusion	117
2.	MODIFICATION DE L'ENANTIOSELECTIVITE DE LA MTK_{GST} PAR INGENIERIE	119
2.1.	Construction des banques de mTK_{gst} mutées	119
2.1.1.	Introduction	119
2.1.2.	Construction d'un modèle structural de la mTK _{gst} par homologie	119
2.1.3.	Choix des positions clés du site actif pour la modification de l'énantiosélectivité de mTK _{gst}	121
2.1.4.	Banques obtenues par saturation de site (« SSM »)	123
2.1.4.1.	Construction des banques	124
2.1.4.2.	Analyse de la qualité des banques.....	125
2.1.5.	Banques obtenues par la technique de mutagenèse par cassettes (« CM »)	126
2.1.5.1.	Choix des séquences	127
2.1.5.2.	Préparation des cassettes et clonage	130
2.1.5.3.	Analyse des biais générés par la méthode CM	131
2.1.6.	Mise au point d'un protocole de culture et de lyse en vue du criblage des banques SSM et CM	133
2.1.7.	Conclusion	135
2.2.	Développement d'un test pH-métrique pour la TK	137
2.2.1.	Introduction	137
2.2.2.	Principe du test	138
2.2.3.	Paramètre du test pH-métrique pour la quantification des activités de la TK.....	139
2.2.3.1.	Choix du système tampon-indicateur coloré.....	140
2.2.3.2.	Calibration du test	144
2.2.3.3.	Evaluation du test : détermination de constantes cinétiques	147
1.1.3.4.	Evaluation du test vis-à-vis de divers substrats accepteurs	148
2.2.4.	Adaptation du test au criblage des TK mutées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde.....	148
2.2.4.1.	Remarques préliminaires	149
2.2.4.2.	Influence du temps de la mesure	150
2.2.4.3.	Influence du volume de lysat utilisé	151
2.2.4.4.	Influence de la concentration en rouge de phénol.....	152

2.2.4.5.	Influence du pH initial.....	152
2.2.4.6.	Influences combinées de la concentration en rouge de phénol et du volume de lysat	153
2.2.4.7.	Bilan des paramètres requis pour le criblage à haut-débit.....	155
2.2.5.	Optimisation du test pH-métrique pour la quantification de l'activité mTK _{gst}	156
2.2.5.1.	Bilan des conditions du test d'activité pH-métrique quantitatif	156
2.2.5.2.	Calibration du test	157
2.2.6.	Conclusion	159
2.3.	Criblage des mTK_{gst} mutées vis-à-vis d'un aldéhyde α-hydroxylé de configuration (2S)	160
2.3.1.	Introduction	160
2.3.2.	Généralités concernant le criblage des banques CM et SSM	161
2.3.3.	Criblage des banques obtenues par saturation de site (SSM).....	163
2.3.3.1.	Contrôles préliminaires.....	163
2.3.3.2.	Criblage des banques SSM-L382 et SSM-Asp470.....	164
2.3.3.3.	Criblage de la banque SSM-L382D470	165
2.3.3.4.	Second cycle de criblage des 80 variants les plus actifs des banques SSM	168
2.3.4.	Criblage de la banque obtenue par mutagenèse par cassette CM	174
2.3.4.1.	Premier cycle de criblage de la banque CM.....	175
2.3.4.2.	Second cycle de criblage des 80 variants les plus actifs de la banque CM	179
2.3.5.	Conclusion	184
2.4.	Etude des mTK_{gst} mutées les plus performantes	186
2.4.1.	Introduction	186
2.4.2.	Obtention des mTK _{gst} mutées purifiées	187
2.4.3.	Détermination des activités spécifiques vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde... ..	188
2.4.4.	Etude du mutant mTK _{gst} -L382D/D470S	193
2.4.4.1.	Etude de la thermostabilité	193
2.4.4.2.	Etude des vitesses relatives à 20°C et 50°C	193
2.4.4.3.	Synthèse et caractérisation du produit formé.....	195
2.4.4.4.	Construction d'un modèle moléculaire du mutant mTK _{gst} -L382D/D470S	195
2.4.5.	Conclusion	198
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		201
PARTIE EXPERIMENTALE		209
1. MATERIEL.....		211
2. METHODES.....		213
2.1.	Production et purification des TK.....	213
2.1.1.	Généralités	213
2.1.2.	Production des TK	213
2.1.2.1.	Production de TK _{eco}	213
2.1.2.2.	Production des TK _{gthv} TK _{gstv} mTK _{gst}	214
2.1.2.3.	mTK _{gst} mutées	214
2.1.3.	Purification des TK.....	215
2.1.3.1.	Purification par IMAC.....	215

2.1.3.2.	Purification par choc thermique	216
2.1.4.	Stockage des TK.....	216
2.1.5.	Dosage des protéines par le test de Bradford.....	216
2.2.	Dosages enzymatiques	217
2.2.1.	Test d'activité de la transcétolase (« test _{NADH} »)	217
2.2.1.1.	Test en macrocuve.....	217
2.2.1.2.	Test en microplaque 96 puits	218
2.2.2.	Dosage du Li-HPA	219
2.2.2.1.	Test en macrocuve.....	219
2.2.2.2.	Test en microplaque 96 puits	220
2.3.	Caractérisation de mTK_{gst}.....	220
2.3.1.	Détermination du pH et de la température optimaux	220
2.3.2.	Stabilité des TK au cours du temps en fonction de la température et des co-solvants.	221
2.3.3.	Stabilité du Li-HPA en fonction de la température et du tampon.....	221
2.3.4.	Détermination des constantes cinétiques.....	222
2.3.4.1.	Généralités.....	222
2.3.4.2.	Constantes cinétiques du L-érythrose et du D-ribose-5-phosphate.....	222
2.3.4.3.	Constantes cinétiques du Li-HPA	223
2.3.4.4.	Constantes cinétiques du glycolaldéhyde, du D-glyceraldéhyde et du L-glyceraldéhyde	224
2.3.5.	Etude de la spécificité de substrat de mTK _{gst}	224
2.4.	Synthèses chimiques et enzymatiques.....	225
2.4.1.	Généralités	225
2.4.2.	Méthodes	226
2.4.2.1.	Synthèse de l'hydroxypyruvate de lithium (Li-HPA)	226
2.4.2.2.	Synthèse du L-érythrose (1) catalysée par la mTK _{gst}	226
2.4.2.3.	Synthèse de la 1,3-dihydroxybutan-2-one (2) catalysée par la mTK _{gst}	227
2.4.2.4.	Synthèse du D-Xylulose (3) catalysée par la mTK _{gst}	228
2.4.2.5.	Synthèse du L-Ribulose (4) catalysée par la mTK _{gst}	229
2.4.2.6.	Synthèse du L-Ribulose (4) catalysée par la mTK _{gst} -L382D/D470S.....	231
2.5.	Mise au point du test pH-métrique.....	232
2.5.1.	Généralités	232
2.5.1.1.	Calcul des limites de détection et de quantification.....	232
2.5.1.2.	Calcul de l'activité	232
2.5.2.	Conditions du test d'activité en présence de 28 µL de rouge de phénol.....	233
2.5.2.1.	Calibration du test d'activité en présence de 28 µL de rouge de phénol, en fonction de la concentration en NaHCO ₃ (« Courbe de calibration standard »).....	233
2.5.2.2.	Calibration du test d'activité en présence de 28 µL de rouge de phénol, en fonction de la quantité de TK	234
2.5.3.	Conditions du test d'activité en présence de 84 µL de rouge de phénol.....	234
2.5.3.1.	Calibration du test d'activité en présence de 84 µL de rouge de phénol, en fonction de la concentration en NaHCO ₃ (« Courbe de calibration standard »).....	235
2.5.3.2.	Calibration du test d'activité en présence de 28 µL de rouge de phénol, en fonction de la quantité de TK	235
2.5.4.	Optimisation du test de criblage	235
2.5.4.1.	Généralités.....	235
2.5.4.2.	Mesure du rapport Signal/Bruit en fonction du temps	235

2.5.4.3.	Influence du volume de lysat utilisé	236
2.5.4.4.	Influence de la concentration en rouge de phénol.....	236
2.5.4.5.	Absorbance en fonction du pH	236
2.5.4.6.	Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en rouge de phénol et du volume de lysat	237
2.6.	Criblage des mTK_{gst} mutées.....	237
2.6.1.	Premier cycle de criblage	237
2.6.1.1.	Culture et criblage des clones des banques SSM	237
2.6.1.2.	Culture et criblage des clones de la banque CM.....	238
2.6.1.3.	Traitement des données	239
2.6.2.	Second cycle de criblage	239
2.6.2.1.	Second cycle de criblage pour la banque SSM.....	239
2.6.2.2.	Second cycle de criblage pour la banque CM	240
2.7.	Caractérisation des mTK_{gst} mutées les plus performantes	240
2.7.1.	Détermination des activités spécifiques vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde des 8 mTK _{gst} mutées.....	240
2.7.2.	Etude de la thermostabilité du mutant L382D/D470S	241
2.7.3.	Détermination des activités spécifiques du mutant L382D/D470S vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde en fonction de la température	241
ANNEXES	243	
Annexe 1 : Sucres phosphorylés	245	
Annexe 2 : Code génétique.....	246	
Annexe 3 : Les vingt acides aminés.....	247	
Annexe 4 : Séquençage des 72 mTK_{gst} les plus actives des banques SSM	248	
Annexe 5 : Séquençage des 80 mTK_{gst} les plus actives de la banque CM	249	
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	251	
PUBLICATIONS.....	263	

Abréviations

A	Absorbance
ADH	Alcool déshydrogénase
ADN	Acide désoxyribonucléique
Amp	Ampicilline
A_{rel}	Absorbance relative
BMIM	1-Butyl-3-méthylimidazolium
BSA	Albumine de sérum bovin
C10MIM	1-Decyl-3-méthylimidazolium
CH	Cellule hôte
CM	Mutagenèse par cassette
D-E4P	D-Erythrose-4-phosphate
D-F6P	D-fructose-1,6-bisphosphate
D-G3P	D-glycéraldéhyde-3-phosphate
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
DHE	Dihydroxyéthyle
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
D-R5P	D-Ribose-5-phosphate
D-Ru5P	D-Ribulose-5-phosphate
D-S7P	D-Sédoheptulose-7-phosphate
D-X5P	D-Xylose-5-phosphate
<i>E</i>	Facteur d'énantiosélectivité
<i>ed</i>	excès diastéréoisomérique
<i>ee</i>	excès énantiomérique
FruA	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GDH	α -Glycérophosphate deshydrogénase
Gly-gly	Glycylglycine

HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPA	Acide hydroxypyruvique
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
IMAC	Chromatographie par affinité métallique ionique
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside
Kan	Kanamycine
k_{cat}	Constante catalytique
K_M	Constante de Michaelis-Menten
l	largeur de cuve ou hauteur de puits
LB	Luria-Bertani
LDH	L-lactate déshydrogénase
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
MS	Spectrométrie de masse
MT	4-méthyl-thiazolium
NADH	Nicotinamide dinucléotide
NADPH	Nicotinamide dinucléotide phosphate
NBT	Nitrobleu tétrazolium
NTA	Acide nitriloacétique
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PM	Poids moléculaire
PP	Pyrophosphate
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SSM	Mutagenèse par saturation de site
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEA	Triéthanolamine
ThDP	Diphosphate de thiamine
TK	Transcétolase
TK_{ban}	Transcétolase de <i>Bacillus anthracis</i>
TK_{eco}	Transcétolase de <i>E. coli</i>
TK_{gst}	Transcétolase de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>

TK_{gth}	Transcétolase de <i>Geobacillus thermodenitrificans</i>
TK_{sce}	Transcétolase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TPI	Triose phosphate isomérase
Tris	trishydroxyméthylaminométhane
V	Vitesse
V_{max}	Vitesse initiale maximale
λ	Longueur d'onde
σ	Ecart-type
wt	Type sauvage (wild-type)

Introduction Générale

Le besoin en produits énantiomériquement purs de plus en plus complexes est en constante augmentation, en particulier dans le secteur pharmaceutique mais également dans d'autres domaines tels que l'agroalimentaire et les cosmétiques. Leur obtention est un défi majeur en synthèse organique et a conduit à la conception de nombreuses stratégies de synthèse asymétrique, dont le recours aux catalyseurs organométalliques. Mais depuis une trentaine d'année, une alternative attractive a émergé et s'est progressivement imposée comme un moyen puissant permettant d'accéder aux molécules chirales : la biocatalyse.

La biocatalyse est l'utilisation de catalyseurs naturels afin de réaliser une transformation chimique de composés organiques. Des milliers de transformations biocatalytiques ont lieu dans les organismes vivants, permettant la formation des composés essentiels à leur fonctionnement. Dès l'antiquité, l'homme a utilisé des micro-organismes comme par exemple des levures pour la préparation d'aliments fermentés tels que la bière. Actuellement les biocatalyseurs (enzymes isolées, système multi-enzymatique, voire même micro-organismes entiers), séduisent les chimistes car ils permettent de catalyser un large éventail de réactions avec d'excellentes chimio-, régio-, et stéréosélectivités, ce qui évite notamment l'obtention de produits secondaires non-désirés et des étapes de protections et de déprotections.

Par ailleurs, l'utilisation des biocatalyseurs en synthèse est particulièrement compatible avec la préservation de l'environnement. En effet, les réactions sont réalisées dans des conditions douces : milieux aqueux, pH non extrêmes, température ambiante et pression atmosphérique, sans solvants toxiques et polluants pour l'environnement. De plus, les biocatalyseurs sont biodégradables et extraits de la biomasse, matière première renouvelable. Ils respectent ainsi les douze principes de la chimie verte (Figure 1).

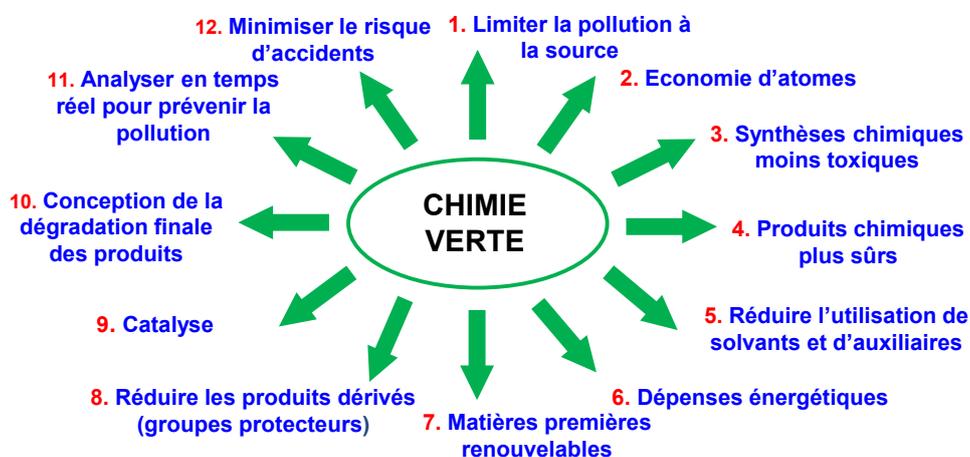


Figure 1 : Douze principes de la chimie verte

Toutefois, si grâce à l'Évolution les enzymes sont parfaitement optimisées pour leur rôle au sein d'un organisme, elles ne sont pas forcément adaptées aux conditions requises pour leur utilisation dans des conditions non-physiologiques, ce qui a freiné le développement de leur application à l'échelle industrielle. En effet, elles sont généralement spécifiques de substrats naturels, inhibées par des trop grandes concentrations en substrats et peuvent nécessiter la présence de cofacteurs, parfois coûteux. De plus, elles sont fragiles hors du milieu physiologique ce qui rend parfois leur conservation délicate et d'autre part limite leur utilisation dans les solvants organiques, nécessaires pour les composés hydrophobes. Pour pallier à ces inconvénients, de nouvelles stratégies faisant appel à la biologie moléculaire, telle que l'évolution dirigée, ont été développées afin de façonner les enzymes et les adapter aux nouvelles conditions requises. Ainsi, les exemples abondent dans lesquels les propriétés d'une enzyme, telles que la stabilité thermique, la tolérance aux co-solvants, le spectre de substrats ou encore la stéréosélectivité, ont été modifiées ou améliorées efficacement, permettant ainsi son utilisation dans des procédés industriels.

L'emploi de biocatalyseurs est particulièrement adapté à la chimie des carbohydrates car le caractère multifonctionnel des sucres en font un défi de taille pour les chimistes organiciens qui doivent recourir à différents groupements protecteurs afin d'éviter les réactions secondaires sur les groupements hydroxyle, carbonyle ou phosphate. De plus, les monosaccharides et analogues sont une cible majeure de recherche en Biologie car ils interviennent dans de nombreuses fonctions biochimiques au sein de l'organisme tels que les réponses immunitaires, la croissance des cellules ou encore le développement de métastases. Les sucres, utilisés seuls ou comme synthons pour la préparation de molécules plus complexes, peuvent être employés d'une part pour explorer les fonctions biologiques et d'autre part comme agents thérapeutiques en tant qu'antiviraux, antibiotiques, antithrombotiques, inhibiteurs de glycosidases, phéromones ou vitamines.

Les monosaccharides, phosphorylés ou non, sont souvent obtenus par l'isomérisation d'autres monosaccharides, catalysée par des enzymes de la classe des isomérases. D'autres enzymes, de la classe des lyases et des transférases, permettent d'accéder à ces composés en une étape par formation stéréospécifique d'une liaison C-C à partir d'un substrat donneur et d'un substrat accepteur. Ces dernières ont pour avantage d'avoir une grande flexibilité au niveau des substrats pouvant présenter des structures très éloignées des substrats physiologiques, ce qui est plus rarement le cas des isomérases. En particulier, l'une de ces enzymes, la Transcétolase, appartenant à la classe des transférases, permet l'obtention de cétooses de configuration *D-thréo* (3*S*,4*R*) selon une réaction irréversible (Figure 2a) et a été abondamment utilisée pour la synthèse de composés à intérêt biologique

présentant une grande diversité structurale tels que les sucres phosphorylés, des thiosucres et des aminoalcools. Cependant, la spécificité de substrat de la transcétolase conduit exclusivement aux cétooses de configuration *D-thréo* (3*S*,4*R*) car elle accepte uniquement des substrats accepteurs de configuration (2*R*) (Figure 2a).

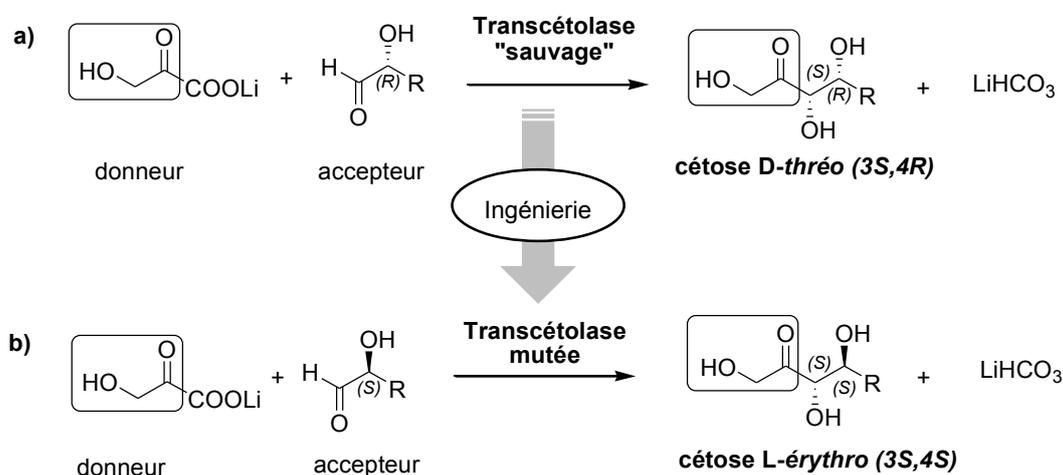


Figure 2 : Réaction catalysée par la transcétolase

a) Réaction catalysée par la transcétolase de type sauvage ; b) Réaction envisagée afin d'inverser l'énantiosélectivité

Notre objectif est d'inverser l'énantiosélectivité de la transcétolase pour accéder à des cétooses de configuration *L-érythro* (3*S*, 4*S*) (Figure 2b). Nous avons donc entrepris de modifier cette enzyme par ingénierie rationnelle et semi-rationnelle de manière à ce que les substrats de configuration (2*S*) soient acceptés. Cette stratégie s'inscrit dans le contexte actuel des recherches sur la transcétolase visant à modifier les propriétés de cette enzyme. En effet, des études récentes ont permis de modifier sa stéréospécificité, permettant ainsi l'obtention de cétooses de configuration (3*R*).[1] Cependant ces travaux ont été réalisés exclusivement en présence d'aldéhydes hydrophobes, non-hydroxylés en position 2. Aucune étude jusqu'alors n'a porté sur l'inversion de l'énantiosélectivité en présence d'aldéhydes α -hydroxylés.

L'intérêt des cétooses de configuration *L-thréo* (3*S*, 4*S*) n'a été que récemment étudié dans la littérature. Parmi eux, le *L-ribulose*, pentose rare et coûteux (3 420 € le gramme chez Sigma-Aldrich) peut être utilisé comme précurseur pour la production d'autres sucres rares à haute valeur marchande. Bien qu'il soit un intermédiaire métabolique au sein de différents organismes, le *L-ribulose* est très peu abondant dans la nature. Le marché des sucres rares ou non-naturels est en augmentation, en particulier pour les composés pharmaceutiques et les édulcorants faiblement caloriques. Par exemple, différents nucléosides modifiés obtenus

à partir du L-ribulose, sont utilisés comme médicaments antiviraux potentiels et dans l'immunothérapie.[2] Des dérivés de sucres rares ont également été utilisés comme agents contre les virus de l'hépatite B et de l'immunodéficience humaine.[3] Un autre cétose de configuration L-*thréo* suscitant un intérêt croissant est le D-tagatose, hexose considéré comme agent thérapeutique dans le diabète mellitus de type II et également utilisé comme édulcorant faiblement calorique.[4] La production de L-ribulose et de D-tagatose par voie biocatalytique a été récemment étudiée. Les synthèses décrites reposent principalement sur l'isomérisation du L-arabinose en L-ribulose et du D-ribose en D-tagatose en présence de L-arabinose isomérases extraites de microorganismes variés.[5]

Dans ce manuscrit, un premier chapitre consacré à l'étude bibliographique présentera tout d'abord la transcétolase, ses propriétés et ses applications, puis recensera les principales stratégies utilisées à ce jour pour la modification et l'amélioration d'enzymes. A l'issue de cette étude bibliographique, nos objectifs et la stratégie que nous avons envisagée seront exposés. Dans le chapitre suivant, les résultats de nos travaux seront ensuite décrits et discutés. Ils concerneront tout d'abord la découverte et la caractérisation d'une nouvelle transcétolase thermostable puis la modification de celle-ci par ingénierie rationnelle et semi-rationnelle, c'est-à-dire la construction de banques de transcétolases modifiées par mutagenèse, la mise au point d'un test de criblage haut-débit, le criblage des banques et la sélection des transcétolases présentant la propriété recherchée. Une conclusion dressant le bilan des résultats, ainsi que les perspectives envisagées termineront ce travail. Enfin, une partie expérimentale en fin de document détaillera l'ensemble des protocoles mis en œuvre.

Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un programme blanc international franco-allemand financé par l'Agence Nationale pour la Recherche (Projet ANR « deoTK »). Les travaux ont été réalisés au sein de l'équipe Synthèse et Etude de Systèmes à Intérêts Biologiques (SEESIB) appartenant à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, en partenariat avec le laboratoire de Chimie de l'Université Technique de Darmstadt, Allemagne et en collaboration avec le Genoscope (CEA), Evry.

Etude Bibliographique

1. Les enzymes thiamine diphosphate-dépendantes

Le diphosphate de thiamine (ThDP) est la forme active de la vitamine B₁. Les enzymes ThDP-dépendantes sont une large famille d'enzymes qui utilisent le ThDP comme cofacteur essentiel dans le mécanisme catalytique de réactions telles que la coupure ou la formation de liaisons carbone-soufre, carbone-oxygène, carbone-azote et surtout carbone-carbone.

La molécule de ThDP est constituée de trois éléments structuraux : le cycle 2-méthyl-4-aminopyrimidine (Pyr), le cycle 4-méthyl-thiazolium (MT) et un groupement pyriphosphate (PP) (Figure 3).

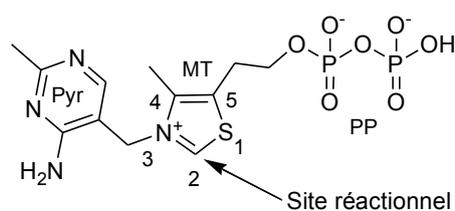


Figure 3 : Thiamine diphosphate (ThDP)

Le rôle catalytique du ThDP est décrit dans de nombreuses revues.[6-9] Toutes les réactions catalysées par les enzymes ThDP-dépendantes ont en commun une première étape qui consiste en l'arrachement du proton C-2 du cycle thiazolium pour conduire à la formation d'un carbanion. Lors de ces réactions, un motif comportant un groupement carbonyle est transféré depuis un substrat appelé « donneur » vers un substrat appelé « accepteur ». La séquence réactionnelle suivante a lieu : 1) une attaque nucléophile du carbanion du ThDP sur le groupement carbonyle du substrat donneur, 2) formation d'un intermédiaire « activé » 3) transfert vers les différents accepteurs (Figure 4).[10]

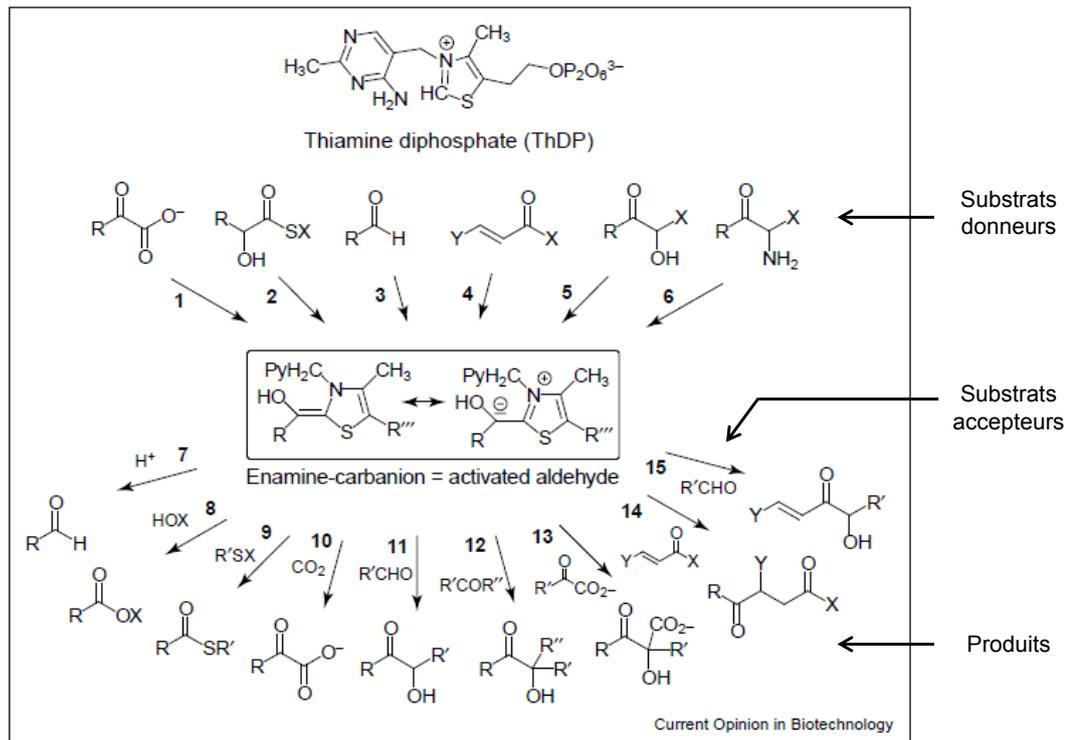


Figure 4 : Réactions catalysées par les enzymes ThDP dépendantes
Schéma extrait de la littérature [10]

Malgré le large éventail de réactions catalysées par les différentes enzymes à ThDP, une remarquable similarité au niveau de leur structure tridimensionnelle est observée. Ces enzymes ont en commun deux domaines protéiques semblables, le domaine pyrimidine (Pyr) et le domaine pyrophosphate (PP). Afin d'établir une comparaison exhaustive des séquences protéiques et des structures des enzymes ThDP-dépendantes, une base de donnée a été établie par l'équipe du Pr. J. Pleiss (Allemagne) : la « Thiamine diphosphate-dependent Enzyme Engineering Database » (TEED). Ainsi, les enzymes ThDP-dépendantes ont pu être classées en 8 superfamilles selon l'arrangement structural de leurs domaines.[11]

Les enzymes ThDP-dépendantes sont tout particulièrement appréciées pour leur potentiel synthétique, notamment pour les réactions de carboligation asymétrique, de par leurs gammes de substrats et leurs différentes stéréospécificités.[12, 13] Parmi ces enzymes, l'une d'entre elle est particulièrement utilisée pour la synthèse de polyols chiraux par formation stéréospécifique d'une liaison C-C : la transcétolase.

phosphate (D-F6P, cétose à 6 carbones). La réaction est stéréospécifique : le carbone asymétrique formé est toujours de configuration S. Deux cofacteurs sont essentiels : le ThDP et un cation divalent, Ca^{2+} ou Mg^{2+} .

2.1.2. Rôle de la TK chez les micro-organismes et les organismes supérieurs

La TK est une enzyme présente chez tous les organismes qui utilisent la voie des pentoses phosphates. Elle appartient au segment non oxydatif de cette voie métabolique (Figure 6) .[14]

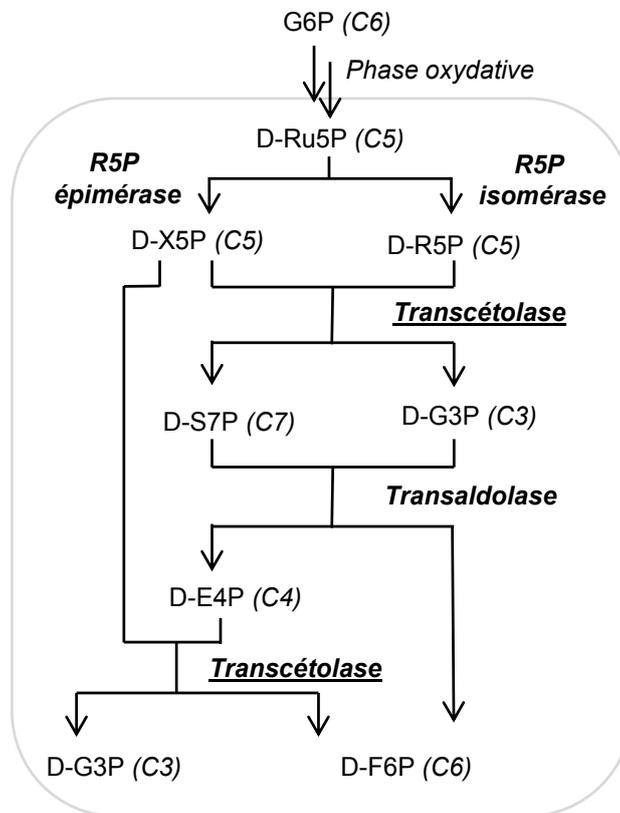


Figure 6 : Segment non-oxydatif de la voie des pentoses phosphate

La voie des pentoses phosphates commence par une phase oxydative durant laquelle le glucose 6-phosphate (D-G6P) est transformé en D-ribulose-5-phosphate (D-Ru5P). Elle est suivie par une phase non-oxydative, débutant par une isomérisation et une épimérisation du D-Ru5P. Le segment non oxydatif se poursuit par une série de trois réactions conduisant au D-glycéraldéhyde 3-phosphate (D-G3P) et au D-F6P, intermédiaires de la glycolyse. La

première et la troisième réaction sont catalysées par la TK et la deuxième par une transaldolase.

Les monosaccharides phosphorylés intervenant dans cette voie permettent la synthèse de biomolécules essentielles :

- le D-R5P, utilisé pour la synthèse des nucléotides ainsi que de l'histidine
- le D-E4P, précurseur d'acides aminés aromatiques : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane
- le D-F6P et le D-S7P, intermédiaires de la glycolyse
- le D-G3P, précurseur de l'acétyl coenzyme A, impliqué dans le cycle de Krebs.

L'importance de la TK dans ces réactions est telle qu'une déficience de l'activité de cette enzyme chez l'Homme engendre l'apparition de pathologies sérieuses, comme des maladies neurologiques,[15, 16] le diabète[17] et certains cancers.[18]

2.1.3. Rôle de la TK chez les végétaux

Chez les végétaux, la TK intervient dans le cycle de Calvin.[19] Le cycle de Calvin est composé d'une série de réactions biochimiques ayant lieu dans les chloroplastes des organismes photosynthétiques. Durant la photosynthèse, l'énergie fournie par la lumière est convertie en énergie chimique (adénosine triphosphate, ATP et nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, NADPH). Le cycle de Calvin, indépendant de la lumière, utilise l'énergie de ces transporteurs pour transformer le dioxyde de carbone (CO_2) en composés organiques qui peuvent être utilisés par l'organisme.

Cette séquence de réactions débute par une étape catalysée par la D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxydase (RubisCO). Cette réaction permet l'assimilation du CO_2 en présence du D-ribulose-1,5-bisphosphate (D-Ru5P) dont le précurseur est le D-R5P qui est régénéré par la TK et une aldolase (Figure 7). Il est à noter que dans les cellules photosynthétiques 75 à 90% de la TK est associée aux chloroplastes.

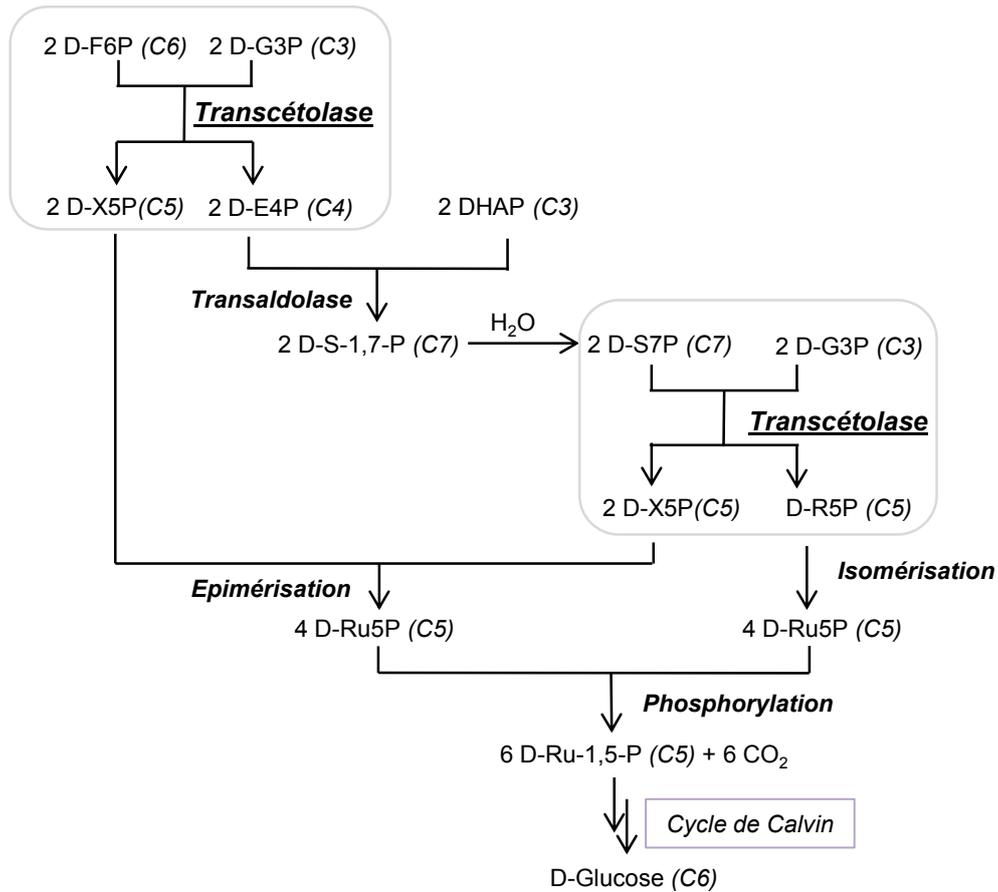


Figure 7 : Rôle de la TK dans la régénération du D-ribulose-5-phosphate impliqué dans le cycle de Calvin

2.2. Identification et production des TK

Des TK ont été identifiées dans de très nombreux organismes et les gènes correspondants ont été séquencés. Les TK présentent une forte homologie au niveau des séquences protéiques, bien que provenant d'organismes variés tels que des levures (ex. : *Saccharomyces cerevisiae*), des bactéries (ex. : *Escherichia coli*, *Leishmania mexicana*, *Bacillus anthracis*), des plantes (ex. : maïs, épinard, pomme de terre), mais aussi des organismes supérieurs (ex. : Homme, rat, souris). En effet, l'alignement de 22 séquences protéiques de TK issues de différents organismes a permis de mettre en évidence 50 résidus absolument invariants, auxquels s'ajoutent 24 résidus qui diffèrent seulement entre les mammifères et les autres organismes.[20] Certains de ces résidus sont impliqués dans la structure du site actif et dans le mécanisme catalytique de l'enzyme et seront décrits par la suite.

Historiquement, les sources employées furent tout d'abord celles de feuilles d'épinard.[14, 21] Puis, afin d'obtenir une plus grande quantité d'enzymes, des sources microbiennes ont été envisagées telles que *S. cerevisiae*[22] et *E. coli* dans les années 1990. [23, 24] Les TK de *S. cerevisiae* et d'*E. coli* ont été clonées, surexprimées et purifiées pour leur étude cristallographique ainsi que pour leur application en biocatalyse.

2.2.1. TK de *S. cerevisiae*

Deux gènes codant pour des enzymes ayant une activité TK, *tkl1* et *tkl2*, ont été identifiés chez *S. cerevisiae*. [25] Les deux enzymes correspondantes présentent 71 % d'homologie de séquence mais semblent jouer des rôles différents au sein de la cellule. En effet, le gène *tkl2* est peu exprimé et ne semble pas indispensable au métabolisme de *S. cerevisiae* [26] contrairement à la TK codée par le gène *tkl1*. Tous les travaux décrits dans la littérature concernent la TK codée par gène *tkl1*.

La TK de *S. cerevisiae* a été la première à avoir été clonée et surexprimée. Le Pr. G. Schneider (Suède) et ses collaborateurs ont isolé le plasmide pTKL1, contenant le gène *tkl1*, à partir d'une banque génomique de *S. cerevisiae* dans le vecteur pHR81.[25] Ce vecteur navette a la particularité de se répliquer dans *E. coli* et dans *S. cerevisiae*. Grâce à l'utilisation de ce vecteur, les auteurs obtiennent un taux de surexpression de la TK qui représente 15% de la quantité de protéines cellulaires.

Une méthode de purification de la TK surexprimée dans *S. cerevisiae* H402 (pTKL1) est décrite par l'équipe du Pr. G. Schneider.[27] Elle fait intervenir successivement une précipitation au sulfate d'ammonium, trois chromatographies d'exclusion moléculaire et une chromatographie sur résine anionique. Cette méthode permet d'obtenir la TK avec une activité spécifique de 37 U.mg⁻¹ avec un rendement de 32 %.

2.2.2. TK d'*E. coli*

Deux gènes *tktA* et *tktB* ont été identifiés chez *E. coli*. Les séquences protéiques des deux TK présentent 70% d'homologie et sont indispensables à la survie cellulaire. La TK codée par le gène *tktA* est l'enzyme la plus exprimée dans *E. coli* et aussi la plus étudiée.[28]

Le Pr. Woodley (Danemark) et ses collaborateurs ont décrit un protocole pour la production à grande échelle de la TK d'*E. coli*. Le gène *tktA* de la TK d'*E. coli* a été cloné dans un plasmide multicopie de type pBGS18 portant un gène de résistance à la kanamycine. Après transformation dans *E. coli*, des cultures à grande échelle ont été réalisées en réacteurs de 20 et 1000 litres. La lyse des bactéries par un homogénéisateur haute-pression a permis d'obtenir un extrait cellulaire clarifié avec une activité de 230 U.mL⁻¹ dans lequel la TK représente 40% de la quantité de protéines.[29]

La purification des protéines a été facilitée par le greffage d'une étiquette six histidines (His-Tag) en position N-terminale.[30] Cet oligopeptide présente une grande affinité pour le nickel et permet de purifier la TK par chromatographie d'affinité sur une résine Ni-NTA (nickel-acide nitriloacétique).[31]

2.3. Etudes cristallographiques des TK

2.3.1. Structures tridimensionnelles

Des TK issues de sources végétales, microbiennes et humaines ont été cristallisées et leur étude par diffraction des rayons X a permis de déterminer leurs structures tridimensionnelles. Vingt-six structures de TK sont à ce jour disponibles sur la Protein Data Bank, provenant de douze sources différentes et co-cristallisées avec le ThDP et analogues, et aussi avec différents substrats. Malgré la diversité des sources de TK étudiées, comme *S. cerevisiae* (1994), [32],[33] le maïs (2003),[34] *Leishmania mexicana* (2004),[35] *E. coli* (2007),[30] *Bacillus anthracis* (2009), ou encore l'Homme (2010),[36] toutes les TK présentent la même structure tridimensionnelle : un dimère constitué de deux sous-unités identiques et dont les sites actifs sont situés aux interfaces (Figure 8).

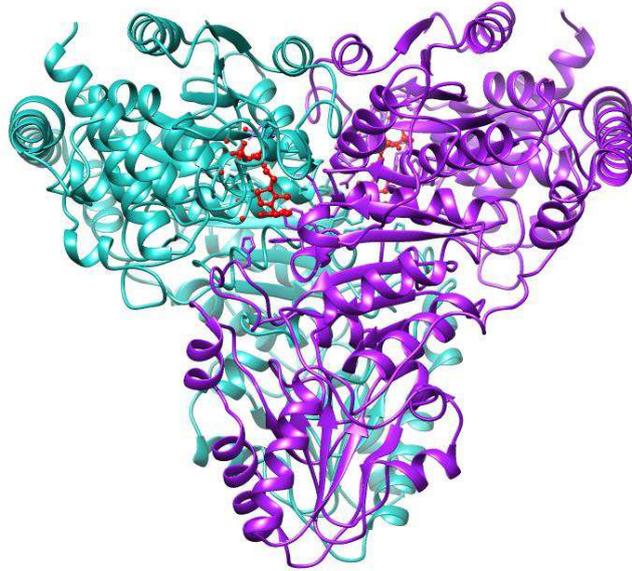


Figure 8 : Structure de la TK de *S. cerevisiae* avec ses cofacteurs (en rouge) (1TRK.pdb)

Chaque monomère comporte environ 680 acides aminés et les formes dimériques ont des poids moléculaires d'environ 74 kDa. Chaque monomère est caractérisé par 3 domaines distincts :

- le domaine N-terminal (domaine pyrophosphate, PP)
- le domaine intermédiaire (domaine pyrimidine, Pyr)
- le domaine C-terminal

Le domaine N-terminal et le domaine intermédiaire sont impliqués dans la stabilisation du dimère (Glu162 interagissant avec Glu418 et Glu167 de l'autre sous-unité dans la TK de *S. cerevisiae* [37]) et englobent également les deux sites actifs. Chaque monomère comporte un site actif qui est situé à l'interface entre les deux sous-unités et deux sites de fixation pour le ThDP et le cation divalent Mg^{2+} ou Ca^{2+} localisés à proximité du site actif. Aucune implication dans la catalyse enzymatique n'a été démontrée pour le domaine C-terminal.

2.3.2. Etudes du site actif de la TK

Depuis la détermination de sa structure cristallographique en 1994, la TK de *S. cerevisiae* est la TK dont la structure et le mécanisme ont été les plus largement étudiés jusqu'à ce jour, notamment par les groupes respectifs du Pr. G. Schneider (Suède) et du Pr. G. Kochetov (Russie). Une étude plus récente de la structure cristallographique de la TK d'*E. coli*, [30] montre une forte homologie avec la TK de *S. cerevisiae*.

Les résidus du site actif ont été identifiés et leur rôle dans la catalyse et la reconnaissance des substrats ont été déterminés par des études cristallographiques couplées à des expériences de mutagenèse dirigée.

2.3.2.1. Interactions avec les cofacteurs

Les cofacteurs ThDP et Ca^{2+} sont liés à l'interface des deux sous-unités de l'enzyme (Figure 9). Le ThDP est situé dans une cavité profonde au niveau de cette interface. Son groupement diphosphate interagit avec le cation Ca^{2+} , 3 molécules d'eau et les résidus His69, His263 et Gly158. Le cycle thiazolium du ThDP, quant à lui, forme des liaisons de type Van Der Waals avec certains résidus du site actif : le résidu Asp382 intervient dans la stabilisation de la charge du cycle thiazolium et est indispensable à la liaison du ThDP à l'enzyme. Le cycle 4-aminopyrimidine est stabilisé dans la zone hydrophobe par les résidus Phe445 et Tyr448.

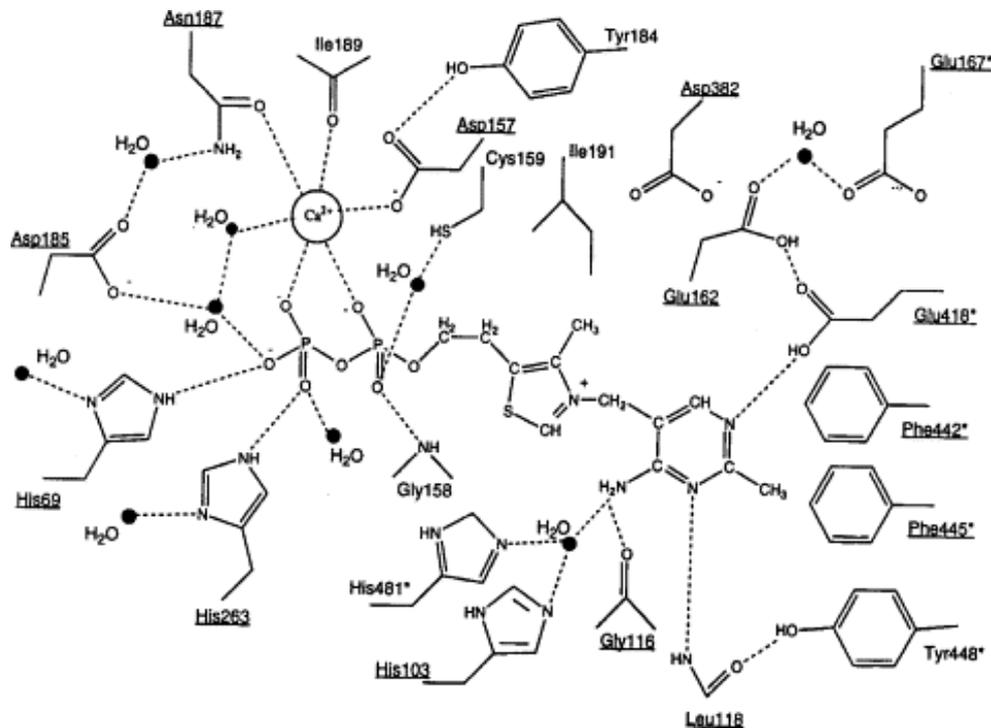


Figure 9 : Interactions entre les cofacteurs et les résidus du site actif de la TK
Schéma extrait de la littérature.[38] Les résidus conservés sont soulignés et les résidus appartenant à l'autre monomère sont désignés par un astérisque

De plus, il a été montré que le ThDP confère une meilleure stabilité à l'enzyme, notamment du fait de l'interaction entre son cycle thiazolium et les deux feuillets β de l'enzyme présents

respectivement sur chacun des monomères. L'enzyme adopte alors une conformation plus compacte.[39] Les données cristallographiques montrent que le cation divalent Ca^{2+} interagit avec les acides aminés Asp157, Asp185, Asn187 et Ile189 du site actif et avec le groupement diphosphate du ThDP. Sa présence est essentielle pour que le ThDP se lie à l'apoenzyme.

2.3.2.2. Interactions avec les substrats physiologiques

L'étude du site actif de la TK en présence de ses substrats physiologiques a fait l'objet de nombreux travaux. La TK de *S. cerevisiae* a en effet été co-cristallisée avec un de ses substrats accepteurs, le D-E4P tandis que la TK d'*E. coli* a été co-cristallisée avec ses substrats donneurs respectivement le D-X5P et le D-F6P. L'étroitesse de la cavité du site actif formée par les sous-unités de l'enzymes et le ThDP implique que les deux substrats (donneur et accepteur) ne peuvent se fixer simultanément dans le site actif mais plutôt l'un après l'autre, en utilisant les mêmes sites de fixation.[40]

Interactions avec le substrat accepteur le D-E4P

Les études cristallographiques couplées à des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de proposer un modèle des interactions entre les résidus du site actif de la TK de *S. cerevisiae* et le D-E4P (Figure 10).[41]

Quatre résidus Arg359, Ser386, His469 et Arg528 prennent en charge le groupement phosphate de l'accepteur et permettent d'introduire ce dernier dans la cavité du site actif. Si la TK possède la remarquable capacité d'accepter des aldéhydes de taille variable (de 3 à 7 carbones), c'est grâce à la flexibilité apportée par ces quatre résidus qui interagissent avec les substrats par des liaisons de faible énergie (liaisons hydrogènes et une liaison électrostatique). Les deux arginines stabilisent les groupements phosphates des substrats ayant une chaîne carbonée supérieure ou égale à 4 carbones tandis que l'histidine et la sérine stabilisent les groupements phosphates des substrats à 3 ou 4 carbones. Une fois le substrat accepteur stabilisé dans le site actif, son groupement carbonyle est alors pris en charge par les deux histidines His30 et His263 du site actif avec qui il établit des liaisons hydrogène.

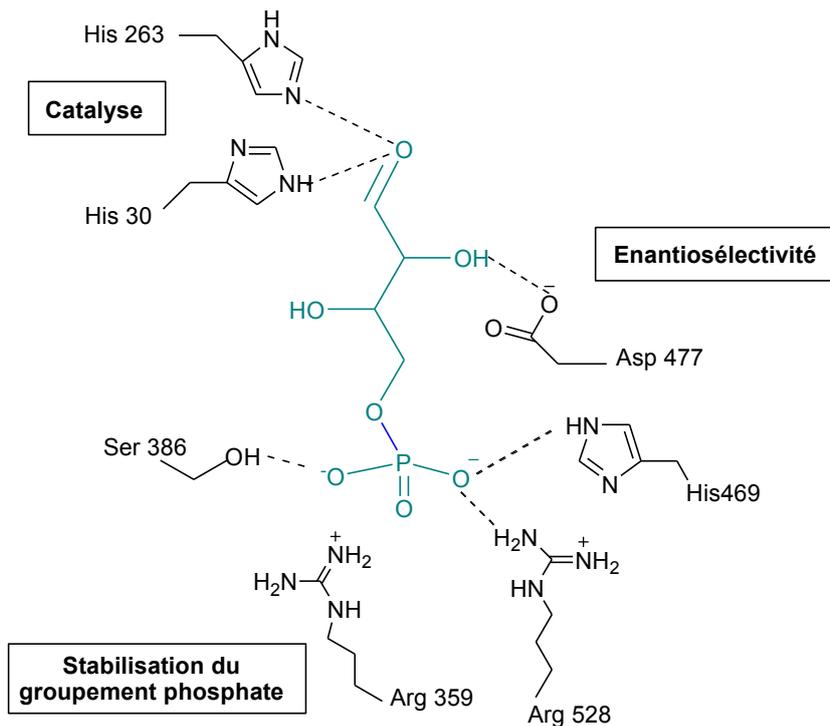


Figure 10 : Mise en évidence des acides aminés du site actif de la TK de *S. cerevisiae* impliqués dans la fixation du substrat accepteur (E4P) et dans la catalyse

Par ailleurs, il est à souligner l'interaction du groupement carboxylate de l'Asp477 avec le groupement hydroxyle en α du carbonyle de l'accepteur. Cette interaction a un rôle crucial dans le contrôle de l'énantiosélectivité de la réaction catalysée par la TK. En effet, l'étude de la spécificité vis-à-vis du substrat accepteur, a montré que la réaction catalysée par la TK est énantiomérique vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés de configuration *R*. Le rôle majeur de l'Asp477 a été confirmé par des expériences de mutagenèse dirigée et par des études cinétiques en présence d'analogues du D-E4P que l'équipe du Pr. G. Schneider a mené en collaboration avec celle du Pr L. Hecquet.[42]

Interactions avec les substrats donneurs

La TK de *E. coli* a été co-cristallisée en 2007 en présence de différents substrats physiologiques [30] : les deux cétooses donneurs, le D-X5P et le D-F6P, et un aldose accepteur naturel, le D-R5P. Cette étude montre des interactions semblables à celles envisagées ou modélisées à partir de la TK de *S. cerevisiae*. La Figure 11 indique les interactions avec le D-X5P, substrat donneur.

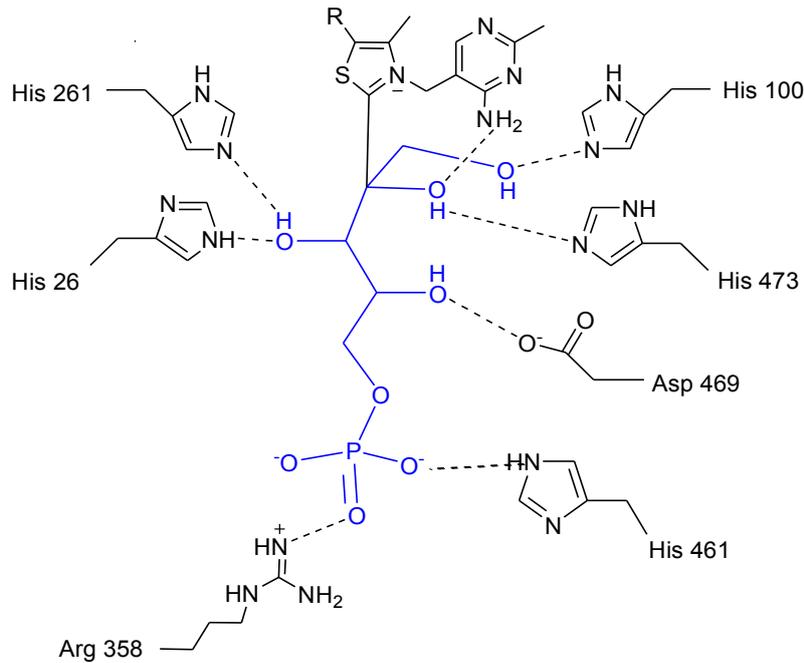


Figure 11 : Mise en évidence des résidus du site actif de la TK d'*E. coli* impliqués dans la fixation du substrat donneur (D-R5P lié au ThDP) et dans la catalyse

Les groupements hydroxyles des carbones 1 et 2 interagissent respectivement avec les résidus His473 et His100 et l'amine du cycle pyrimidine du ThDP. Les résidus His261 et His26 interviennent dans le contrôle de la stéréospécificité par interaction avec l'hydroxyle du carbone 3 alors que le résidu Asp469 (correspondant à l'Asp477 chez la *S. cerevisiae*) est impliqué dans le contrôle de l'énantiosélectivité. Le groupement phosphate du carbone 5 présente des interactions avec les résidus His461 et Arg358. La seule différence notable avec le mode de fixation du D-F6P, substrat donneur présentant un carbone de plus par rapport au D-X5P, est l'interaction de la Ser385 avec l'hydroxyle du carbone 5 du D-F6P.

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

La superposition des structures cristallines de la TK de *S. cerevisiae* (1TRK.pdb) et d'*E. coli* (2R8O.pdb) montre que ces trois TK microbiennes présentent un site actif très similaire, dont les résidus sont hautement conservés (Figure 12).

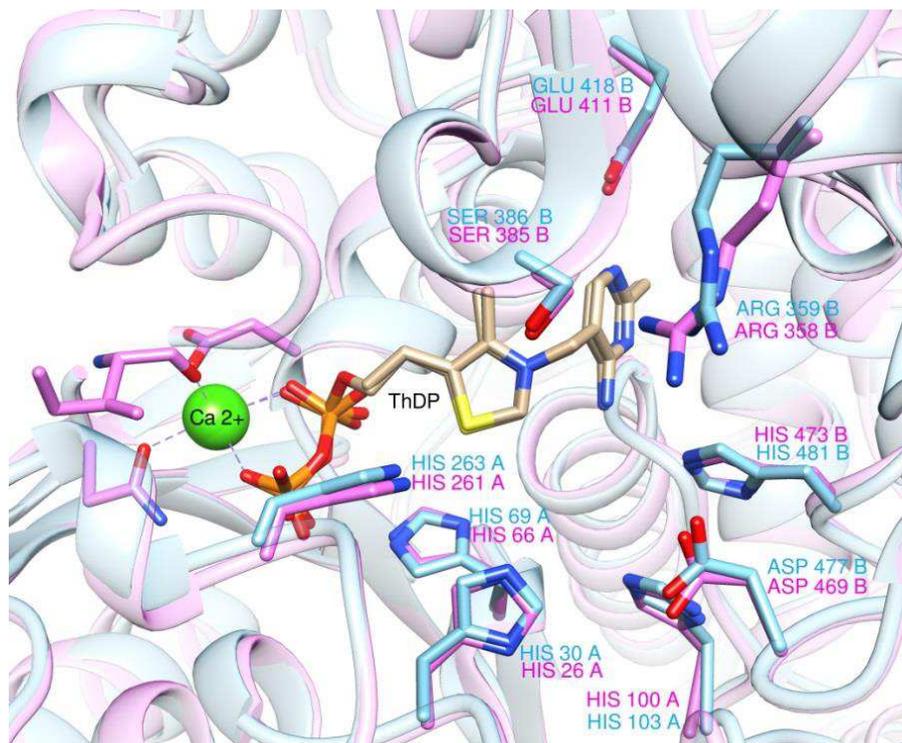


Figure 12 : Superposition des sites actifs de TK d'*E. coli* (rose) et TK de *S. cerevisiae* (bleu) et en présence des cofacteurs ThDP (marron) et Ca^{2+}

Dans les sites actifs d'*E. coli* et *S. cerevisiae*, les mêmes acides aminés jouent un rôle clé dans la catalyse, le contrôle de l'énantiosélectivité et la stabilisation du groupement phosphate (Tableau 1).

Rôle du résidu	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>
Catalyse	His30	His26
	His263	His261
Enantiosélectivité	Asp477	Asp469
Stabilisation du groupement phosphate du substrat	His469	His461
	Arg359	Arg358
	Ser386	Ser385

Tableau 1 : Résidus intervenant dans le site actif de la TK de *S.cerevisiae* et de *E. coli*

2.4. Mécanisme de la Transcétolase

Le mécanisme de la réaction catalysée par la TK en présence du cofacteur ThDP a été élucidé tout d'abord pour la TK de *S. cerevisiae*, [30, 32, 33, 41, 43-45] puis des études réalisées avec la TK d'*E. coli* ont montré que les mêmes résidus sont impliqués, seules les positions changent.

La réaction catalytique débute par la déprotonation du ThDP (**a**) au niveau du C2 du cycle thiazolium, ce qui conduit à la formation d'un carbanion, forme activée du ThDP. Dans cette étape, le résidu Glu418 protone l'atome d'azote N1' du cycle pyrimidine conduisant à la formation du groupe iminium chargé positivement (**b**). Le C2 du cycle thiazole est alors déprotoné par l'His481 pour donner un carbanion au niveau du C2 du cycle thiazolium du ThDP. Bien que la conformation en V du ThDP ne soit pas favorisée thermodynamiquement, elle permet la stabilisation du carbanion du C2 du cycle thiazolium (**c**) par le groupement iminium du cycle pyrimidine (Figure 13).

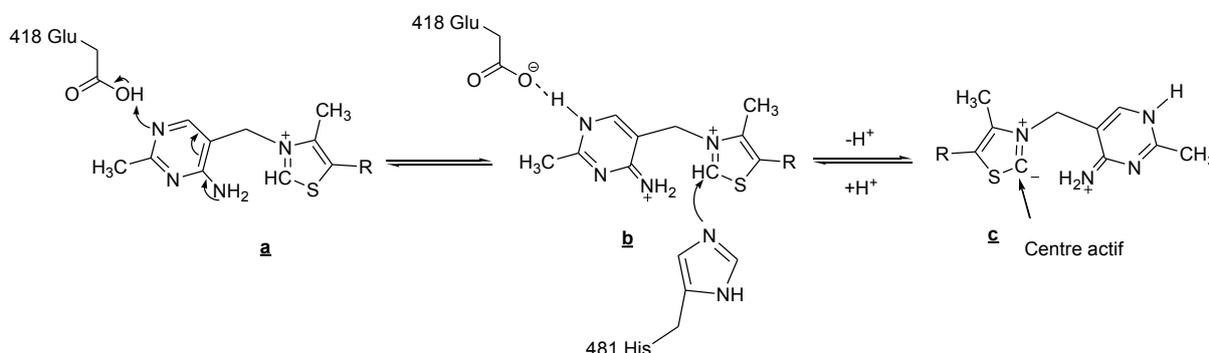


Figure 13 : Mécanisme d'activation du ThDP

Puis le carbanion (**c**) attaque le groupe carbonyle du substrat donneur (ex. : D-X5P) pour former la liaison C2-C α . Le groupement carbonyle du cétose phosphate peut être protoné soit par le groupe iminium chargé positivement du cycle pyrimidine ou bien par le résidu His481 [43] (cette dernière hypothèse est retenue dans le mécanisme décrit dans la Figure 14).

Ensuite, l'His263 est parfaitement positionnée pour arracher le proton du groupement hydroxyle du C3 du substrat donneur lié au ThDP (**d**) conduisant à la rupture de la liaison C2-C3 du donneur. Il en résulte la formation du complexe α,β -dihydroxyéthyl-ThDP (DHE-

ThDP) appelé « donneur cétoyl activé » dont la charge négative est stabilisée par effet mésomère (**e**). Le D-glycéraldéhyde-3-phosphate est alors libéré.

Lorsqu'un substrat accepteur entre dans le site actif (ex. : le D-ribose-5-P) le C2 de DHE-ThDP attaque alors la face *ré* de la fonction aldéhyde du substrat accepteur, l'oxygène étant protoné par l'His263. Le nouveau carbone asymétrique formé est alors de configuration S (**f**). La rupture de la liaison qui lie le C2 du cycle thiazolium via la déprotonation du groupement hydroxyle conduit à la libération du produit final (ex. Sedoheptulose-7-P) de configuration (3*S*,4*R*) et du ThDP. Le produit final étant de type cétose, il peut alors devenir lui-même substrat donneur et rendre la réaction réversible.

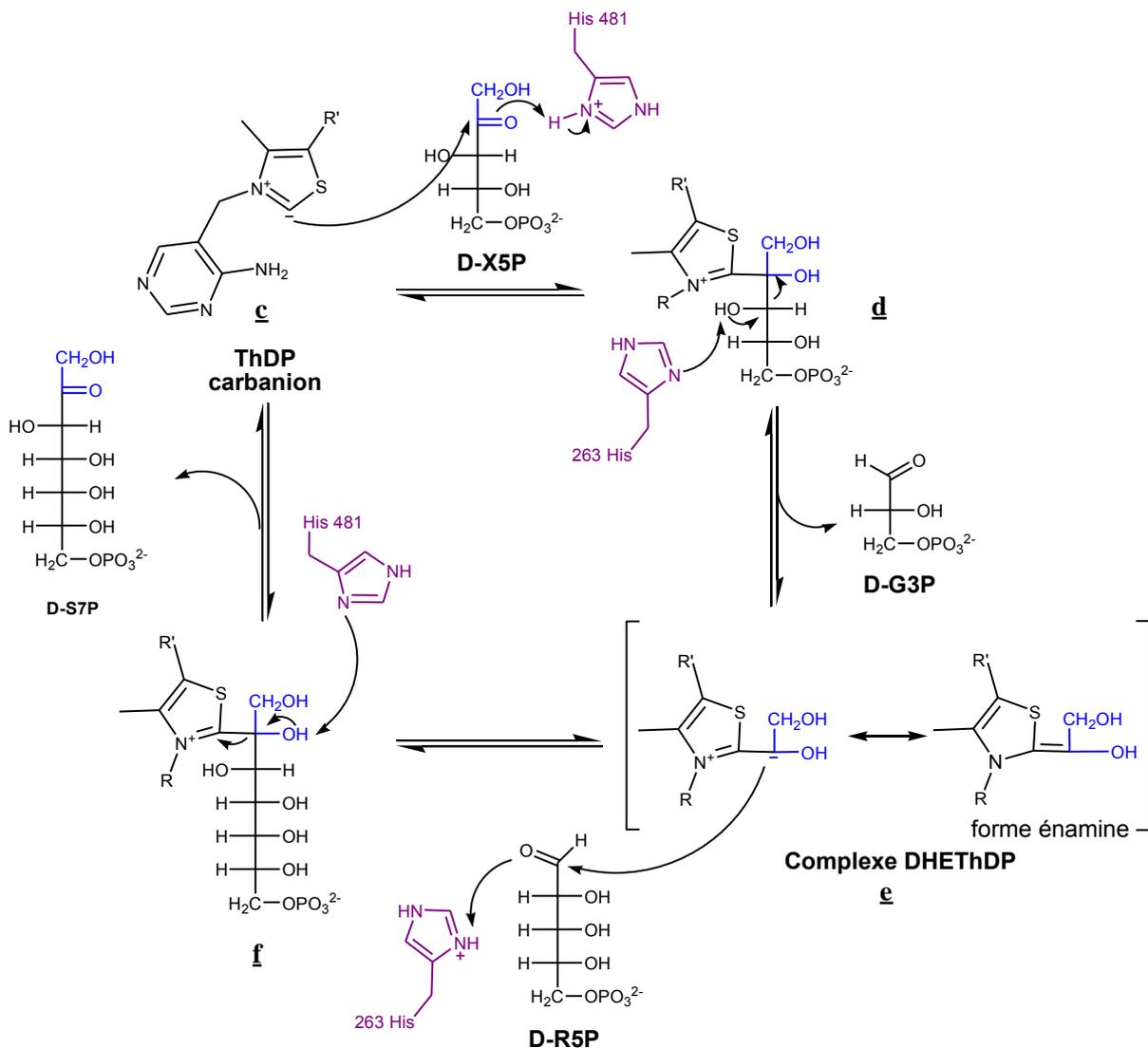


Figure 14 : Mécanisme du transfert du motif « cétoyl » catalysé par la TK

2.5. Potentiel synthétique de la TK

L'utilisation de la TK comme biocatalyseur dans des réactions de synthèse peut permettre l'obtention de cétooses et analogues, à condition que le spectre de substrats soit plus étendu que celui de ses substrats physiologiques. Dans cette optique, la spécificité de substrat des TK provenant de microorganismes a été étudiée et de nombreux substrats physiologiques et non-physiologiques des TK de micro-organismes ont été rapportés.

2.5.1. Spécificité de substrat de la TK

2.5.1.1. Substrats donneurs

La réaction catalysée *in vivo* par la TK est une réaction réversible. Il a été démontré *in vitro* que l'acide β -hydroxypyruvique (HPA) était accepté par la TK en tant que substrat donneur de groupement « céto », sa décarboxylation au cours de la réaction rendant celle-ci irréversible (Figure 15).[46] Cette découverte a permis d'exploiter le potentiel synthétique de la TK pour la synthèse de cétooses et analogues.

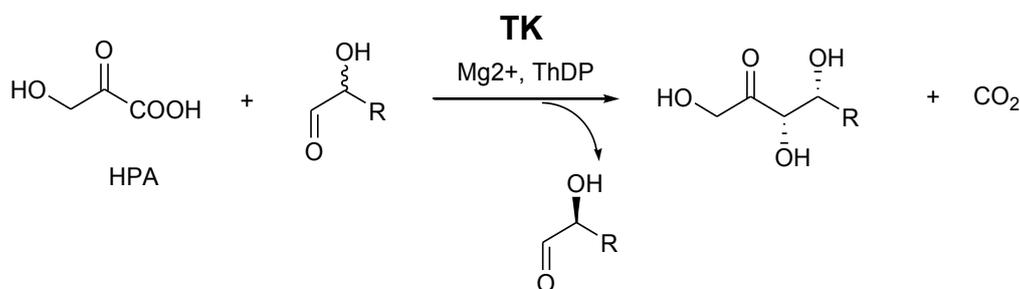


Figure 15 : Réaction catalysée par la TK en présence de HPA

Il est à noter que le HPA est facile à préparer soit par voie chimique sous forme de sel de lithium (Li-HPA) en une étape à partir du bromopyruvate,[47, 48] soit par voie enzymatique *in situ* à partir de sérine en présence de D-aminoacide oxydase commerciale (EC. 1.4.3.3) [21] ou encore de la glyoxylate aminotransferase de feuilles d'épinard (SGAT, EC 2.6.1.45) [49] (Figure 16).

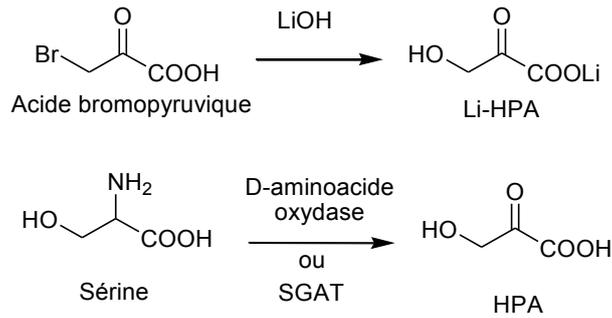


Figure 16 : Voies de synthèse du HPA

D'autres substrats donneurs ont été envisagés, dont notamment le L-érythrose. Il est possible de rendre la réaction irréversible à partir de ce substrat, en présence d'une enzyme auxiliaire, l'alcool déshydrogénase (ADH, EC 1.1.1.1) et de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) qui réduit le glycolaldéhyde formé au cours de la réaction (Figure 17). Cette réaction est utilisée pour déterminer l'activité de la TK (le D-X5P, substrat donneur physiologique utilisé auparavant, n'étant plus commercial).

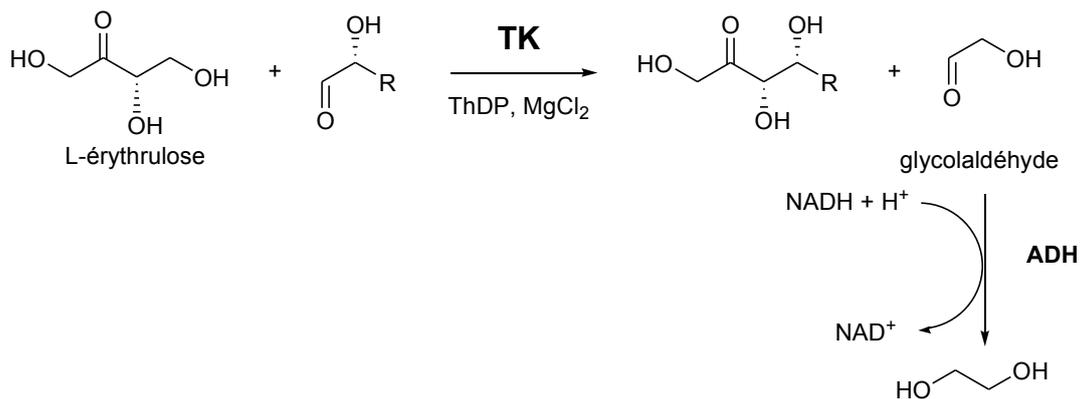


Figure 17 : Réaction catalysée par la TK en présence de L-érythrose

Plus récemment des études analytiques ont montré que des analogues halogénés du pyruvate sont des substrats donneurs de la TK de *S. cerevisiae* (Figure 18).[50] Cependant ces composés n'ont pas été utilisés en présence de substrats accepteurs à des fins synthétiques pour accéder aux analogues de cétooses correspondants.

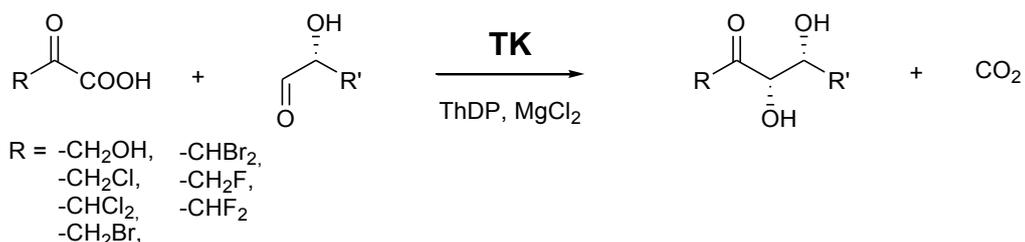


Figure 18 : Réaction catalysée par la TK en présence d'analogues du pyruvate

Les paramètres cinétiques (la constante de Michaelis-Menten, notée K_M et la vitesse maximale notée V_{max}) des principaux substrats donneurs physiologiques ou non ont été mesurés (Tableau 2).[51, 52] Bien que le HPA ait un K_M supérieur à celui des substrats physiologiques, c'est le donneur le plus couramment utilisé en synthèse car, comme indiqué précédemment, il rend la réaction irréversible.

	TK <i>S. cerevisiae</i>			TK <i>E. coli</i>		
	K_M [mM]	V_{max} [U.mg ⁻¹]	V_{max}/K_M [U.mg ⁻¹ .mM ⁻¹]	K_M [mM]	V_{max} [U.mg ⁻¹]	V_{max}/K_M [U.mg ⁻¹ .mM ⁻¹]
D-X5P	0,21	20	95,2	0,16	> 110	> 687
D-F6P	1,8	-	-	1,1	62	56
D-S7P	-	-	-	4	6	1,5
Hydroxypyruvate	7-33	-	-	18	60	3,3
L-érythrose	4,9	2,6	20	-	-	-

Tableau 2 : Paramètres cinétiques de quelques substrats donneurs pour différentes sources de TK [51, 52]

2.5.1.2. Substrats accepteurs

Les meilleurs substrats accepteurs de la TK dérivent des substrats physiologiques c'est-à-dire des substrats polyhydroxylés et phosphorylés. Toutefois, une large variété d'aldéhydes non-phosphorylés a été décrite comme accepteurs des TK d'*E. coli*, de *S. cerevisiae* et d'épinard, en utilisant le HPA comme donneur.[52, 53] Le meilleur substrat non phosphorylé pour la TK est le glycolaldéhyde. Le Tableau 3 montre les activités relatives de quelques aldéhydes par rapport au glycolaldéhyde pour la TK de *S. cerevisiae*.

Les aldéhydes α -hydroxyaldéhydes de configuration (2R) sont très préférentiellement acceptés par rapport aux aldéhydes (2S) conduisant ainsi à des cétooses de configuration D-*thréo*. Notamment, la haute énantiosélectivité de la TK d'*E. coli* en faveur des α -hydroxyaldéhydes de configuration (2R) a été mise en évidence par Morris *et al.* qui ont montré qu'en présence de cette TK, aucune réaction ne se produit dans le cas du L-glycéraldéhyde alors que le D-glycéraldéhyde réagit presque aussi bien que le glycolaldéhyde.[48] Cette propriété a aussi été exploitée pour dédoubler des mélanges racémiques d' α -hydroxyaldéhydes afin d'obtenir des S- α -hydroxyaldéhydes.[54]

Les aldéhydes non-alpha hydroxylés sont également transformés par la TK mais avec une moindre activité comparée à celle des aldéhydes hydroxylés. Les aldéhydes non hydroxylés en position β n'engendrent qu'une faible perte d'activité. Enfin, la TK accepte aussi des composés aldéhydiques présentant un hétérocyclique qui semble augmenter l'activité par rapport au benzaldéhyde (Tableau 3).

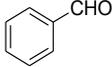
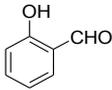
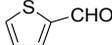
Substrats accepteurs		Vitesse relative [%]
Substrat de référence	Glycolaldéhyde : CH ₂ OH-CHO	100
Accepteurs « naturels » non phosphorylés	D-érythrose	84
	D-ribose	30
Composés polyhydroxylés	D-Glycéraldéhyde CH ₂ OH-CHOH-CHO (R)	77
	L-Glycéraldéhyde CH ₂ OH-CHOH-CHO(S)	<1
Composés non hydroxylés en α	CH ₃ -CHOH-CH ₂ -CHO (R, S)	29
	CH ₂ OH-CHOH-CH ₂ -CHO (R, S)	43
	CH ₂ OH-CHOH-CH ₂ -CHO (R)	45
Composés hydroxylés en α et non hydroxylés en β	CH ₃ SCH ₂ -CHOH-CHO (R, S)	33
	CH ₃ -CHOH-CHO (R, S)	44
	CH ₂ F-CHOH-CHO (R, S)	47
	CH ₃ -CH ₂ -CHOH-CHO (R, S)	33
	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -CHOH-CHO (R, S)	22
	(CH ₃) ₃ C-CHOH-CHO (R, S)	11
	CH ₂ OH-CH ₂ -CHOH-CHO (R, S)	< 10
Composés non hydroxylés	CH ₃ -CHO	25
	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -CHO	11
Composés éthyléniques	(CH ₃) ₂ -C=CH-CHO	11
	CH ₂ =CH-CHOH-CHO (R, S)	56
	CH ₂ =CH-CH ₂ -CHOH-CHO (R, S)	28
	CH ₂ =CH-(CHOH) ₂ -CHO (2R, 3S)	36
	CH ₂ =CH-(CHOH) ₂ -CHO (2R, 3R)	32
Composés aromatiques		< 10
		28
Composé hétérocyclique		32

Tableau 3 : Comparaison de quelques aldéhydes substrats de la TK de *S. cerevisiae*

Les paramètres cinétiques K_M (constante de Michaelis) et V_{max} (vitesse maximale) des TK d'*E. coli* et de *S. cerevisiae* en présence de quelques substrats accepteurs physiologiques ou non ont été mesurés (Tableau 4).[24]

	TK de <i>S. cerevisiae</i>		TK d' <i>E. coli</i>	
	K_M [mM]	K_M [mM]	V_{max} [U.mg ⁻¹]	V_{max}/K_M [U.mg ⁻¹ .mM ⁻¹]
D-R5P	0,4	1,4	50,4	36
D-E4P	ND	0,09	>110	>1222
D-G3P	4,9	2,1	100	48
Glycolaldéhyde	21	14	60	7,7
D-glycéraldéhyde	40	48	-	-
D,L-glycéraldéhyde	-	10	25	2,5
D-érythrose	214	150	75	0,5

Tableau 4 : Paramètres cinétiques de quelques substrats accepteurs des TK de *S. cerevisiae* et d'*E. coli* [24]

2.5.2. Applications de la TK en synthèse

Les TK de feuilles d'épinard, de *S. cerevisiae* ou d'*E. coli* ont été employées comme biocatalyseurs pour la synthèse de nombreuses molécules à intérêt biologique à partir de HPA comme substrat donneur et de divers aldéhydes accepteurs phosphorylés ou non (Figure 19).[55]

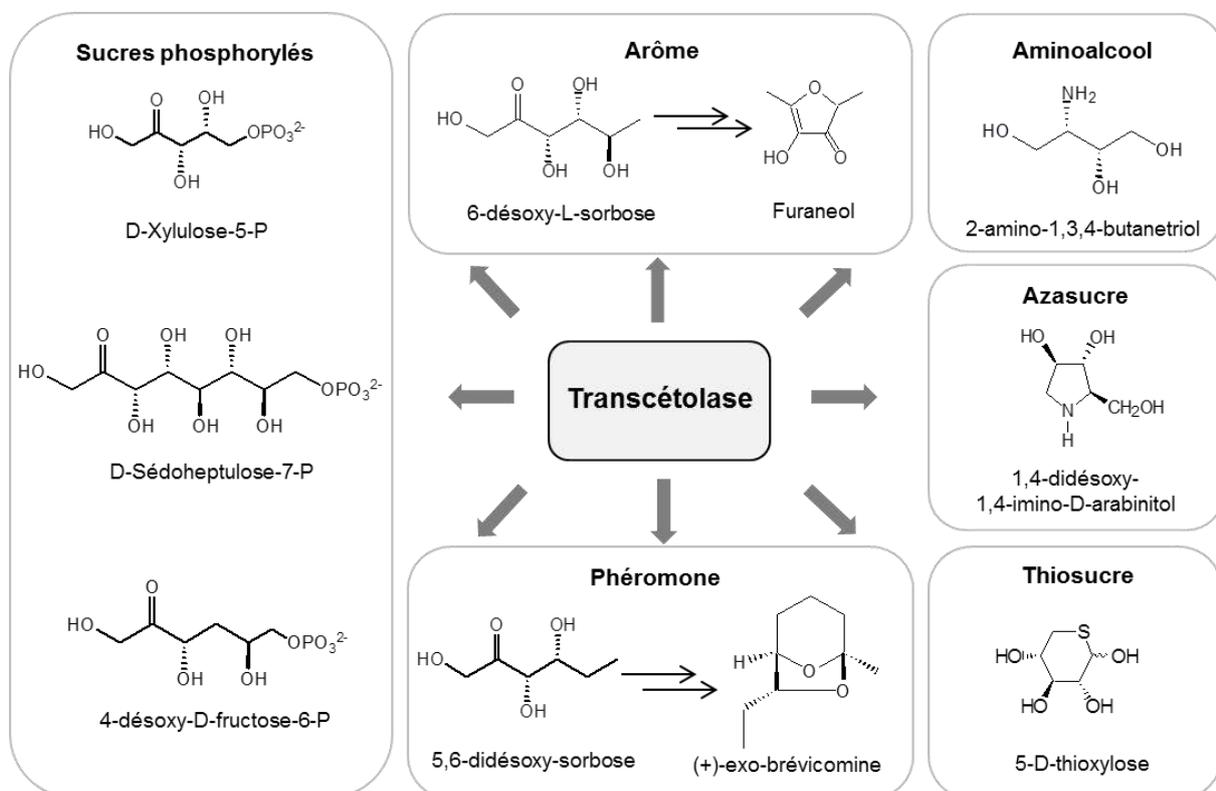


Figure 19 : Exemples d'applications de la TK en synthèse

Le groupe du Pr. G. Whitesides (Etats-Unis) a été le premier à s'intéresser au potentiel synthétique de la TK en 1991, avec la synthèse de la (+)-*exo*-brévicomine, phéromone sécrétée par le scarabée. Ce composé est préparé en sept étapes à partir du 2-hydroxybutanal qui est utilisé comme substrat accepteur de la TK de *S. cerevisiae* en présence d'HPA. Le cétose obtenu, précurseur de la brévicomine, est synthétisé avec un rendement de 45 % (Figure 20).[56]

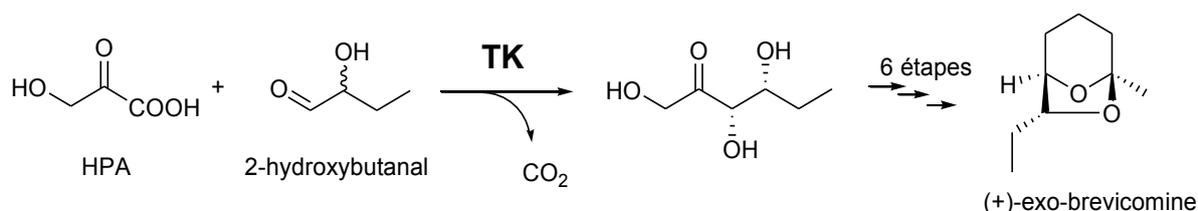


Figure 20 : Synthèse chimioenzymatique de la (+)-*exo*-brévicomine

A la même période, l'équipe biocatalyse du SEESIB a également commencé à orienter ses recherches vers l'utilisation de la TK en synthèse. La TK issue de feuilles d'épinard a tout d'abord été utilisée, notamment pour la production du 6-désoxy-L-sorbose, précurseur d'un arôme alimentaire ayant la saveur du caramel, le furanéol (Figure 21).[49] Dans cette synthèse, le HPA est formé *in situ* à partir de la L-sérine et le couplage avec le 4-désoxy-L-thréose en présence de TK conduit à l'intermédiaire désiré avec un rendement de 35%.

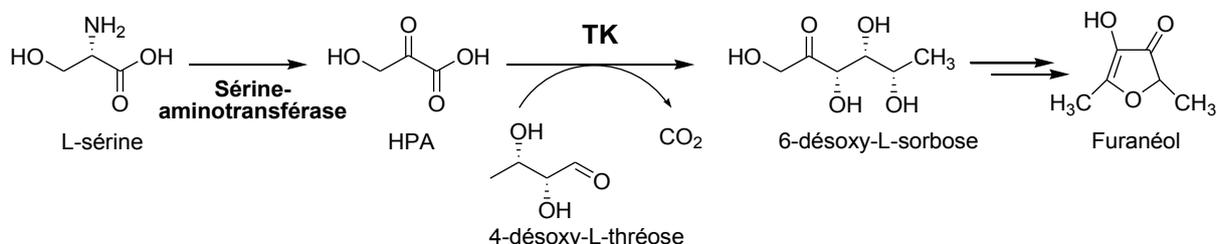


Figure 21 : Synthèse du 6-désoxy-L-sorbose

Par la suite, le laboratoire a exploité la TK de *S. cerevisiae*, notamment pour la préparation d'azasucres comme la fagomine, inhibiteur de glycosidase[57], de thiosucres utilisés comme synthons pour la préparation de composés à visée antithrombotique[58] et de sucres phosphorylés tels que le D-sédoheptulose-7-phosphate, substrat requis pour des études métaboliques ou comme précurseur d'antibiotiques [59] et le 4-désoxy-D-fructose-6-phosphate, inhibiteur d'enzymes telles que les aldolases.[60] La synthèse de ce dernier repose sur une stratégie multi-enzymatique. L'époxyde racémique de départ **a** est dédoublé par une époxide hydrolase d'*Aspergillus niger* (EC 3.3.2.9) et conduit à l'époxyde (S)-**b** (ee > 98 %). Ce dernier est ensuite converti en deux étapes en aldéhyde (2S)-**c** qui réagit alors

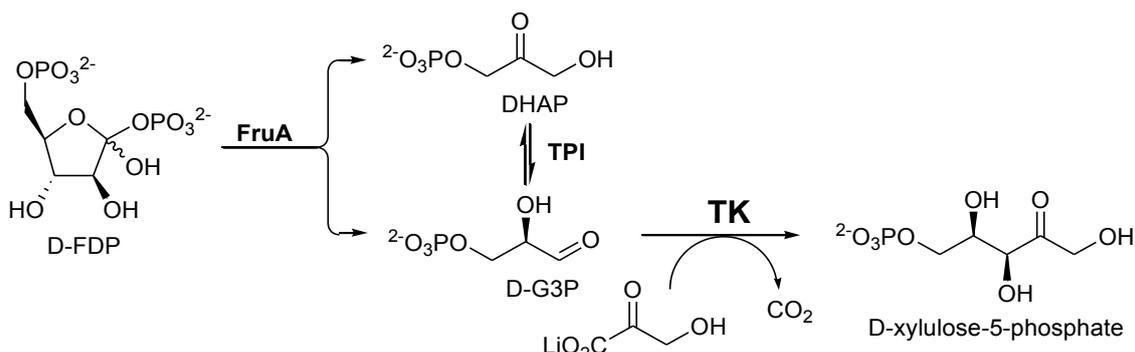


Figure 23 : Synthèse « one-pot » du D-xylulose-5-phosphate par voie enzymatique

Enfin plus récemment, les groupes des Dr. P. Dalby et Dr. H. Hailes (Royaume-Uni) ont utilisé la TK pour l'obtention d'aminoalcools. Le 2-amino-1,2,3-butanetriol est un composé utilisé comme précurseur de nombreuses molécules comme des statines, des inhibiteurs de protéases (comme le Nelfinavir, utilisé dans le traitement du SIDA) ou des agents détoxifiants. Une synthèse « one-pot » à partir de HPA et de glycolaldéhyde en présence de TK et d'une β -alanine pyruvate transaminase de *E. coli* a permis d'obtenir l'adduit correspondant sous forme énantiomériquement pure avec un rendement de 21% (Figure 24).

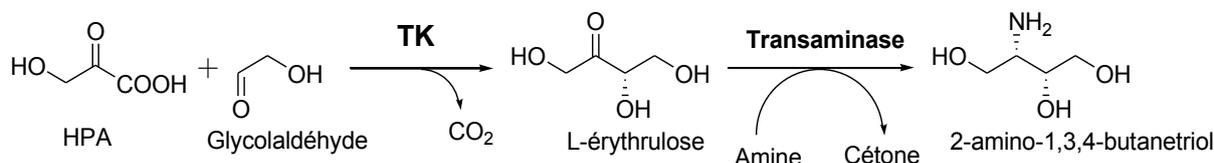


Figure 24 : Synthèse "one-pot" du 2-amino-1,3,4-butanetriol basée sur l'utilisation de la TK et d'une transaminase

2.6. Immobilisation de la TK

Compte-tenu de l'intérêt de cette enzyme en synthèse et de son utilisation potentielle à l'échelle industrielle, différents groupes se sont intéressés à son immobilisation afin d'assurer son recyclage et d'augmenter sa stabilité au cours du temps.

Différentes méthodes d'immobilisation ont été envisagées soit par liaison covalente sur un support organique de type Sépharose[65] soit par adsorption sur résine Eupergit,[66] sur résine Amberlite ou encore sur résine Nylon.[67]

Un autre procédé consiste à immobiliser la TK de *E. coli* présentant une étiquette 6 histidine *via* une résine chargée en Nickel chélaté par l'acide nitriloacétique (Ni-NTA) conduisant ainsi à une immobilisation réversible.[67] Cette stratégie a été exploitée pour le développement de réacteurs microfluidiques permettant la récupération *in situ* des produits de la réaction.[68]

Enfin, le groupe de Pr. L. Hecquet en collaboration avec l'équipe « Matériaux Inorganiques » de l'ICCF a proposé récemment un procédé encore non exploité pour cette enzyme qui consiste à adsorber la TK d'*E. coli* ou de *S. cerevisiae* sur un support inorganique de type argile (Hydroxydes Double Lamellaire).[69, 70] Ce procédé offre l'avantage d'être facile à mettre en œuvre, peu coûteux et permet de recycler l'enzyme au moins 6 fois sans aucune perte d'activité.

2.7. Conclusion

Les TK ont été abondamment utilisées comme biocatalyseurs pour la synthèse de cétooses et analogues, et ce en particulier grâce à la découverte du HPA comme donneur, rendant la réaction irréversible. Dans l'optique de développer l'utilisation de la TK pour l'obtention d'une plus grande variété de produits, de nouvelles TK présentant des propriétés différentes sont nécessaires. Dans ce but, deux stratégies peuvent être suivies : soit en recherchant de nouvelles TK au sein de la biodiversité, soit en façonnant artificiellement la TK sauvage en faisant appel aux techniques de génie génétique.

3. Amélioration et modification des propriétés des enzymes

3.1. Introduction sur l'évolution dirigée

Ces dernières années, les enzymes ont été de plus en plus utilisées pour leur pouvoir catalytique dans de nombreux domaines, notamment dans ceux de la chimie fine, de la pharmacie et de l'environnement. Cependant, si grâce à l'évolution, les enzymes sont optimisées et hautement spécialisées pour leurs fonctions au sein d'un organisme vivant, c'est parfois loin d'être le cas pour les applications à des réactions à larges échelles. Conséquence de leurs rôles *in vivo*, les enzymes sont spécifiques des substrats proches de leurs substrats naturels, peuvent être inhibées par des hautes concentrations en substrat ou produit et ne sont généralement stables qu'en milieu physiologique, sur une courte durée. Ces paramètres peuvent être autant de facteurs limitant leur utilisation dans les bioprocédés, qui requiert des enzymes qui acceptent une large gamme de substrats, qui soient stables et actives sur de longues périodes et dans des conditions non-physiologiques (solvants non aqueux, températures et pH extrêmes).

Il est possible d'optimiser une enzyme pour les propriétés recherchées grâce à une méthode reproduisant *in vitro* et de façon accélérée l'évolution et la sélection naturelle : l'évolution dirigée. Cette technologie, créée au début des années 1990 par le Pr. F. Arnold (Etats-Unis)[71] et le Pr. W. Stemmer (Etats-Unis)[72] s'est révélée être un outil puissant pour façonner une enzyme. L'échelle de temps du processus d'évolution est alors réduite du million d'années à quelques mois seulement.

L'évolution dirigée comporte typiquement trois grandes étapes successives : 1) la création d'une diversité génétique, 2) un test de criblage ou de sélection, et 3) l'amplification de la nouvelle propriété par itération des deux premières étapes (Figure 25).

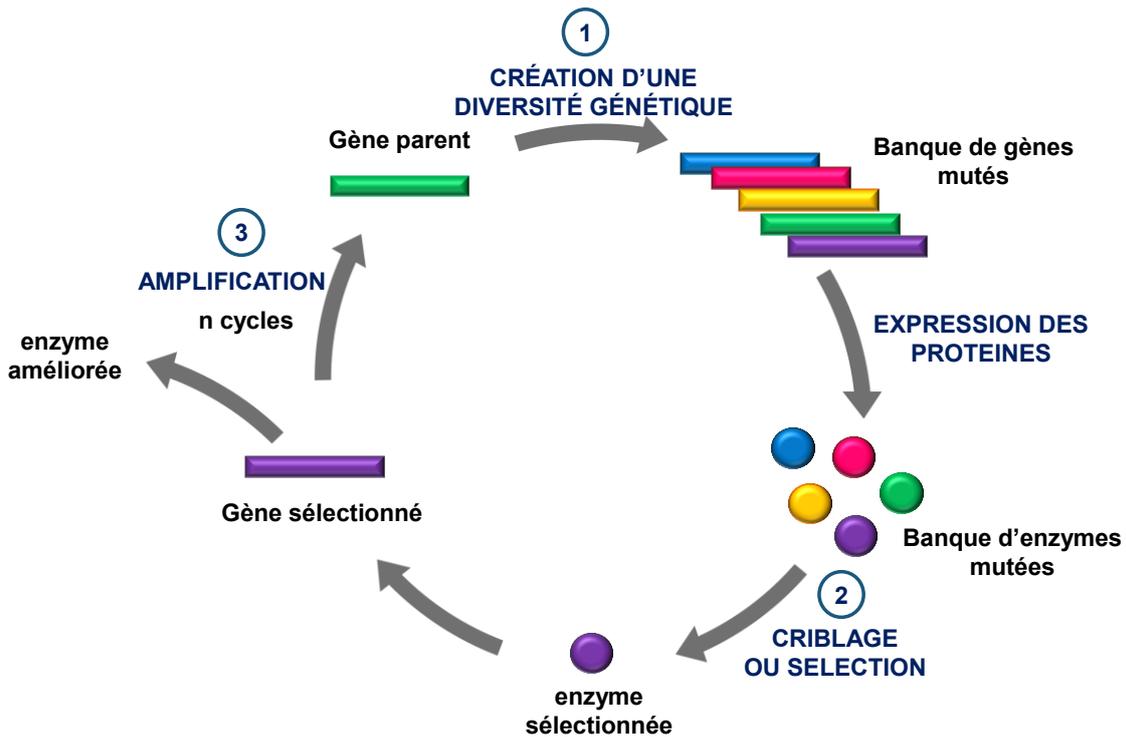


Figure 25 : Principe de l'évolution dirigée

La première étape consiste à créer une diversité génétique à partir du gène parental. Il existe un ensemble de techniques permettant de créer des banques de gènes mutés, comme par exemple les techniques de mutagenèse ou de recombinaison entre gènes d'une même famille (ex : « DNA shuffling »). Les enzymes mutées sont ensuite exprimées dans une cellule hôte appropriée à partir des gènes mutés correspondants. La seconde étape permet de mettre en évidence les enzymes mutées qui présentent les propriétés recherchées, soit par un test de sélection ou soit par un test de criblage. L'ensemble est un processus itératif : les enzymes mutées retenues après sélection ou criblage peuvent être à leur tour soumises à de nouveaux cycles jusqu'à l'obtention d'une protéine optimisée pour les propriétés recherchées.

3.2. Création de la diversité au niveau des gènes

Au cours des trente dernières années, de nombreuses techniques ont été développées afin de créer une diversité génétique au niveau du gène codant la protéine d'intérêt. Pour obtenir un ensemble de gènes modifiés, trois stratégies principales peuvent être envisagées :

- Par mutagenèse à partir du gène initial
- Par recombinaison des différentes séquences de gènes issus d'une même famille
- Par sélection des séquences naturelles du gène d'intérêt parmi la biodiversité (métagénomique).

Seules les deux premières stratégies seront décrites ici. Elles seront envisagées chacune selon une approche aléatoire ou dirigée.

3.2.1. Approche aléatoire

Cette approche est envisagée lorsqu'il existe peu ou pas d'information sur la structure et la fonction d'une protéine. Des mutations sont introduites à des endroits non définis dans la séquence nucléotidique. Cette stratégie est souvent utilisée comme première étape d'investigation et génère des banques d'enzymes mutées de grande taille. Deux techniques très distinctes sont principalement utilisées pour l'approche aléatoire : la mutagenèse aléatoire et la recombinaison génétique (« DNA shuffling »).

3.2.1.1. Mutagenèse aléatoire

La mutagenèse aléatoire consiste à introduire des mutations à des endroits non définis sur le gène. La technique la plus ancienne et la plus communément utilisée est appelée «PCR mutagène » ou « error-prone PCR ».[73-75] La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une technique permettant de dupliquer un gène en un grand nombre de copies. La PCR mutagène repose sur l'utilisation d'une ADN polymérase de *Thermus aquaticus*, la Taq polymérase (EC 2.7.7.7), dont la fidélité est plus faible que les autres ADN polymérases en raison d'une activité 3'5' exonucléase moins efficace (0,001 à 0,002% d'erreur par nucléotide et par cycle d'amplification).[76] Différentes Taq polymérases sont commerciales et leurs

caractéristiques varient en fonction du taux d'erreur généré et de la taille des séquences d'ADN à amplifier (de 0,8 à 3 kb). En fonction de la taille du gène d'intérêt, certains auteurs utilisent la PCR mutagène en présence de gènes entiers ou de fragments de gènes.[77, 78]

3.2.1.2. "DNA shuffling"

Le « DNA shuffling » (de l'anglais « shuffle » : brasser) est une technique mimant la recombinaison se produisant dans l'évolution naturelle. Elle a pour rôle de couper l'ADN provenant d'un ou plusieurs gènes(s) parental(aux) en plusieurs fragments et de les recombinaison entre eux pour conduire à des gènes chimériques. La première méthode de DNA shuffling a été développée par Stemmer en 1994.[72] D'autres méthodes basées sur le même principe ont été proposées dans le but d'augmenter la part des gènes chimériques.[79]

3.2.2. Approche rationnelle

L'approche aléatoire conduit à un très grand nombre d'enzymes mutées et nécessite donc de disposer de méthodes permettant de cribler ces très larges banques. Ainsi, une autre approche a été développée, permettant de cibler les mutations sur quelques positions clé soigneusement choisies : c'est l'approche rationnelle.

Cette approche requiert une bonne connaissance de la structure, de la fonction et du mécanisme de la protéine. De nombreuses techniques ont été mises au point, permettant de muter un seul acide aminé ponctuel, plusieurs acides aminés ou une séquence entière.

3.2.2.1. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée a pour but de substituer un acide aminé par un autre en une position précise au niveau de la séquence d'ADN. Plusieurs méthodes, basées sur la PCR, ont été développées afin d'obtenir ce type de mutation. La méthode la plus utilisée est la méthode « QuickChange® site-directed mutagenesis » brevetée par la firme Stratagene[80] car elle est simple et rapide. Les mutations sont introduites directement à partir du plasmide contenant déjà le gène d'intérêt et de deux amorces ADN complémentaires contenant la

mutation désirée, qui peut être soit un échange de bases, soit une insertion ou une délétion (Figure 26).

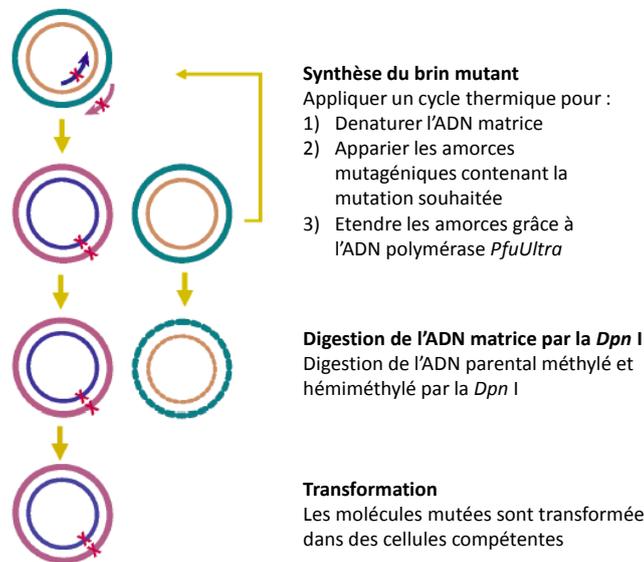


Figure 26 : Principe de la méthode QuickChange®
(traduit du manuel « QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit »)

La première étape consiste à concevoir et synthétiser les amorces, qui sont des petites séquences d'ADN (de 25 à 45 paires de bases) et qui peuvent s'hybrider à l'ADN du gène d'intérêt, à l'endroit où l'on souhaite introduire la mutation. Chacune des amorces est ensuite allongée par une ADN polymérase qui copie le reste du gène. Ainsi le gène copié comporte la mutation. Une étape de digestion permet d'éliminer sélectivement l'ADN parental par la *DpnI*. Le plasmide muté est ensuite transformé dans une cellule hôte et cloné.

La mutagenèse dirigée permet donc d'introduire une mutation dans une position donnée, mais peut également être utilisée pour l'introduction de mutations en plusieurs positions, sur une courte séquence, voire sur un gène entier.[81]

3.2.2.2. Mutagenèse par saturation de site

Cette méthode de mutagenèse consiste à remplacer de façon systématique un résidu d'une protéine par les 19 autres acides aminés. Ces substitutions sont réalisées à partir de codons dégénérés introduits dans la position désirée lors de la synthèse des oligonucléotides utilisés comme amorces. La dégénérescence est introduite grâce aux différentes proportions de chaque nucléotides constituant les codons désignés par les lettres NNN, où N est égal à 25 %

de chaque nucléotides A,T,G,C. On obtient ainsi un pool d'amorces différentes. Un protocole similaire à la mutagenèse dirigée peut être alors suivi, à partir du plasmide contenant le gène d'intérêt et du mélange d'amorces.

Par ailleurs, il est possible de réduire les biais dus à la redondance du code génétique (voir *Annexe 2*) et diminuer le nombre de codons correspondants à un même acide aminé, en utilisant des codons type NNK, où K représente 50 % G et 50 % T, ou bien de type NNS, où S représente 50 % de C ou G. Par exemple, un codon de type NNN conduira à 64 codons possibles correspondants aux 20 acides aminés, alors qu'un codon NNK, quant à lui, conduira à seulement 32 codons, couvrant les 20 acides aminés.

Cette méthode a été appliquée avec succès pour l'amélioration des propriétés des enzymes, comme la stabilité, la spécificité de substrat ou encore la stéréospécificité.[82]

Mutagenèse combinatoire par saturation de sites (« CAST »)

La mutagenèse par saturation de site a été étendue à un concept consistant à effectuer des mutations aléatoires sur deux ou trois résidus constitutifs du site actif d'une enzyme. Ce concept a été développé par le Pr. M. Reetz (Allemagne) et s'appelle la mutagenèse combinatoire par saturation de sites ou « Combinatorial Active-Site Saturation Test» (CAST).[83] Cette méthode de mutagenèse permet d'obtenir des effets de coopération entre les mutations générées et d'introduire une plus grande diversité par rapport à une démarche de saturation de site limitée à une seule position.

Mutagenèse par saturation de site sur un gène entier (« GSSM »)

Enfin, il est possible d'appliquer la méthode de saturation de site sur un gène entier : c'est la « Gene Site Saturation Mutagenesis » (GSSM™).[84] Cette technique consiste à effectuer une substitution systématique d'un acide aminé par les 19 autres acides aminés, et ce pour tous les acides aminés du gène. Si elle peut paraître laborieuse (un gène de 300 paires de bases nécessitera la construction de 300 bibliothèques d'enzymes mutées), elle présente de nombreux avantages car il n'est pas nécessaire de connaître la structure 3D de l'enzyme et elle permet d'obtenir des informations concernant le site actif, le mécanisme et la relation structure-fonction d'une protéine.[85]

3.2.2.3. Mutagenèse par cassette

La mutagenèse par cassette ou « cassette mutagenesis » est une méthode de mutagenèse aléatoire ciblée sur une séquence déterminée du gène. Elle consiste à remplacer une courte séquence du gène appelée « cassette » par un fragment d'ADN synthétique contenant la séquence mutée voulue.[86, 87]

Les nucléotides des séquences d'ADN synthétiques sont mutés de façon aléatoire selon un taux de mutation choisi. La synthèse des fragments est effectuée grâce à un synthétiseur d'ADN dont le programme a été tout d'abord établi pour la synthèse de la séquence sauvage d'intérêt : les 4 réservoirs de l'appareil délivrent dans ce cas respectivement chacun des 4 nucléotides A, T, G et C. Pour obtenir des mutations aléatoires, il suffit de remplacer le contenu des réservoirs par un mélange de nucléotides, contenant le nucléotide principal et un pourcentage choisi (généralement faible) des trois autres nucléotides. Par exemple, si le réservoir contient 70 % du nucléotide principal et 30 % d'un mélange des quatre nucléotides A, T, G, C, on dira que le taux de dégénérescence est de 30 %. Le nucléotide principal sera alors représenté à 77,5% (70 % + 7,5%) sur chaque position (Figure 27).

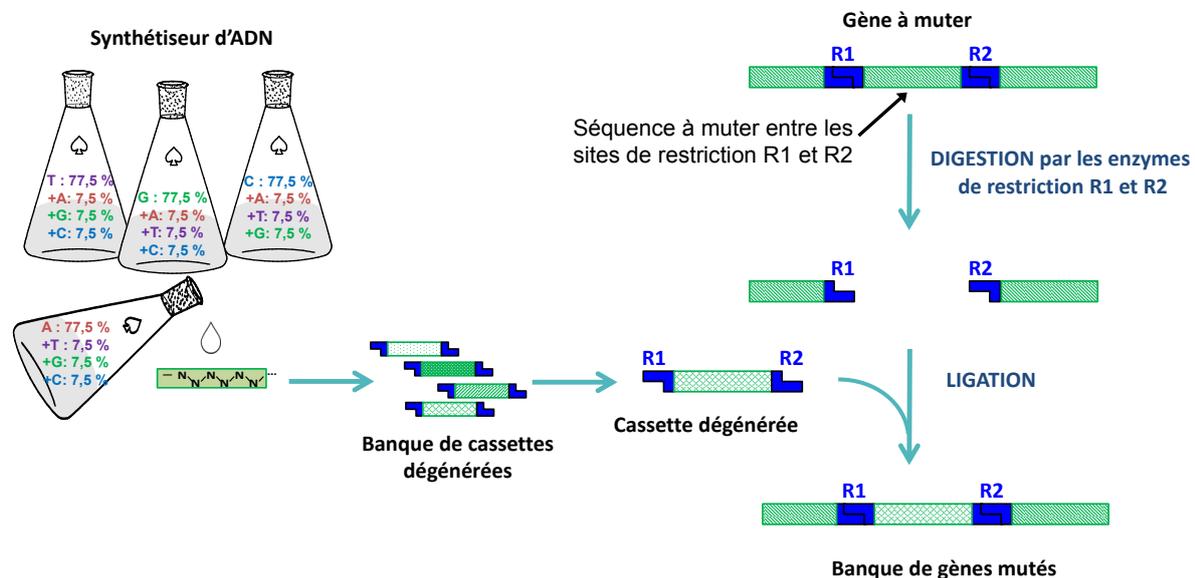


Figure 27 : Principe de la mutagenèse par cassette

Contrairement aux méthodes précédentes, la mutagenèse par cassette n'implique pas l'élongation d'une amorce par une ADN polymérase. Les fragments synthétisés sont introduits directement dans l'ADN double brin du gène d'intérêt entre deux sites de restriction. La digestion du gène par l'enzyme de restriction appropriée permet de « couper » celui-ci au

niveau des deux sites de restriction, puis l'oligonucléotide synthétisé qui comporte les mêmes sites de restriction à ses extrémités est inséré dans le gène par une étape de ligation. Une bibliothèque de plasmides dégénérés est ainsi obtenue et ces derniers seront par la suite transformés dans une souche d'expression.

Ainsi, cette technique nécessite la présence de sites de restriction proches de la séquence modifiée et qui soient de plus absents du reste du gène. Des stratégies ont été développées permettant d'introduire judicieusement des sites de restriction sur le gène sans altérer l'activité de l'enzyme ciblée.

3.2.3. Conclusion

Les méthodes de mutagenèse présentées ici donnent un aperçu des stratégies pouvant être utilisées afin de générer une diversité au niveau d'un gène. Ces stratégies sont sans cesse déclinées pour donner de nouvelles méthodes toujours plus efficaces permettant d'obtenir des banques de meilleure qualité et apportant la plus grande diversité possible.

3.3. Sélection et criblage

Quelle que soit la technique utilisée pour générer des mutations à partir d'un gène sauvage, il est nécessaire de disposer d'un test efficace, rapide et spécifique de la propriété recherchée. Au cours des vingt dernières années de nombreux travaux ont conduit au développement de tests de plus en plus ingénieux pour mettre en évidence les principales propriétés qu'il est souhaitable de modifier ou d'améliorer chez une enzyme : l'activité catalytique, la sélectivité incluant l'énantiosélectivité ou la diastéréosélectivité, la régiosélectivité, la stabilité thermique ou encore la résistance aux solvants organiques. Deux stratégies différentes peuvent être employées pour cela : la sélection ou le criblage (Figure 28).

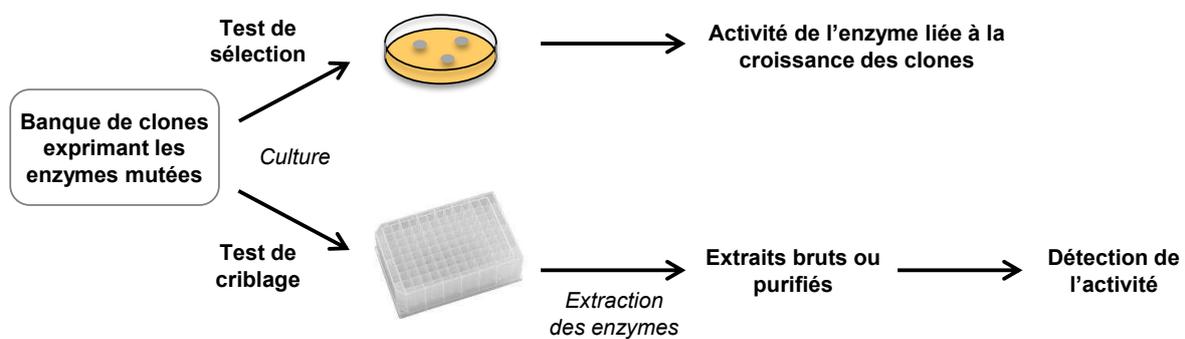


Figure 28 : Test de sélection et test de criblage

Un test de sélection est un test *in vivo* dans lequel seuls les clones comportant l'enzyme possédant les propriétés recherchées sont capables de se développer. La survie de l'hôte est donc dépendante de la présence de cette enzyme ce qui permet d'éliminer rapidement tous les clones qui ne présentent pas les activités enzymatiques recherchées. C'est un test délicat à mettre au point mais qui permet de cribler rapidement des bibliothèques de clones de grande taille (10^8 à 10^{10} mutants).

Un test de criblage est un test *in vitro* dans lequel chaque enzyme est étudiée individuellement. Dans cette technique il est donc nécessaire de faire croître les clones individuellement dans des plaques 96 puits (voire 384 puits) puis d'en extraire les enzymes mutées correspondantes. L'extrait pourra alors être purifié ou étudié directement par des méthodes analytiques. Bien que ce travail puisse être assisté par des automates, la taille des banques est généralement limitée (10^3 à 10^5 mutants).

3.3.1. Méthodes de sélection

Ce sont des méthodes rapides et efficaces permettant de mettre en évidence les clones possédant les enzymes recherchées, à partir de banques de grandes tailles.[88] Cependant, la mise au point de ces méthodes de sélection est délicate puisqu'il faut relier de façon spécifique l'activité enzymatique recherchée et la survie de la cellule hôte. Il faut veiller à prendre en compte des voies métaboliques secondaires qui peuvent conduire à la survie cellulaire sans requérir le concours de l'enzyme recherchée.

Il existe peu d'exemples de méthodes de sélection d'enzymes *in vivo*. Celles décrites reposent essentiellement sur l'utilisation d'un élément essentiel ou d'un élément toxique pour la cellule : pour survivre, la cellule devra soit être capable de synthétiser cet élément essentiel, soit de métaboliser l'élément toxique, ces deux processus requérant le concours de l'enzyme mutée recherchée.

Par exemple, cette démarche a été utilisée pour sélectionner des L-thréonine aldolases mutées (EC 4.1.2.5) ayant une activité catalytique plus importante que l'enzyme sauvage pour la réaction d'aldolisation entre l'acétaldéhyde et la glycine. Les clones sont mis en culture dans un milieu contenant l'acétaldéhyde et la glycine. L'acétaldéhyde étant toxique pour la cellule, seuls les clones exprimant des aldolases mutées ayant une activité capable de transformer une quantité suffisante d'acétaldéhyde pour rendre le milieu non toxique seront sélectionnés.[89]

3.3.2. Méthodes de criblage

Suivant la propriété recherchée, différentes méthodes ont été mises au point. L'activité de l'enzyme d'intérêt peut être déterminée en utilisant des dosages spectrophotométriques, fluorométriques ou spectrométriques. Certaines stratégies peuvent être développées directement en présence des substrats requis pour la réaction d'intérêt, d'autres font appel à des chimiosenseurs ou des substrats modifiés.

3.3.2.1. Criblage avec des substrats chromogéniques ou fluorogéniques

Ces composés sont utilisés comme substrats de l'enzyme d'intérêt et libèrent un groupement partant coloré ou fluorescent, dont le suivi par spectrophotométrie ou fluorimétrie permet de quantifier directement l'activité de l'enzyme. En général, les groupements partants sont liés au substrat par des liaisons éthers ou esters de phénols aromatiques conjugués qui sont hydrolysés de façon directe ou indirecte par l'enzyme d'intérêt libérant alors la base conjuguée.[90-92]

Ces méthodes, basées sur l'utilisation de substrats modifiés, présentent l'avantage d'être directes et offrent une bonne sensibilité surtout dans le cas de groupements fluorescents, mais elles présentent toutefois quelques inconvénients : (1) l'existence possible d'un « bruit de fond » dû à la libération du chromophore ou fluorophore selon un mécanisme non-enzymatique (2) l'encombrement stérique du groupement chromogène ou fluorogène peut amener à isoler des enzymes présentant une spécificité qui est adaptée à ce type de substrat, l'affinité de l'enzyme pour son substrat réel (non modifié par ce groupement) pouvant être différente.

3.3.2.2. Criblage avec des chimiodétecteurs

Dans le cas où les produits ou substrats ne sont pas eux-mêmes détectables soit en UV/visible, soit par fluorimétrie, il est possible d'avoir recours à une stratégie indirecte en ajoutant dans le milieu réactionnel des composés qui le sont. Ces composés peuvent être des chimiodétecteurs colorimétriques, tel que le «nitrobleu tetrazolium» (NBT) ou fluorimétriques, ou encore des cofacteurs, notamment NAD⁺/NADH, NADP⁺/NADPH. Le suivi de leur absorbance à une longueur d'onde donnée correspond à la disparition du substrat ou l'apparition du produit et permet ainsi de quantifier l'activité de l'enzyme.[93, 94]

3.3.2.3. Criblage par des méthodes spectrométriques

Parmi les méthodes spectrométriques, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire (RMN) sont couramment utilisées, et ont été notamment développées par l'équipe du Pr. M. Reetz pour leur utilisation à haut-débit.[95, 96] Les techniques de chromatographie en phase liquide (LC) ou gazeuse (GC) sont parfois également employées.

Néanmoins ces méthodes nécessitent souvent une étape de dérivation des produits, ce qui limite leur utilisation pour des criblages hauts-débits.

3.3.3. Conclusion

Il existe de nombreuses techniques permettant de détecter et/ou de quantifier l'activité d'une enzyme dans le cadre du criblage de bibliothèques d'enzymes mutées. Chacune de ces techniques présente des avantages et des inconvénients : sensibilité, coût, débit ou encore spécificité de substrat et le chimiste devra choisir la technique la plus adaptée suivant l'objectif recherché.

3.4. Applications de l'évolution dirigée

L'évolution dirigée, c'est-à-dire l'itération multiple des étapes 1) création des banques de mutants et 2) sélection ou criblage, a permis l'identification de nombreuses protéines ayant de nouvelles propriétés.[97] Un parallèle peut être fait entre l'évolution dirigée des enzymes et les méthodes combinatoires utilisées en chimie organique pour l'identification d'une tête de série (lead) puis l'optimisation de nouveaux agents thérapeutiques.[98] Un premier cycle conduira généralement à l'enzyme ayant la propriété recherchée mais faiblement active, puis les générations suivantes conduiront à l'enzyme optimisée. Différentes stratégies ont été développées, permettant d'accéder le plus rapidement et efficacement possible à l'enzyme optimisée.[78, 98-105] Dans ce cadre, il est possible de mélanger successivement les différentes techniques décrites dans les paragraphes 3.2 et 3.3.

Un excellent exemple d'application est le travail du Pr. M. Reetz et son équipe sur la modification de l'énantiosélectivité de lipases, basé sur la combinaison de différentes techniques de mutagenèse couplées à un test de sélection à haut débit.[106] L'objectif est d'augmenter le facteur de sélectivité E de la lipase de *Pseudomonas aeruginosa* pour le dédoublement cinétique d'un ester chiral par hydrolyse. La lipase sauvage de *P. aeruginosa* présente un faible E de 1,1 en faveur de l'énantiomère (S). L'enchaînement de différentes stratégies de mutagenèse (PCR mutagène, mutagenèse par saturation de site, *DNA shuffling*, mutagenèse combinatoire à cassettes multiples) appliquées aux lipases mutées

présentant les meilleurs E à l'issue de chaque cycle a permis finalement d'obtenir une lipase mutée, présentant un E supérieur à 51 (Figure 29).

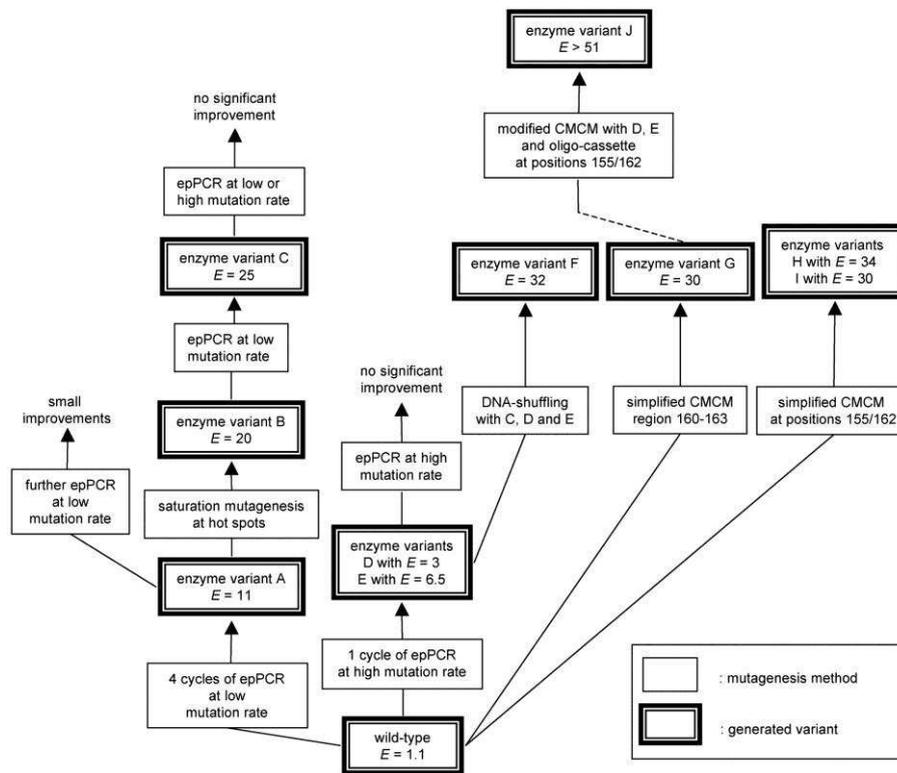


Figure 29 : Evolution dirigée appliquée à l'énantiosélectivité d'une lipase
Extrait de la littérature [106]

3.5. Amélioration et modification des propriétés de la TK

Au fur et à mesure de la découverte de nouvelles TK dans la biodiversité, de nombreux tests reposant sur des stratégies variées ont été développés afin de déterminer l'activité et d'explorer les propriétés de ces TK sauvages. Les chercheurs s'intéressent à présent à l'amélioration et la modification des propriétés de la TK par évolution dirigée. Nous verrons dans cette partie les différents tests permettant de déterminer l'activité TK et comment ils peuvent être adaptés au criblage de TK mutées, puis les premiers travaux sur l'évolution dirigée appliqués à la TK publiés depuis 2007 par les Pr. P. Dalby et H. Hailes (UCL, Grande-Bretagne).

3.5.1. Tests d'activité de la TK

3.5.1.1. Introduction

De nombreux tests sont répertoriés dans la littérature, permettant de déterminer l'activité de la TK (Figure 30). Ces tests reposent sur des stratégies variées qui sont exposées ci-dessous et dont certaines peuvent être envisagées pour des tests de criblage.

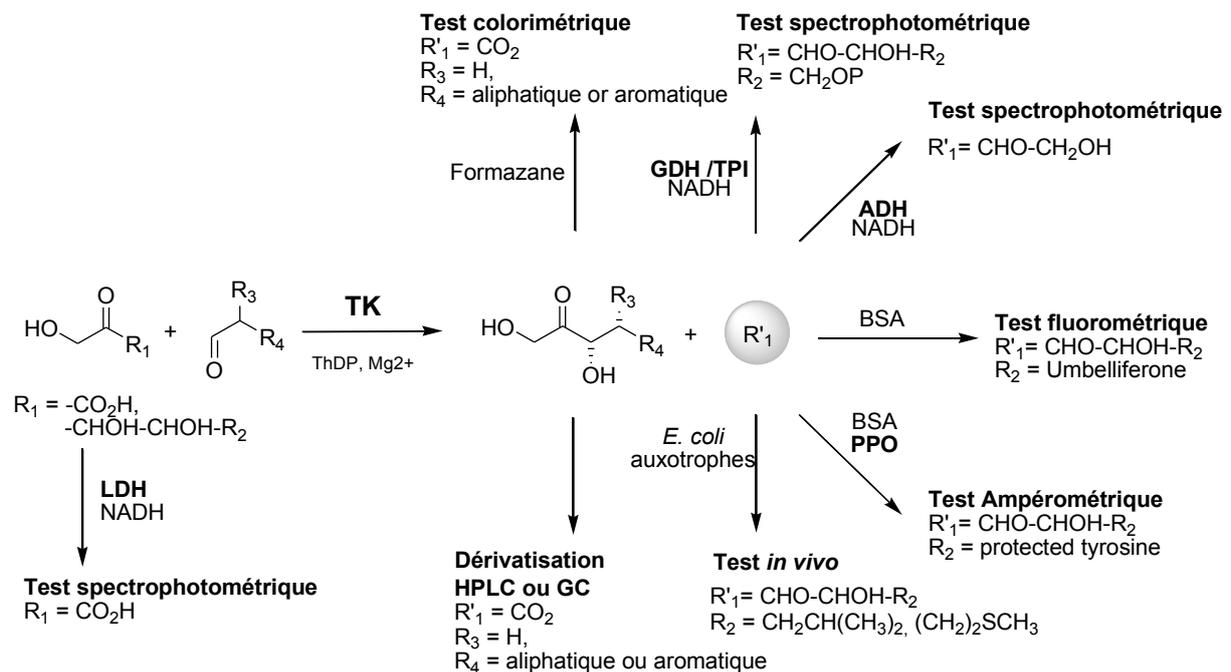


Figure 30 : Tests d'activité de la TK

LDH : Lactate déshydrogénase; ADH : alcool déshydrogénase; TPI : triose phosphate isomérase; BSA : albumine de sérum bovin; PPO : polyphénoloxydase ; GDH : glycerol-3-phosphate déshydrogénase

3.5.1.2. Tests en présence de NADH

La méthode conventionnelle pour mesurer l'activité de la TK repose sur l'utilisation du D-X5P comme donneur et du D-R5P comme accepteur car ce sont les substrats physiologiques de la TK.[107, 108] La réaction conduit au D-G3P qui est alors engagé dans une seconde réaction, catalysée par une enzyme auxiliaire, la TPI, conduisant à la dihydroxyacétone phosphate (DHAP), elle-même engagée dans une troisième réaction catalysée par la glycerol-3-phosphate déshydrogénase (GDH, EC 1.1.1.8), en présence de NADH. La

disparition du NADH au cours du temps est suivie par spectrophotométrie à 340 nm. Sa concentration est directement proportionnelle à celle du glyceraldéhyde-3-phosphate formé, ce qui permet ainsi de déterminer l'activité de la TK.

Le D-X5P, substrat donneur, n'étant pas commercialisé de façon constante et très délicat à préparer, une amélioration de ce test a été proposée permettant de générer le D-X5P *in situ* à partir du D-xylulose, grâce à une xylulokinase (EC 2.7.1.17) (Figure 31).[109]

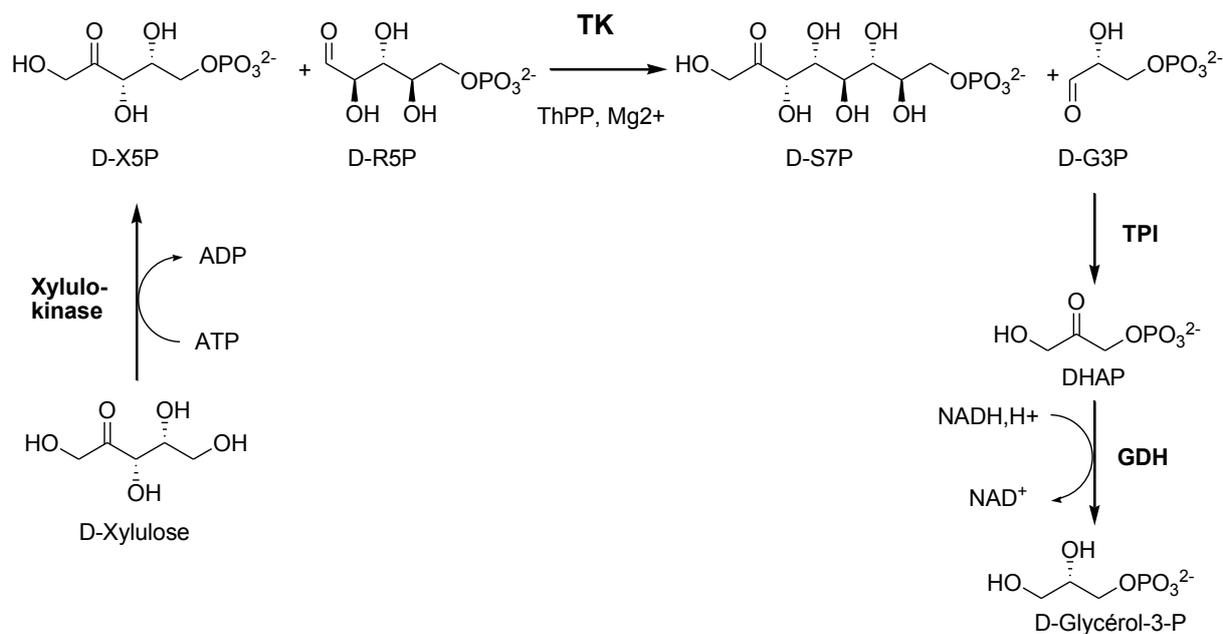


Figure 31 : Principe du test basé sur les substrats naturels de la TK, le D-ribose-5-phosphate et le D-xylulose-5-phosphate

D'autres substrats donneurs ont été envisagés en remplacement du D-X5P. Le groupe du Pr. L. Hecquet a développé un test en présence du L-érythrulose comme substrat donneur.[107] Comme précédemment présenté dans le paragraphe 2.5.1.1 page 42, le produit formé ici est le glycolaldéhyde. Celui-ci est alors réduit par une enzyme auxiliaire, l'ADH de *S. cerevisiae* en présence de NADH. La réaction peut être ainsi suivie par spectrophotométrie.

Enfin, un test a été mis au point à partir du D-F6P comme autre substrat donneur et du D-G3P comme substrat accepteur de la TK. Le produit formé est le D-E4P qui est alors converti en D-érythronate-4-phosphate par une érythrose-4-phosphate déshydrogénase (EC 1.2.1.72) en présence de NADH (Figure 32).[108]

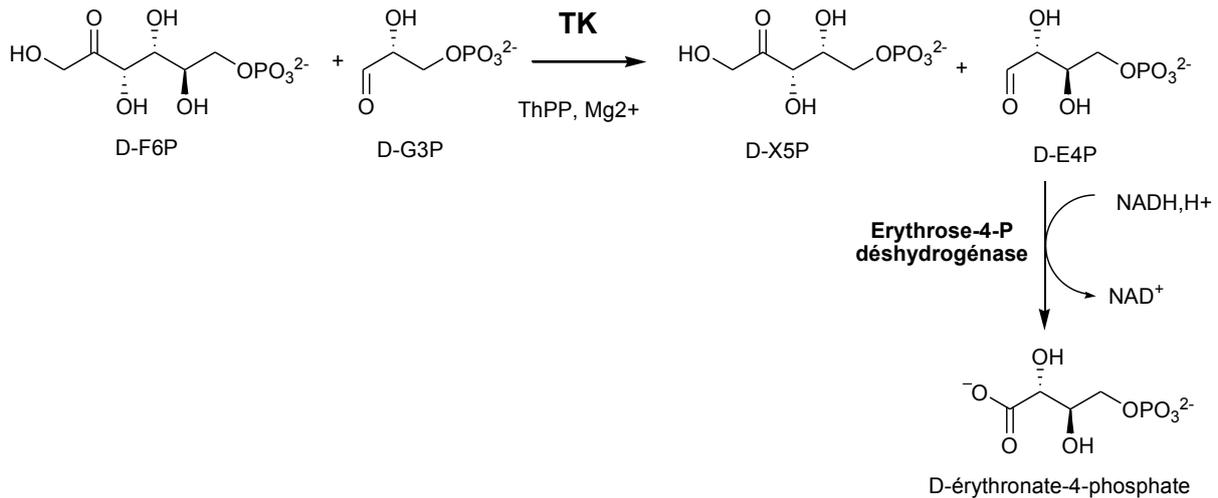


Figure 32 : Test basé sur l'utilisation de l'érythrose-4-P déshydrogénase

En conclusion, les tests en présence de NADH sont nombreux mais ils se prêtent difficilement au criblage de banque d'enzymes mutées en raison du coût du NADH ainsi que d'un manque de sensibilité lorsque les activités de la TK sont très faibles.

3.5.1.3. Tests en présence de substrats modifiés

Ces tests ont été développés par le groupe du Pr. L. Hecquet. Leur principe repose sur l'utilisation de substrats comportant un motif reconnu par la TK (cétose *D-thréo*) sur lequel est greffé un groupement partant conduisant à un signal physique lorsqu'il est libre. Ces composés ne sont pas commerciaux et sont synthétisés au préalable par voie chimioenzymatique. La libération du groupement partant est catalysée par l'albumine de sérum bovin (BSA) grâce à ses résidus lysine qui jouent le rôle de base. Le principe de ce test a été initié par le Pr. J.-L. Reymond (Suisse) puis appliqué à de nombreuses autres enzymes (lipases, estérases, deshydrogénases, transaldolases, etc.) (Figure 33).

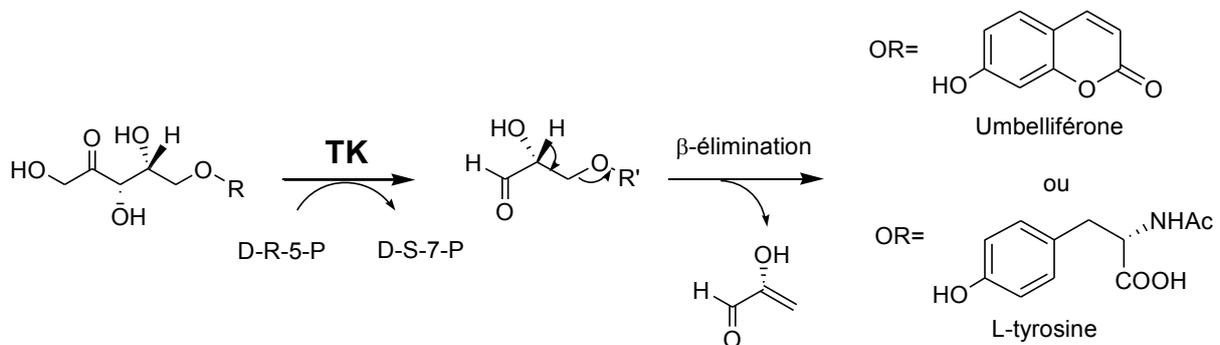


Figure 33 : Tests basés sur l'utilisation de substrats fluorogéniques ou de précurseurs de L-tyrosine

Deux groupements partants ont été envisagés : l'umbelliférone, hautement fluorescente sous forme libre, et la L-tyrosine protégée, détectable par ampérométrie.

Le test fluorogénique reposant sur l'umbelliférone [110, 111] est sensible (la fluorimétrie est 10^3 fois plus sensible que la spectrophotométrie) et stéréospécifique (la configuration des deux carbones asymétriques du motif « cétose » peut être modulé en fonction des TK mutées recherchées). Cependant, ces composés sont de mauvais substrats de la TK sauvage du fait de l'encombrement stérique apporté par l'umbelliférone. Ceci est un handicap pour le criblage de TK mutées dont l'activité est généralement faible lors des premiers cycles de mutagenèse.

Un test analogue a été développé avec une L-tyrosine protégée comme groupement partant [112, 113] mais ce type de composé n'est pas un meilleur substrat pour la TK par rapport à l'analogue comportant l'umbelliférone. Dans ce cas, il est possible de détecter de façon ampérométrique la L-tyrosine libérée dans un milieu électrolytique, en utilisant un biocapteur à polyphenol oxidase (PPO, EC 1.14.18.1). La L-tyrosine protégée est oxydée par la PPO pour former l'o-quinone correspondante, puis celle-ci subit une réduction cathodique pour donner un catéchol. L'activité de la TK est ainsi reliée à la valeur d'un courant électrique. Ce test est très sensible (dix fois plus sensible que la détection par spectrophotométrie) et rapide (signal obtenu en quelques secondes). Cependant, ce test est difficilement exploitable pour le criblage de banque car il n'est pas encore miniaturisé.

3.5.1.4. Test colorimétrique

Un test colorimétrique basé sur le chlorure de 2,3,5-triphenyltetrazolium (rouge de tétrazolium) a été développé pour cribler rapidement des TK mutées. [114] Le rouge de tétrazolium est un réactif incolore capable d'oxyder l' α -hydroxycétone formée à la suite de la réaction catalysée par la TK, entre le Li-HPA et un aldéhyde aliphatique comme accepteur. Le rouge de tétrazolium est alors lui-même réduit pour conduire à sa forme formazane, composé présentant une intense couleur rouge à $\lambda_{\max} \approx 485$ nm (Figure 34). Un excès de rouge de tétrazolium et de soude est introduit à la fin de la réaction afin d'évaluer la quantité de cétose formé.

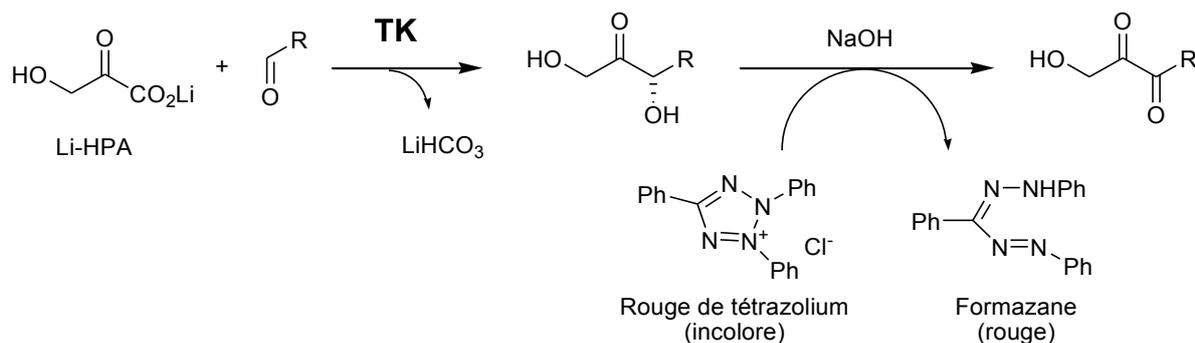


Figure 34 : Test colorimétrique pour l'activité TK basé sur la formation de formazane

Cette méthode est rapide, peu coûteuse et relativement sensible. Cependant l'utilisation de ce test est limitée aux substrats accepteurs non α -hydroxylés. En effet, les substrats α -hydroxylés, qui sont les accepteurs naturels de la TK, réagiraient directement avec le rouge de tétrazolium.

3.5.1.5. Dosages indirects des substrats ou des produits

Enfin, un éventail de méthodes ont été développées afin de doser de façon indirecte la quantité de substrats restant et/ou la quantité de produit formé, à partir d'échantillons prélevés au cours du temps ou en fin de réaction. Ces tests sont difficiles à mettre en œuvre pour le criblage de banques de grande taille et beaucoup moins précis que ceux décrits précédemment.

Le substrat donneur, le HPA peut par exemple être dosé par voie enzymatique, utilisant la lactate déshydrogénase (LDH, EC 1.1.1.27) en présence de NADH[115, 116] ou bien par des méthodes chromatographiques (HPLC et GC), permettant de doser la disparition du HPA et/ou l'apparition produit de réaction.[117-119] Ces dernières nécessitent souvent une étape de dérivatisation du produit (acétylation, benzoxylation) ce qui empêche leur utilisation à haut-débit.

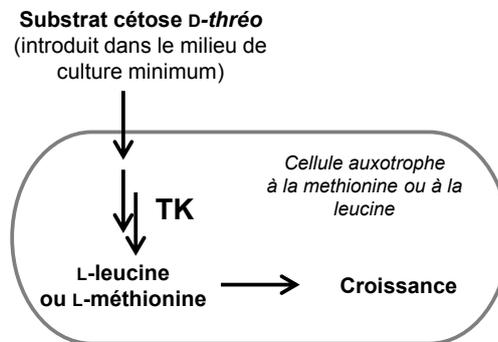
3.5.1.6. Test de sélection de la TK

Dans le but de cribler un très grand nombre de TK mutées (notées TK*), un test de sélection a été envisagé par l'équipe du Pr. L. Hecquet.[120-122] Le principe de ce test de sélection est basé sur l'auxotrophie vis-à-vis d'un acide aminé. L'auxotrophie est l'incapacité pour un

organisme de synthétiser un métabolite indispensable à sa survie. Dans le cas présent, des souches d'*E. coli* auxotrophes pour la L-leucine et la L-méthionine ont été construites.

Ce test de sélection a été validé avec des cellules auxotrophes exprimant la TK sauvage, en présence de substrats comportant un motif cétose-D-thréo (reconnu par la TK sauvage) et la chaîne latérale de la leucine ou de la méthionine en position terminale. Les cellules sont mises en culture dans un milieu minimum contenant l'un ou l'autre de ces substrats. Après pénétration du substrat dans la cellule, la TK coupe la liaison C2-C3. L'aldéhyde ainsi libéré est alors pris en charge par le métabolisme d'*E. coli* pour être transformé en L-leucine ou L-méthionine (Figure 35.a).

a)



b)

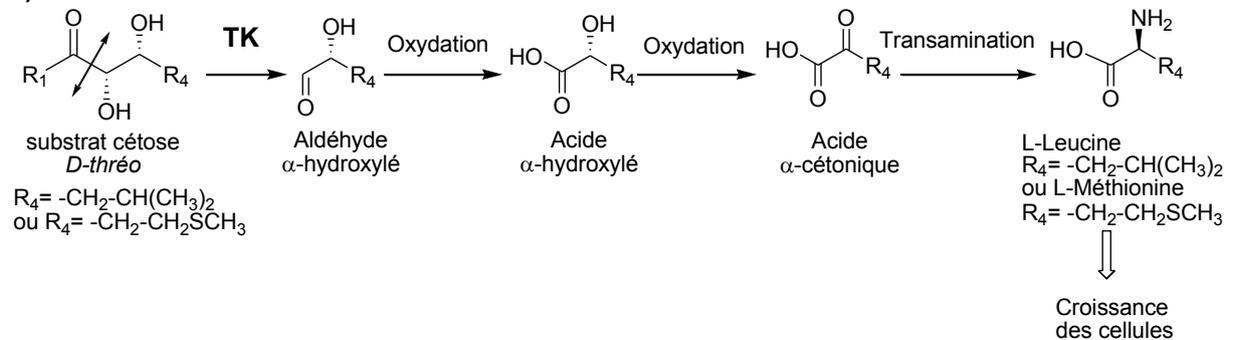


Figure 35 : Principe du test de sélection basé sur l'auxotrophie

Les études réalisées montrent que les cellules sont capables de se développer sans autre source de carbone avec des vitesses de croissance proches de celles obtenues en présence des acides aminés correspondants (Figure 35b). Les témoins réalisés en présence de cellules n'exprimant pas la TK indiquent cependant une croissance bien qu'elle soit beaucoup plus lente qu'en présence de cellules exprimant la TK. Ce « bruit de fond » est induit par des voies métaboliques indépendantes de la TK qui sont en cours d'étude afin de pouvoir déléter les gènes codant pour les enzymes impliquées.

3.5.1.7. Conclusion

Ainsi de nombreux tests ont été développés permettant de détecter l'activité de la TK. Cependant aucun ne présente toutes les qualités requises pour le criblage ou la sélection de TK mutées c'est-à-dire facile à mettre en œuvre, peu coûteux, quantitatif et générique ce qui est important pour tester plusieurs substrats potentiels ayant des structures différentes. Certains sont des tests quantitatifs et permettent de déterminer précisément l'activité de la TK mais sont difficiles à utiliser pour cribler de nombreux échantillons alors que d'autres tests moins complexes et plus adaptés pour le criblage de banques sont moins sensibles.

3.5.2. Ingénierie de la TK

3.5.2.1. Introduction

L'ingénierie des protéines est un outil privilégié pour améliorer les différentes caractéristiques d'une enzyme. Dans le cas de la TK, le défi principal est d'élargir son spectre d'activité. En effet, les substrats non-physiologiques montrent une bien moins bonne affinité pour la TK que les substrats phosphorylés. Plusieurs groupes ont tenté d'améliorer cette affinité, dont l'équipe des Pr. P. Dalby et H. Hailes (Royaume-Uni) qui publiaient en 2007 les premiers travaux présentant la construction de banques de TK d'*E. coli* mutées.[31]

3.5.2.2. Construction des banques de TK par mutagenèse

Bien que l'évolution dirigée puisse être utilisée pour améliorer les propriétés d'une enzyme sans connaissance de ses relations structures-fonctions, de nombreux travaux montrent que la modification de l'activité, de la spécificité de substrat ou de l'énantiosélectivité d'une enzyme, résultent essentiellement de mutations situées au niveau du site actif de l'enzyme.[123, 124]

Ainsi une stratégie visant à modifier les résidus du site actif de la TK d'*E. coli* a été développée par l'équipe des Pr. P. Dalby et H. Hailes selon deux approches complémentaires. La première approche définit un ensemble de 10 résidus choisis pour des raisons structurales : les résidus ayant une distance inférieure à 4 Å du substrat fixé dans le

site actif (l'E4P dans la TK de *S. cerevisiae*, structure : 1NGS.pdb). Ces positions sont : His26, His100, Ile189, His261, Glu262, Arg358, Ser385, His461, Asp469 et Arg520.

La seconde approche repose sur des considérations phylogénétiques. Les résidus sont choisis dans un périmètre à 10 Å du ThDP et correspondent à des positions qui n'ont pas été conservées au cours de l'évolution des TK bactériennes. Après la comparaison de 52 séquences de TK provenant de diverses espèces, 10 sites ont été sélectionnés: Lys23, Ala29, Asn69, Met159, Ser188, Asp259, Ala383, Pro384, Val409 et Leu466 (Figure 36).

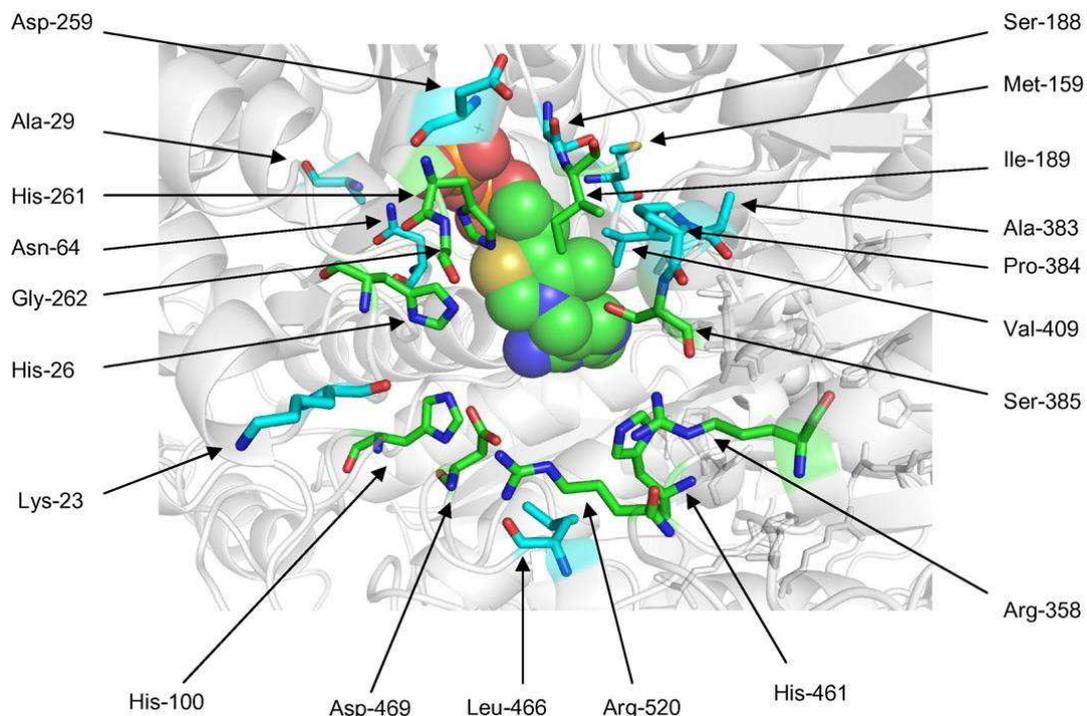


Figure 36 : Position des résidus choisis selon des critères structurels (vert) et des critères phylogénétiques (cyan) dans le site actif de la TK d'*E. coli* (1QGD.pdb)
Schéma extrait de la littérature [31]

La méthode de mutagenèse par saturation de site a ensuite été appliquée à chacune de ces positions avec la technique de mutagenèse Quickchange (Stratagène), conduisant à la création de 20 bibliothèques de 90 clones. Ces clones exprimant les TK mutées ont ensuite été criblés vis-à-vis de différents substrats aldéhydes non-naturels, présentés par la suite.

3.5.2.3. Amélioration de l'activité de la TK pour des substrats accepteurs non- naturels

Afin d'élargir le spectre d'activité de la TK, les équipes des Pr. P. Dalby et H. Hailes ont étudié l'activité des TK mutées vis-à-vis de différents accepteurs: principalement des aldéhydes non- α -hydroxylés aliphatiques[31, 125-127] et des aldéhydes aromatiques.[128, 129] Par ailleurs, une étude publiée en 2008 sur la stéréosélectivité de la TK sur le C3 de l' α,α' -dihydroxycétone formée a montré que si cette stéréosélectivité est excellente avec le glycolaldéhyde comme accepteur ($ee > 95\%$ en faveur du produit de configuration 3S), elle est beaucoup moins élevée en présence d'un aldéhyde non- α -hydroxylé tel que le propanal (ee : 58% en faveur du produit de configuration 3S). Cette constatation a été le point de départ d'une étude portant sur la recherche de TK mutées présentant une meilleure stéréosélectivité.

Pour mettre en évidence les TK mutées d'intérêt, différents tests de criblage spectrophotométriques ou chromatographiques ont été choisis en fonction des produits formés et des propriétés recherchées (activité ou stéréospécificité) (Tableau 5). Les différents aldéhydes accepteurs sont toujours mis en présence du donneur Li-HPA.

Une première étude portant sur l'activité des TK mutées vis-à-vis d'un substrat non-phosphorylé, le glycolaldéhyde, a montré que les mutations des résidus choisis selon un critère phylogénétique n'influencent que modérément l'activité enzymatique tandis que les mutations de résidus structurellement proches du substrat ont permis d'augmenter l'activité de façon plus importante, comme par exemple les mutations H461S et R520V qui ont permis d'augmenter l'activité d'un facteur 4,8 et 3,6 respectivement (Tableau 5).[31] Il est à noter que ces résidus ont un rôle dans la fixation des groupements phosphates ce qui peut expliquer l'effet bénéfique de ces mutations dans ce cas.

Puis une seconde étude a permis de mettre en évidence des mutations permettant d'améliorer l'activité vis-à-vis d'un substrat non α -hydroxylé, le propanal. Les mutations les plus favorables sont, entre autres R520V (4,7), D469T (4,9) et D469A (4,3). La sélectivité de l'enzyme vis-à-vis des deux substrats accepteurs, glycolaldéhyde et propanal, a également été étudiée: la mutation D469Y permet une augmentation de la sélectivité de la TK en faveur du propanal de 64 fois par rapport à celle observée avec la TK d'*E. coli* de type sauvage. Or l'interaction du résidu Asp469 avec l'hydroxyle en C2 des accepteurs ayant déjà été décrite,[42] sa mutation paraît cohérente. D'autre part, une deuxième génération de

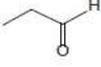
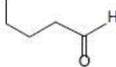
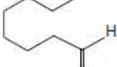
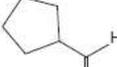
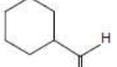
double et triple mutants a été construite selon la méthode « CASTing » en combinant les positions mutées favorablement.[130] Ainsi les doubles mutants D469Y/R520V et D469T/R520Q ont été sélectionnés pour une activité relative de 9,6 et 7,7 vis-à-vis du propanal par rapport la TK sauvage mettant en évidence l'effet de coopération entre plusieurs mutations. Par ailleurs, la stéréochimie des produits obtenus a été étudiée. Les expériences en présence du propanal ont montré qu'il était non seulement possible d'augmenter la stéréosélectivité d'un ee de 58 % en faveur du produit (3S) pour la TK sauvage à un ee de 90 % pour le mutant D469E mais également d'inverser cette stéréosélectivité puisque qu'un ee de 88 % en faveur du produit (3R) a été obtenu pour le mutant H26Y. (Tableau 5).

Propriété recherchée	Méthode de criblage	Mutant	Résultats	Ref.
Amélioration de l'activité avec le glycolaldéhyde	Dosage du produit (erythrose) par HPLC	H461S	Activité améliorée d'un facteur 4,8 par rapport à la TK-wt	[31]
		A29E	Activité améliorée d'un facteur 3 par rapport à la TK-wt	
Amélioration de l'activité avec le propanal	1) Suivi CCM et Test au tétrazolium red 2) dosage du produit par HPLC	D469T	Activité améliorée d'un facteur 4,9 par rapport à la TK-wt	[125]
		D469Y	Spécificité propanal/glycolaldéhyde augmentée d'un facteur 64 par rapport à la TK-wt	[125]
		D469Y/R520V	Activité améliorée d'un facteur 9,6 par rapport à la TK-wt	[130]
Amélioration de la stéréosélectivité	HPLC chirale ou GC chirale	D469E	90 % ee (3S) ; TK-wt: 58% ee (3S) (sur le produit issu du propanal)	[127]
Inversion de la stéréosélectivité		H26Y	88 % ee (3R)	
Amélioration de l'activité avec des aldéhydes aliphatiques (C4-C8)	HPLC ou RMN (ester de Mosher)	D469E	Rendements et ee supérieurs à TK-wt	[126]
Amélioration de l'activité avec des aldéhydes aromatiques	1) Test au rouge de tétrazolium 2) Pouvoir rotatoire, HPLC et RMN	F343A	10% rendement avec le benzaldéhyde (TK-wt : 0%)	[128]

Tableau 5 : Mutants de TK ayant des propriétés modifiées ou améliorées par rapport à la TK d'*E. coli* de type sauvage (TK-wt)

Enfin, les meilleurs TK mutées sur une seule position obtenues précédemment (D469E, D469T et H26Y) ainsi que le mutant F434A (adjacent au D469) ont été étudiées en présence

d'aldéhydes accepteurs hydrophobes aliphatiques,[126] cycliques,[126] aromatiques [128] et hétéroaromatiques(Figure 37).[128] Quelques mutants ont montré une activité accrue pour les aldéhydes aliphatiques C3 à C8 et les aldéhydes cycliques C4 à C7. Pour les aromatiques et hétéroaromatiques, de faibles taux de conversion ont généralement été mesurés (<5%).

Substrate					
WT <i>E. coli</i>					
Yield	36 %	16 %	<3 %	<3 %	<3 %
ee	58 % (3S)	84 % (3S)	66 % (3S)		
Mutant D469E					
Yield	70 %	58 %	18 %	40 %	10 %
ee	90 % (3S)	97 % (3S)	86 % (3S)	99 % (1S)	97 % (1S)
Mutant H26Y					
Yield	68 %	7 %	21 %	<3 %	No reaction
ee	88 % (3R)	84 % (3R)	83 % (3R)	30 % (1R)	

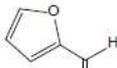
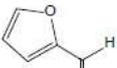
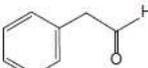
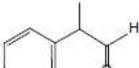
Substrate				
WT <i>E. coli</i>				
Yield	No reaction	No reaction	5 %	35 %
ee			93 % (3S)	88 % (3S,4R) 12 % (3S,4S)
Mutant D469E				
Yield	2 %	5 %	50 %	30 %
ee	0 %		90 % (3S)	95 % (3S,4R) 5 % (3S,4S)
Mutant D469T				
Yield	2 %	3 %	50 %	40 %
ee	70 % (3R)		96 % (3S)	96 % (3S,4R) 4 % (3S,4S)
Mutant F434A				
Yield	10 %	1 %	48 %	35 %
ee	82 % (3R)		97 % (3S)	85 % (3S,4R) 15 % (3S,4S)

Figure 37 : Amélioration de l'activité de TK d'*E.coli* vis-à-vis de substrats accepteurs aliphatiques et aromatiques
Schéma extrait de la littérature [131]

Plus récemment, un autre groupe, celui du Pr. U. Hanefeld (Pays-Bas) s'est intéressé à l'amélioration de la TK de *S. cerevisiae* par évolution dirigée.[132] L'étude a été centrée sur l'amélioration de l'activité de cette TK vis-à-vis des aldéhydes accepteurs non-phosphorylés, présentant de longues chaînes polyhydroxylées : le D-ribose et le D-glucose. Une banque a été construite par saturation de site en ciblant individuellement cinq résidus conservés : H30, H263, D477, H481 et R528. La banque a été criblée en deux étapes à l'aide de méthodes

basées sur l'HPLC puis la GC.[119] L'activité vis-à-vis du D-ribose et du D-glucose ont pu être améliorées jusqu'à un facteur 2 par rapport à la TK de *S. cerevisiae* sauvage, notamment grâce à des mutations sur la position R528N. Puis une seconde génération de doubles mutants a été construite à partir des mutations les plus favorables et a conduit aux mutants R528Q/S527T et R258K/S527T dont les activités relatives par rapport à la TK sauvage ont été augmentées d'un facteur 3,7 et 2,5. Ces travaux mettent ainsi en évidence l'intérêt des stratégies basées sur des mutations multiples grâce à l'effet de coopération entre les mutations.[131]

3.5.2.4. Conclusion

Ces premiers travaux de modification des propriétés de la TK par mutagenèse selon une approche rationnelle ont permis d'augmenter l'activité de la TK vis-à-vis de certains substrats, d'élargir son spectre de substrats accepteurs de la TK ainsi que d'augmenter et voire même d'inverser la stéréospécificité au niveau du carbone 3 du cétose formé. Ces résultats pourront conduire, d'une part, à de nouvelles applications en synthèse, mais également, à des études plus fondamentales afin de mieux comprendre les relations structure-fonction de la TK.

Objectifs et Stratégie

Objectifs

L'intérêt de la transcétolase (TK) en tant que biocatalyseur pour la synthèse de cétooses de configuration D-thréo (3S, 4R) a été largement démontré ici. Cependant, de nombreux défis restent à relever pour continuer à améliorer cette enzyme selon différentes directions, telles que l'amélioration de sa stabilité avec la température ou le pH ou encore sa tolérance aux co-solvants organiques ce qui faciliterait son utilisation à l'échelle industrielle, mais aussi l'extension de son spectre de substrats.

L'un des défis concerne l'utilisation d'aldéhydes accepteurs aliphatiques cycliques et aromatiques pour lesquels les TK de type sauvage ont peu d'affinité. Cet aspect a été récemment envisagé par le groupe des Pr. H. Hailes et P. Dalby et des expériences de mutagenèse au niveau du site actif de la TK d'*E.coli* ont conduit à des améliorations significatives (Figure 38a).[1] Un autre aspect a fait l'objet de travaux récemment décrits dans la littérature et concerne la stéréospécificité de la TK sur le carbone 3 du cétoose formé. Une étude basée sur le même concept a permis d'augmenter l'excès énantiomérique sur le produit (3S) mais également d'inverser cette stéréospécificité permettant d'accéder à des produits de configuration (3R), à partir d'aldéhydes accepteurs non- α -hydroxylés.

Un autre défi, qui n'a pas encore été relevé ni envisagé dans la littérature et qui fait l'objet de cette thèse, concerne la modification de la configuration du carbone 4 du cétoose formé. Il s'agit pour cela de modifier l'énantiosélectivité de la TK de manière à ce qu'elle accepte les substrats accepteurs de type aldéhydes α -hydroxylés de configuration (2S) et ainsi accéder aux composés de configuration L-*érythro* (3S, 4S) (Figure 39b).

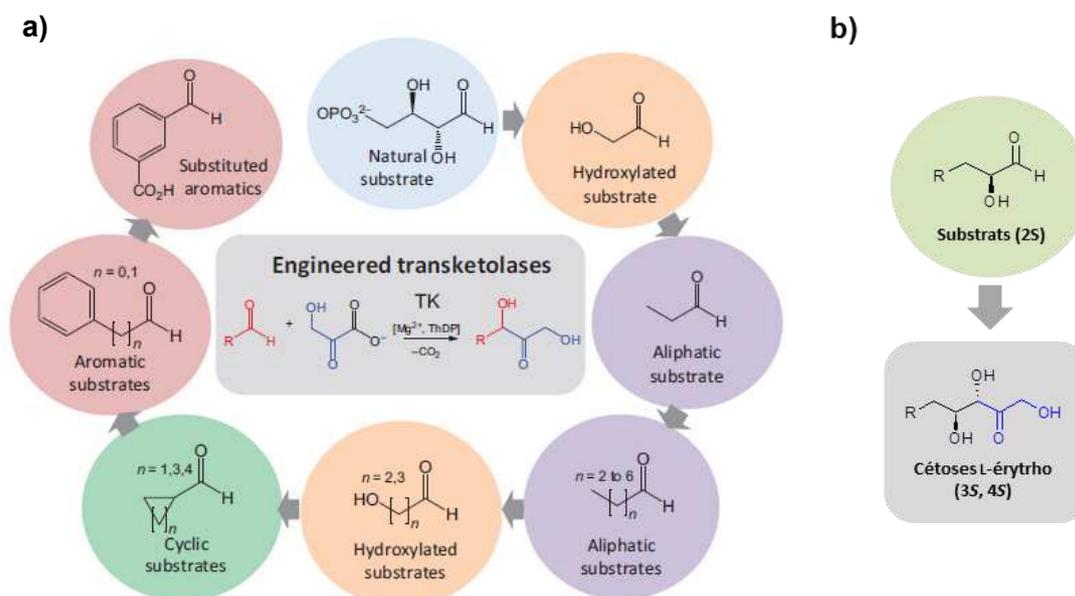


Figure 38 : Substrats de TK modifiées

a) Substrats acceptés par des TK modifiées – Schéma extrait de la littérature [1]; b) Substrats ciblés dans notre projet

Stratégie

La stratégie que nous avons envisagée à cet effet consiste à remodeler la TK par ingénierie rationnelle et semi-rationnelle, ces deux approches ayant conduit à des exemples de réussite pour la modification de l'énantiosélectivité d'autres enzymes. Notre stratégie repose sur six objectifs principaux (Figure 39).

Les enzymes thermostables étant favorables à ce type d'expérience, notre premier objectif sera d'identifier et produire une TK thermostable puisqu'aucune n'a été décrite à ce jour. Les propriétés de cette nouvelle TK seront examinées.

Le second objectif sera de modifier cette enzyme en ciblant des positions clés du site actif ayant un rôle potentiel dans l'inversion de l'énantiosélectivité grâce à l'étude de sa structure tridimensionnelle. Les enzymes modifiées seront obtenues par mutagenèse dirigée (mutagenèse par saturation de site) et semi-dirigée (mutagenèse par cassettes).

Le troisième objectif consistera à développer un test permettant le criblage à haut-débit des TK mutées dans la mesure où aucun des tests décrits à ce jour n'est à la fois rapide, sensible et compatible avec les substrats d'intérêt.

Le quatrième objectif sera de rechercher grâce à ce test une ou plusieurs TK modifiées présentant une activité vis-à-vis d'un substrat α -hydroxylé modèle de configuration (2S).

Enfin, notre dernier objectif sera de caractériser la ou les TK mutées identifiées à l'issue du criblage. Si cette (ces) enzyme(s) présente(nt) toutes les qualités requises pour la synthèse des composés de configuration L-érythro (3S, 4S), elle sera alors directement employée en biocatalyse à cet effet, sinon elle sera soumise à un nouveau cycle de mutagenèse et de criblage (Figure 39).

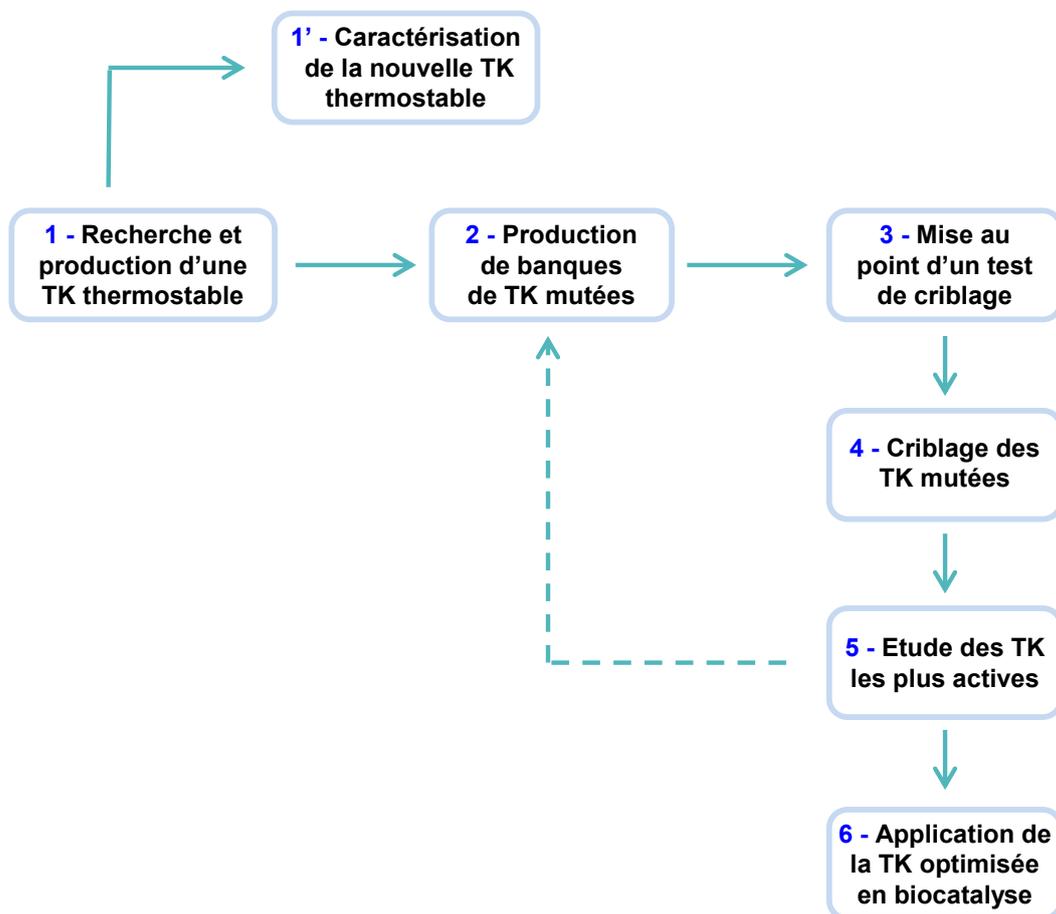


Figure 39 : Stratégie générale du projet

Résultats et Discussion

1. Production et caractérisation d'une nouvelle TK thermostable

1.1. Introduction

Aujourd'hui, les sources communément utilisées pour la production de TK en biocatalyse sont d'origines microbiennes : *S. cerevisiae* et *E. coli*. L'avantage de ces sources est que le clonage des gènes codants pour les TK dans des vecteurs d'expression appropriés, suivi de leur transformation et de leur expression respectivement dans *S. cerevisiae* et dans *E. coli*, permet une production de TK en grandes quantités et offre la possibilité de les purifier par chromatographie d'affinité.

Dans le cadre de notre projet visant à modifier les propriétés de la TK par mutagenèse afin d'élargir son potentiel synthétique, le premier objectif a été de rechercher une nouvelle source microbienne de TK qui soit thermostable et ce pour les raisons suivantes.

Selon les études réalisées par le Pr. F. Arnold et son équipe, les protéines présentant une haute stabilité ont une plus grande capacité d'évolution (concept d'«evolvability»).[133] En effet, cette stabilité accrue permet à la protéine d'accepter des mutations bénéfiques tout en gardant la capacité de se replier dans l'espace dans sa structure d'origine. Les protéines thermostables font partie de la catégorie des protéines particulièrement stables. Elles sont présentes dans les organismes thermophiles, c'est-à-dire capables de se développer à des températures élevées (entre 50°C et 70°C).

Par ailleurs, les enzymes thermostables présentent un grand nombre d'avantages pour leur utilisation en biocatalyse. Par exemple, leur thermostabilité permet d'accroître les cinétiques de réactions en fonction de la température, d'augmenter leur stabilité vis-à-vis de milieux non-conventionnels et peut faciliter leur purification par traitement thermique. Les deux TK communément utilisées en biocatalyse, TK d'*E. coli* et TK de *S. cerevisiae*, ne sont pas considérées comme thermostables.

1.2. Obtention d'une nouvelle TK thermostable

1.2.1. Microorganismes thermophiles comme sources potentielles de TK

Le projet vise à modifier la spécificité de substrat d'une nouvelle TK thermostable selon des méthodes rationnelles, c'est-à-dire basées sur la connaissance de la structure 3D et du site actif. La nouvelle TK devra donc avoir une très forte homologie de séquences avec une TK dont la structure 3D est déjà connue, afin de construire un modèle qui nous permettra d'identifier les positions ou les séquences clés à muter, sans avoir à cristalliser d'emblée cette nouvelle protéine. Notre choix s'est porté sur le genre *Bacillus* pour deux raisons : d'une part ce genre comporte des micro-organismes thermophiles et d'autre part la TK de *Bacillus anthracis* a déjà été identifiée et sa structure 3D résolue récemment (dépôt PDB : 3M49). Nous avons donc choisi comme sources potentielles de TK thermostable deux micro-organismes thermophiles appartenant au même genre taxonomique que *B. anthracis* et disponibles dans la collection du Génoscope (Evry) avec lequel nous collaborons dans le cadre de ce projet. Ces sources sont : *Geobacillus thermodenitrificans* et *Geobacillus stearothermophilus*.

Ces deux bactéries thermophiles à Gram positif sont largement répandues dans le sol, dans les sources chaudes et dans les sédiments océaniques et peuvent se développer dans des milieux de 30°C à 75°C.[134-136] Ces deux souches ont déjà été employées pour la production d'enzymes thermostables telles que la xylanase,[137] la L-arabinose isomérase,[138, 139] des glycosidases[140] ou encore des alcool déshydrogénases.[141]

1.2.2. Production de TK_{gst} et TK_{gth}

Pour la production des TK de *G. Thermodenitrificans* (TK_{gth}) et de *G. Stearothermophilus* (TK_{gst}), la mise en évidence des gènes, le clonage et la surexpression des TK ont été réalisées par notre partenaire, le Génoscope, CEA, d'Evry, puis la culture et la purification des souches ont été réalisées au laboratoire.

1.2.2.1. Identification des gènes par homologie de séquence

Les microorganismes *E. coli*, *S. cerevisiae* et *B. anthracis* possèdent deux isoenzymes de la TK : TKTA/TKTB chez *E. coli*, TKL1/TKL2 chez *S. cerevisiae* et TK1/TK2 chez *B. anthracis*. Les séquences protéiques et les structures 3D (structures dimériques) correspondants aux TK issues de ces trois micro-organismes montrent une très forte homologie. La TKTA d'*E. coli* et la TKL1 de levure sont les isoenzymes les plus actives et les plus utilisées en biocatalyse. Les TK1 et TK2 de *B. anthracis* n'ont pas été surexprimées ni utilisées en synthèse organique.

Le(s) gène(s) de TK de *G. stearothermophilus* (TK_{gst}) n'étant pas identifié(s) dans les bases de données publiques, la séquence génomique de la souche 10 de *G. stearothermophilus*, disponible sur le serveur BLAST de l'université de l'Oklahoma, a été utilisée afin de trouver un gène orthologue au gène connu *tkt1* de *B. anthracis*. L'analyse du génome de *G. stearothermophilus* n'a révélé qu'un seul gène *tkt*, ce qui laisse supposer que cet organisme ne contient qu'une seule enzyme TK. Dans le cas *G. thermodenitrificans*, un gène *tkt* de TK était déjà identifié.[142]

L'identité de séquence nucléotidique a été calculée entre les gènes codants pour la TK_{gst}, la TK_{gth}, la TK2 de *B. anthracis* (TK_{ban}), la TKTA d'*E. coli* (TK_{eco}) et la TKL1 de *S. cerevisiae* (TK_{sce}) et confirme la forte identité attendue entre les gènes codants pour les TK appartenant au même genre taxonomique : 74% d'identité entre les gènes codant pour les TK_{gth} et TK_{ban}, et également 74% entre les gènes codant pour les TK_{gst} et TK_{ban} (Tableau 6).

	TK _{gth}	TK _{ban}	TK _{eco}	TK _{sce}
TK _{gst}	94 %	74 %	51 %	48 %
TK _{gth}		74 %	51 %	48 %
TK _{ban}			51 %	47 %
TK _{eco}				46 %

Tableau 6: Pourcentages d'identité au niveau des séquences nucléotidiques entre les gènes codant pour les TK_{gst}, TK_{gth}, TK_{ban}, TK_{eco} et TK_{sce}

Par ailleurs, l'alignement des séquences protéiques de ces TK montre une forte homologie (Figure 40).

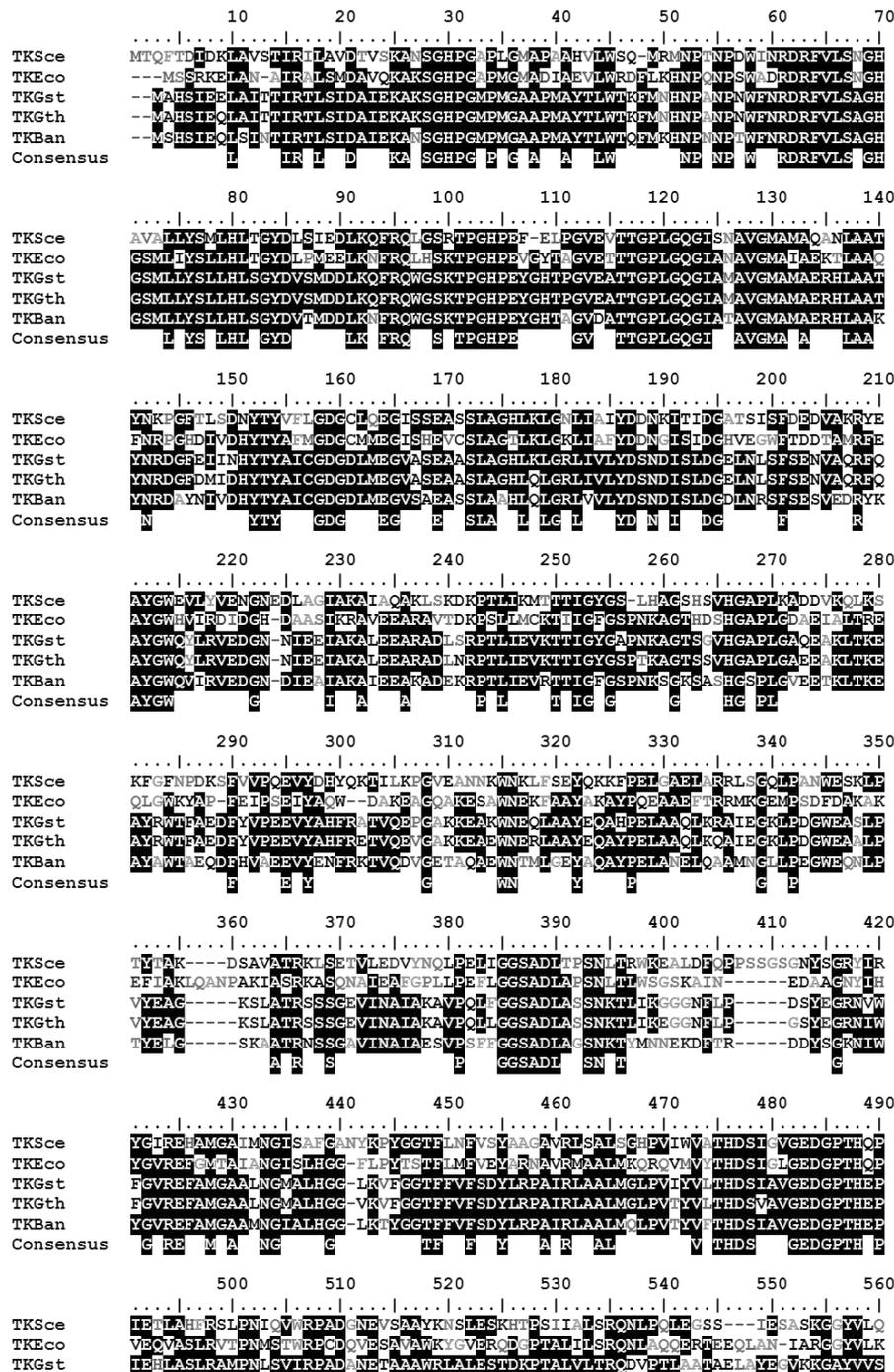


Figure 40 : Alignement des séquences protéiques des TK_{gst}, TK_{gth}, TK_{ban}, TK_{eco} et TK_{sce}
Surlignage noir : Résidus en commun

1.2.2.2. Clonage et Surexpression

Les gènes codant pour les TK sauvages de *G. stearothermophilus* et *G. thermodenitrificans* ont été amplifiés par PCR puis clonés dans le vecteur d'expression pGEN452 dérivé de pET47b (voir la partie expérimentale). Ainsi, l'expression des gènes clonés est sous contrôle

du promoteur T7, permettant la production de la TK en grande quantité. De plus, les TK ont été exprimées avec une étiquette de six histidines (6-His) située aux extrémités N-terminales des enzymes afin de faciliter leur purification par chromatographie d'affinité.

Par ailleurs, dans l'optique de réaliser par la suite des expériences de mutagenèse par cassette, le gène sauvage de TK_{gst} (qui sera sélectionné pour la suite du projet) a été modifié de manière à supprimer certains sites de restriction et en ajouter de nouveaux aux positions choisies, qui permettront d'introduire les mutations aux positions choisies. Cette opération a conduit au changement de trois acides aminés dans la protéine : Leu397Phe, Asp399Gly et His479Gln. Ces résidus étant situés loin du site actif, ils ne devraient *a priori* pas avoir d'influence sur l'activité enzymatique. Le nouveau gène a été commandé à l'entreprise DSMZ qui en a réalisé la synthèse, puis il a été cloné dans le vecteur d'expression pGEN452, conduisant à une nouvelle TK modifiée de *G. stearothermophilus* (mTK_{gst}).

Après transformation des gènes dans la souche d'*E. coli* BL21DE3, les cellules exprimant les TK sont cultivées dans notre laboratoire dans un milieu approprié (voir partie expérimentale) puis recueillies par centrifugation. Elles sont ensuite lysées par sonication à 4°C en présence de tampon. La suspension résultante est centrifugée et le surnageant, correspondant à l'extrait cellulaire soluble (aussi appelé CFE pour « *cell free extract* ») et contenant l'enzyme surexprimée est recueilli pour être purifié.

1.2.2.3. Purification

Les purifications des TK_{gth}, TK_{gst} et mTK_{gst} exprimées avec une étiquette 6-His à leur extrémité N-terminale, ont été réalisées par chromatographie d'affinité en présence de cations métalliques (IMAC) (Figure 41a). L'extrait cellulaire soluble est déposé sur une colonne contenant une résine chargée en ions Ni²⁺, chélatés par l'acide nitriloacétique (résine Ni-NTA). La TK se fixe alors sur la résine par liaison de coordination entre l'étiquette 6-His et les cations Ni²⁺ tandis que les autres protéines ne sont pas retenues (Figure 41b). Enfin, la TK est éluée après ajout d'une solution d'imidazole à forte concentration qui permet de déplacer l'équilibre par compétition de ligands. Des études préalables ayant montré que les TK_{sce} et TK_{eco} précipitent en présence prolongée d'imidazole, une étape de dialyse est systématiquement réalisée après la purification, afin de recueillir la TK purifiée sans imidazole.

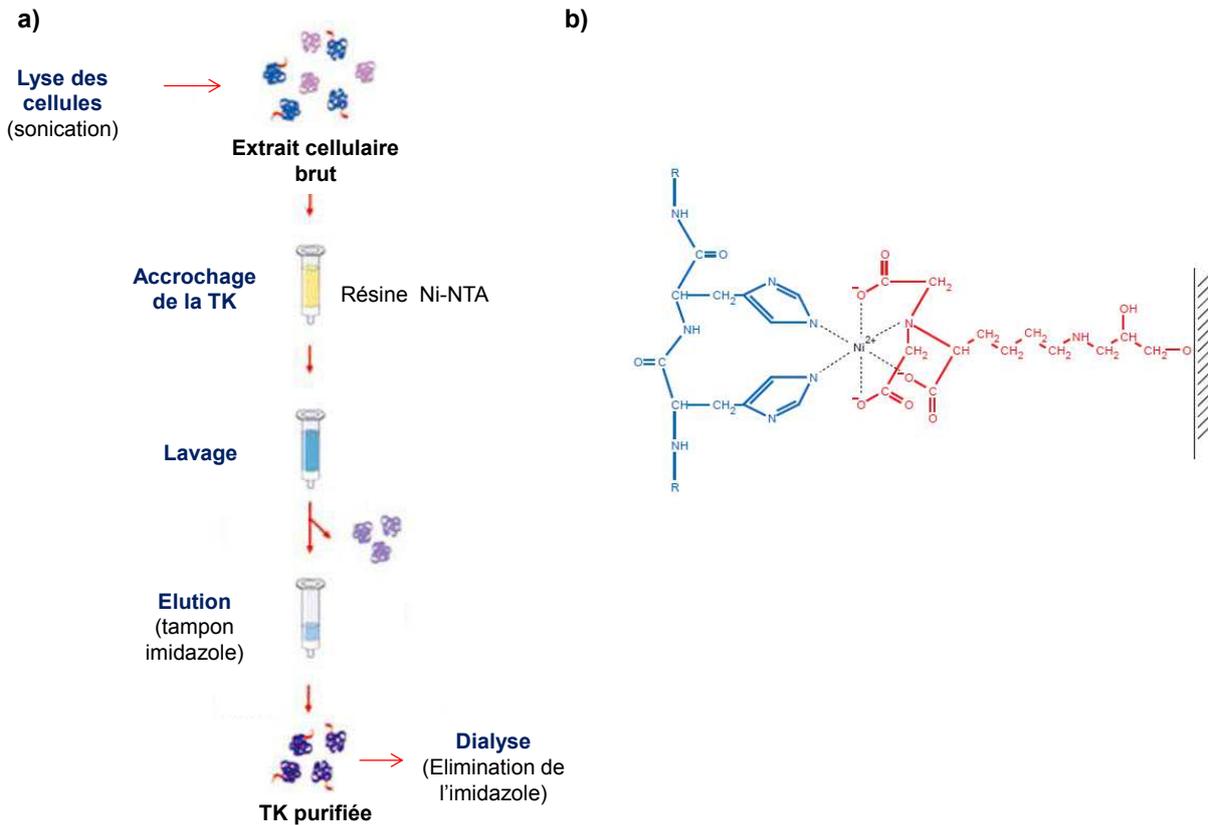


Figure 41 : Purification de la TK par IMAC

a) Principe de la purification ; b) Interaction entre l'étiquette 6-Hist et la matrice Ni-NTA
Schémas extraits du manuel « The QIAexpressionist™ » de la société Qiagen et adaptés à la purification de la TK

La surexpression des TK_{gth}, TK_{gst} et mTK_{gst} et la pureté des extraits purifiés ont été vérifiées par électrophorèses sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (Figure 42). L'électrophorégramme présente une bande unique à environ 74 kDa correspondant au poids moléculaire d'un monomère de TK. La masse d'un monomère de chaque TK a en effet été calculée à partir de la séquence protéique. Elle est de 73,63 kDa (682 résidus) pour la TK_{gth}, de 71,94 kDa (668 résidus) pour la TK_{gst} et 71,91 kDa pour la mTK_{gst} (668 résidus). La TK_{eco} traitée dans les mêmes conditions conduit à un profil similaire, avec une masse de 72,21 kDa.

Les activités enzymatiques des différentes TK ont ainsi été mesurées, avant et après purification et les rendements de la purification ont été calculés pour un litre de culture cellulaire (Tableau 7). Les concentrations en protéines ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) ont été déterminées par le test de Bradford.[143]

TK	Fraction	Activité [U]	Protéines [mg]	Activité spécifique [U/mg]	Rendement [%]
TK _{gth}	CFE	160	720	0,22	
	Purifiée	55	181	0,30	34
TK _{gst}	CFE	110,5	400	0,28	
	Purifiée	60,5	131	0,46	55
mTK _{gst}	CFE	174	580	0,30	
	Purifiée	48,3	104	0,46	28

Tableau 7 : Activités des TK avant et après purification par IMAC à 18°C
Données pour 1 L de culture cellulaire (soit $3,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cellules humides). Les activités sont mesurées dans les conditions types du test_{NADH} à 25°C.

Les TK_{gst} purifiées présentent des activités spécifiques légèrement supérieures à celles de la TK_{gth}. Globalement les activités spécifiques obtenues sont faibles car elles ont été déterminées à 18°C, température ambiante. La suite de l'étude montrera que, comme attendu, ces enzymes étant issues de microorganismes thermophiles, leur activité augmentent avec la température. Il est à souligner que l'activité spécifique de la mTK_{gst} modifiée est identique à celle de la TK_{gst} sauvage ce qui confirme que les trois résidus modifiés de la mTK_{gst} n'ont pas d'incidence sur l'activité enzymatique.

Selon cette procédure de purification, environ 181 mg de TK_{gth}, 131 mg de TK_{gst} et 104 mg de mTK_{gst} purifiées ont été obtenues à partir de 1 L de cultures respectives, contenant environ 3,8 g de cellules. A titre de comparaison, 1 L de culture conduit à 5,4 g de cellules et 425 mg de protéines purifiées dans le cas de la TK_{eco} et à 4 g de cellules et 60 mg de protéines purifiées dans le cas de la TK_{sce}. Après purification, les TK_{gth}, TK_{gst} et mTK_{gst} peuvent être lyophilisées et conservées à 4°C pendant plusieurs mois sans perte d'activité.

1.2.3. Comparaison de la thermostabilité de TK_{gst} et TK_{gth}

La stabilité des différentes TK (TK_{eco}, TK_{sce}, TK_{gth} et TK_{gst}) en fonction de la température a été comparée sur une durée de 90 minutes. Après incubation des TK à respectivement

température ambiante, 50°C et 70°C, des échantillons ont été prélevés au cours du temps, refroidis à 25°C et les activités résiduelles des TK ont été mesurées au moyen du test_{NADH} à 25 °C décrit précédemment (Figure 44).

A température ambiante, toutes les enzymes sont stables durant 90 minutes. A 50 °C, la TK_{sce}, perd rapidement toute son activité (Figure 44a). En revanche, la TK_{eco} reste stable à cette température. Ceci corrobore des résultats récents publiés dans la littérature selon lesquels l'activité de la TK_{eco} augmente en fonction du temps de pré-incubation jusqu'à 1 h, et de la température d'incubation jusqu'à 55°C.[144] La TK_{gth} présente une légère perte d'activité de 20 %, alors que TK_{gst} reste parfaitement stable.

A 70 °C, les deux TK issues de sources non thermophiles, TK_{eco} et TK_{sce} précipitent immédiatement et perdent ainsi toute leur activité. L'inactivation thermique rapide de TK_{sce} au-dessus de 65°C a été démontrée par le Pr. G. Kochetov.[145] alors que TK_{gth} présente une perte d'activité de 40 % au bout d'une heure, TK_{gst} conserve 100 % de son activité au bout de cette même durée (Figure 44).

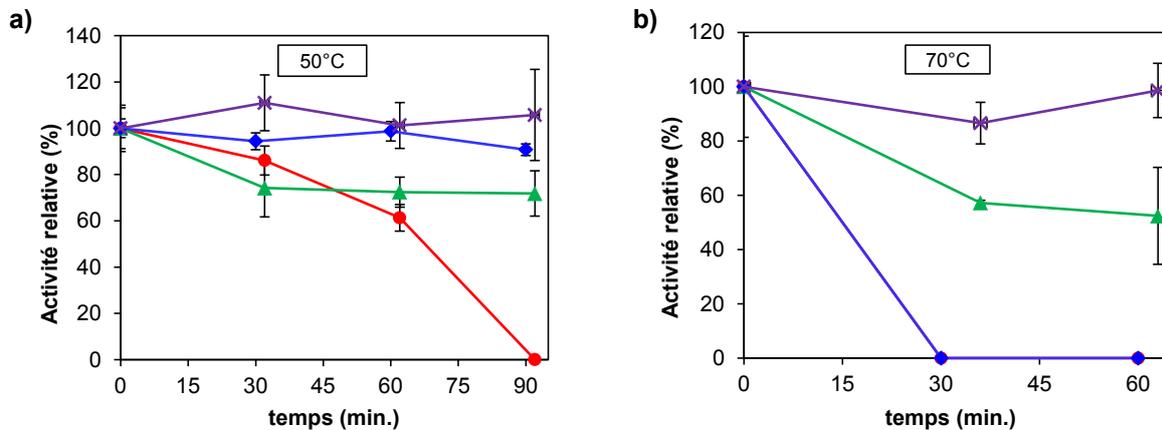


Figure 44 : Thermostabilité des différentes TK au cours du temps.

a) à 50°C ; b) à 70°C ; ◆ TK_{eco}, ● TK_{sce}, ▲ TK_{gth}, × TK_{gst}

Les activités sont mesurées dans les conditions types du test_{NADH} à 25°C.

En conclusion, la TK_{gst} présentant la meilleure thermostabilité, elle a été retenue pour la suite du projet. Pour les raisons pratiques évoquées précédemment en vue des expériences de mutagenèse, ce sera plus précisément sa version modifiée, mTK_{gst}, qui sera utilisée, ces modifications par rapport à la TK_{gst} sauvage n'ayant pas d'incidence sur son activité comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent. Cette TK n'a jamais été décrite auparavant, ainsi une étude de ses propriétés a été réalisée.

1.3. Etude et caractérisation de mTK_{gst}

Nous avons étudié les propriétés biochimiques de mTK_{gst} selon trois aspects principaux. Tout d'abord nous avons voulu connaître ses conditions optimales d'activité (pH, température) et sa tolérance aux conditions extrêmes (hautes températures, solvants non-conventionnels). Puis nous avons examiné sa spécificité de substrat et déterminé les constantes cinétiques ainsi que son facteur d'énantiosélectivité E pour certains de ces substrats. Enfin, nous avons étudié la stéréochimie des produits obtenus en réalisant des synthèses à l'échelle préparative.

1.3.1. Etude de l'activité de mTK_{gst}

1.3.1.1. Etude du pH et de la température optimales

pH optimal

L'effet du pH sur l'activité de mTK_{gst} a été examiné pour des pH compris entre 5 et 9 au moyen du test_{NADH} (Figure 45). Des tampons de différents pK_a ont été utilisés pour couvrir cet intervalle de pH. L'enzyme présente un maximum d'activité pour un pH autour de 7, valeur similaire aux autres TK microbiennes décrites jusqu'ici. En effet, la TK_{eco} présente un pH optimal de 7,0 dans le tampon Tris[144] alors que la TK_{sce} présente un pH optimal de 7,5 (levure de boulanger) et 7,6 (levure de bière) dans le tampon phosphate.[146, 147]

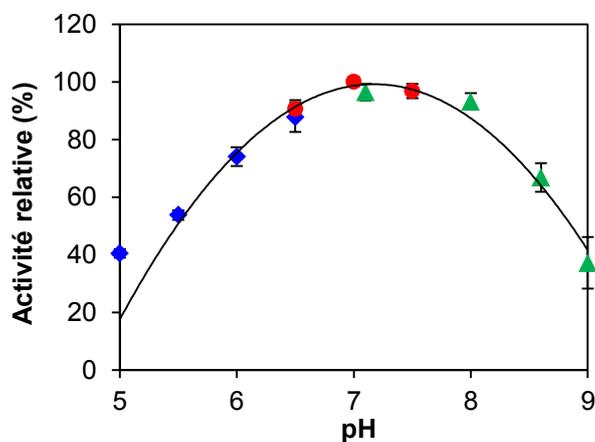


Figure 45 : Profil de l'activité de mTK_{gst} en fonction du pH

◆ Tampon MES (pK_a 6,15), ● Tampon Tris (pK_a 7,2), ▲ Tampon Gly-gly (pK_a 8,17)

Température optimale

L'influence de la température sur l'activité de la TK a été mesurée sur un intervalle de 20°C à 75 °C. Le test_{NADH} a été utilisé, et la quantité de l'enzyme auxiliaire (ADH) a été triplée pour les températures au-delà de 50°C pour pallier à sa dégradation durant la durée du test (5 minutes). Le tampon Tris s'est révélé être le tampon de choix pour cette expérience, le tampon Gly-gly présentant une coloration jaune à haute température.

La température optimale de mTK_{gst} se situe autour de 70°C. Le profil d'activité présente une forte augmentation entre 20°C (0,9 U/mg) et 70°C (11 U/mg), puis une perte brutale de l'activité au-dessus de 70°C. La température optimale observée pour mTK_{gst} est très supérieure à celles des autres TK microbiennes étudiées jusqu'alors et qui sont utilisées à la température ambiante. Par exemple, la TK_{eco} présente une activité optimale sur une large plage de température entre 20°C et 40°C.[24]

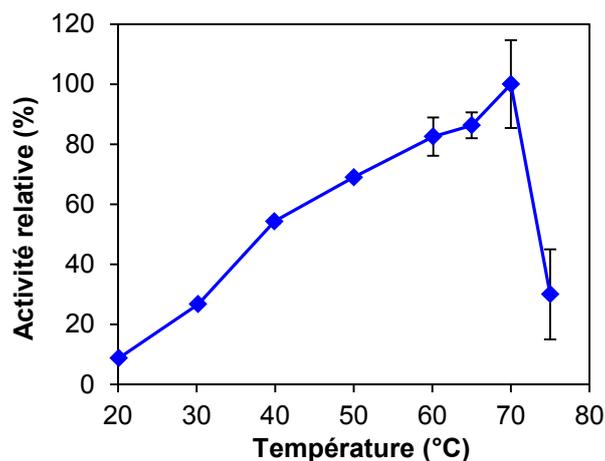


Figure 46 : Profil de l'activité de mTK_{gst} en fonction de la température

Les activités sont mesurées dans les conditions du test_{NADH} à différentes températures, avec 75 U/mL d'ADH au-delà de 50 °C et dans le tampon Tris (0,1 M, pH 7,5). L'activité maximale (100%) obtenue à 70°C correspond à une activité spécifique de 11 U.mg⁻¹. A 20°C, l'activité spécifique est de 0,9 U.mg⁻¹.

Remarque : Si l'activité de TK_{eco} est constante sur une large gamme de température autour de la température ambiante, une faible variation de température peut en revanche engendrer une très grande variation de l'activité de mTK_{gst}. Par exemple, celle-ci varie d'un facteur 3 entre 20°C et 30°C. Ainsi, lorsque l'activité de mTK_{gst} a été mesurée à la température ambiante dans le cadre de différentes expériences, des variations d'activité spécifiques de mTK_{gst} ont été observées d'une fois à l'autre, allant de 0,5 à 4 U/mg, du fait de la variation de la température ambiante.

1.3.1.2. Etude de la thermostabilité au cours du temps

La thermostabilité de mTK_{gst} a été étudiée jusqu'à 85 °C. La Figure 47 montre que mTK_{gst} est parfaitement stable durant 2h jusqu'à 70°C mais que son activité chute très rapidement au-delà de cette température. Une étude sur une plus longue durée a montré que mTK_{gst} conserve 100 % de son activité pendant au moins 7 jours à 50°C et pendant 3 jours à 65°C.

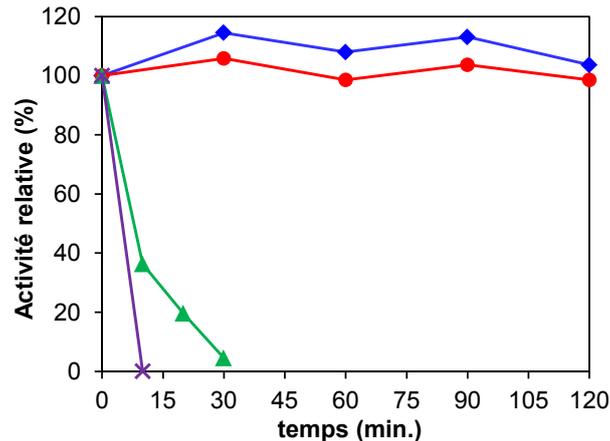


Figure 47 : Thermostabilité de mTK_{gst} au cours du temps

Les activités résiduelles sont mesurées dans les conditions types du test_{NADH} à 25°C. 100 % représente l'activité initiale de mTK_{gst} (0,9 U/mg à 20°C). Températures d'incubation :

◆ 50°C, ● 70°C, ▲ 75°C, × 85°C.

Remarque : L'activité de mTK_{gst} diminuant drastiquement au-delà de 70°C, la température de 65°C sera choisie pour la suite de l'étude, afin de ne pas risquer de dépasser cette température et « perdre » l'activité enzymatique.

Purification par traitement thermique

Forts des résultats confirmant la stabilité de mTK_{gst} à haute température, nous avons envisagé une technique alternative pour sa purification : le traitement thermique. Cette technique, jusqu'alors impossible avec les TK_{eco} et TK_{sce} , consiste à chauffer l'extrait cellulaire durant 45 minutes à 65°C. Les protéines issues de la cellule hôte (*E. coli*) précipitent à cette température, alors que la TK thermostable reste en solution. Une étape de centrifugation permet d'éliminer les protéines précipitées et les débris cellulaires. Le surnageant contient alors la mTK_{gst} purifiée. Le tampon choisi pour la lyse peut être directement le tampon d'intérêt, ainsi l'étape supplémentaire de dialyse n'est pas nécessaire

ici. Cette technique est beaucoup plus rapide et simple à mettre en œuvre et conduit à un rendement très proche de celui obtenu par purification via IMAC (Tableau 8).

Fraction	Activité [U]	Protéines [mg]	Activité spécifique [U/mg]	Rendement [%]
CFE	180	600	0,30	
Purifiée par IMAC	140	160	0,88	78
Purifiée par traitement thermique	112	132	0,85	62

Tableau 8 : Purification de mTK_{gst} par IMAC et par traitement thermique
Les activités ont été mesurées dans les conditions du test_{NADH}, à 20°C.

De plus la pureté de la mTK_{gst} purifiée par choc thermique a été évaluée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (Figure 48).

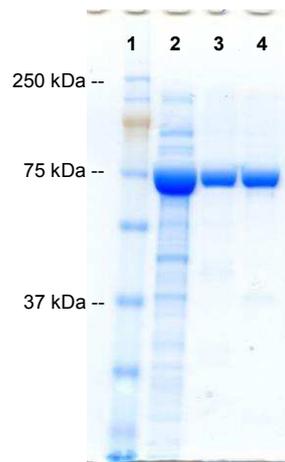


Figure 48 : Electrophorèse en conditions dénaturantes de mTK_{gst} purifiée par IMAC et par traitement thermique

1) See-blue® Plus2 Pre-stained Standard ; 2) mTK_{gst} avant purification ; 3) mTK_{gst} purifiée par IMAC ; 4) mTK_{gst} purifiée par traitement thermique

1.3.1.3. Etude de la stabilité de mTK_{gst} en présence de co-solvants

En présence de co-solvants organiques

La stabilité thermique d'une enzyme va souvent de pair avec une tolérance aux solvants non-conventionnels.[148] Dans l'optique d'utiliser la TK en présence de substrats accepteurs hydrophobes peu ou pas solubles dans l'eau, la stabilité de mTK_{gst} a été examinée en présence de différents solvants organiques. Ces travaux ont fait partie du stage de Master 1 de C. Bertrand que j'ai encadré.

Des co-solvants miscibles dans l'eau ont été choisis : le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diméthylformamide (DMF), le ter-butanol (tBuOH) et l'acétonitrile (ACN), en mélange dans différentes proportions dans une solution aqueuse de tampon Gly-gly 50 mM, pH 7,5. Une étude préliminaire de la solubilité de l'hydroxypyruvate sous forme de sel de lithium (Li-HPA) qui est le substrat donneur utilisé dans les réactions de synthèse à l'échelle préparative, a tout d'abord été réalisée en fonction de la nature des co-solvants et de leur proportion dans l'eau. Les résultats ont montré que Li-HPA à une concentration de 50 mM était soluble dans tous ces co-solvants jusqu'à une proportion volumique d'au moins 50 % dans le tampon.

En tenant compte de ce résultat, la mTK_{gst} a ensuite été étudiée dans des mélanges co-solvant-eau tamponnée en faisant varier trois paramètres : la concentration des co-solvants dans l'eau contenant le tampon Gly-gly (de 0 % à 50 % v/v), la température d'incubation (température ambiante et 50°C) et la nature du co-solvant. Des prélèvements au cours du temps (de 0 à 24 h) ont été effectués afin de déterminer l'activité enzymatique résiduelle au moyen du test_{NADH}.

La Figure 49 montre les résultats obtenus pour une concentration maximale en co-solvant (50 %) et pour une incubation à température ambiante. La TK_{eco} n'est stable que dans l'eau, présente 13 % d'activité résiduelle dans le DMSO après 3 h d'incubation et perd immédiatement toute activité dans le DMF, le t-BuOH et l'ACN. La mTK_{gst} au contraire tolère parfaitement tous les co-solvants et garde 100 % d'activité après 3 h d'incubation (Figure 49a). Ce qui est plus remarquable encore est que mTK_{gst} conserve une activité non-négligeable dans ces co-solvants même après 24 h (Figure 49b). Elle est particulièrement stable dans le DMSO et le DMF (respectivement 100 % et 90 % d'activités résiduelles) et un peu moins dans le t-BuOH et l'ACN (respectivement 67 % et 45 % d'activités résiduelles).

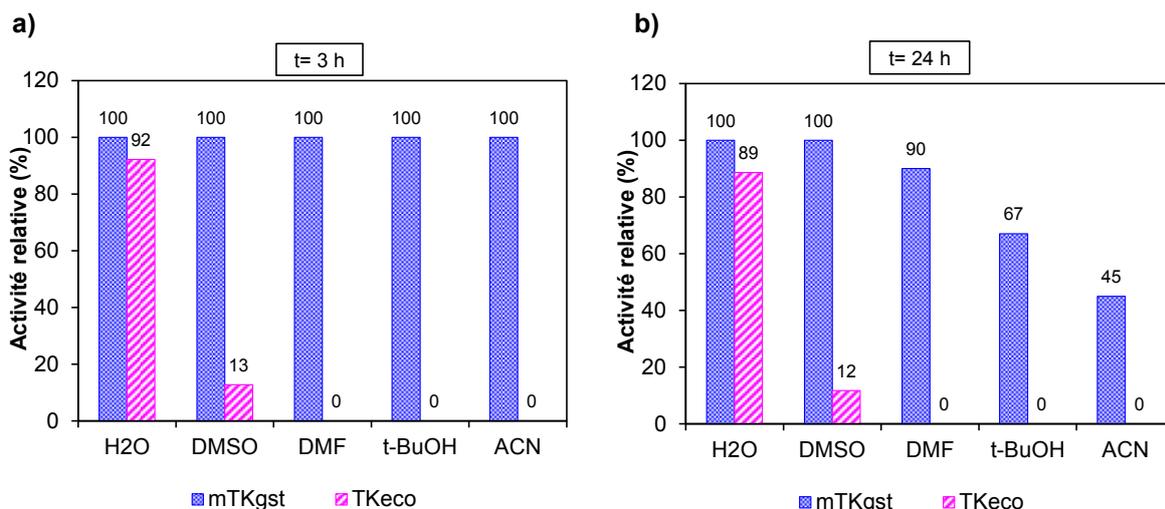


Figure 49 : Activités résiduelles de mTK_{gst} et TK_{eco} après incubation dans 50% de cosolvant à température ambiante

Les activités sont mesurées dans les conditions types du test_{NADH}. **a)** Après 3 h d'incubation; **b)** Après 24 h d'incubation

En revanche, l'étude similaire réalisée à une température d'incubation de 50 °C montre que mTK_{gst} perd une grande partie de son activité dans tous les co-solvants après 3 h d'incubation (Figure 50a) et ne conserve une activité non-négligeable après 24 h que dans le DMSO (Figure 50b).

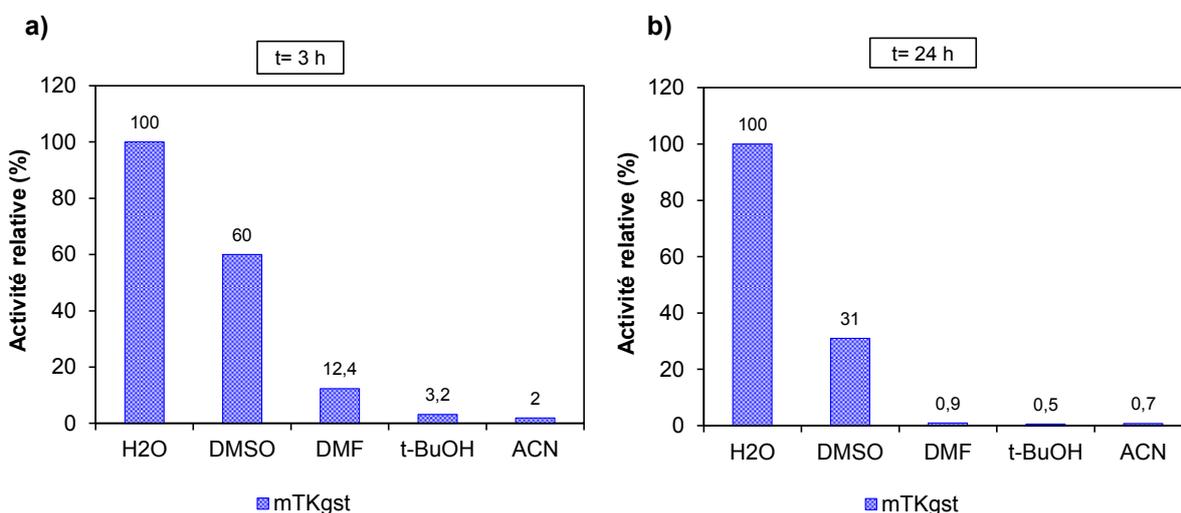


Figure 50 : Activités résiduelles de mTK_{gst} après incubation dans 50% de cosolvant à 50 °C

Les activités sont mesurées dans les conditions types du test_{NADH}. **a)** Après 3 h d'incubation; **b)** Après 24 h d'incubation

Dans le but d'utiliser les cosolvants en synthèse à 50 °C, leur proportion a été réduite (Figure 51). Ainsi, l'expérience a montré la mTK_{gst} est parfaitement stable dans 20% de DMSO ou de DMF à 50 °C après 24 h.

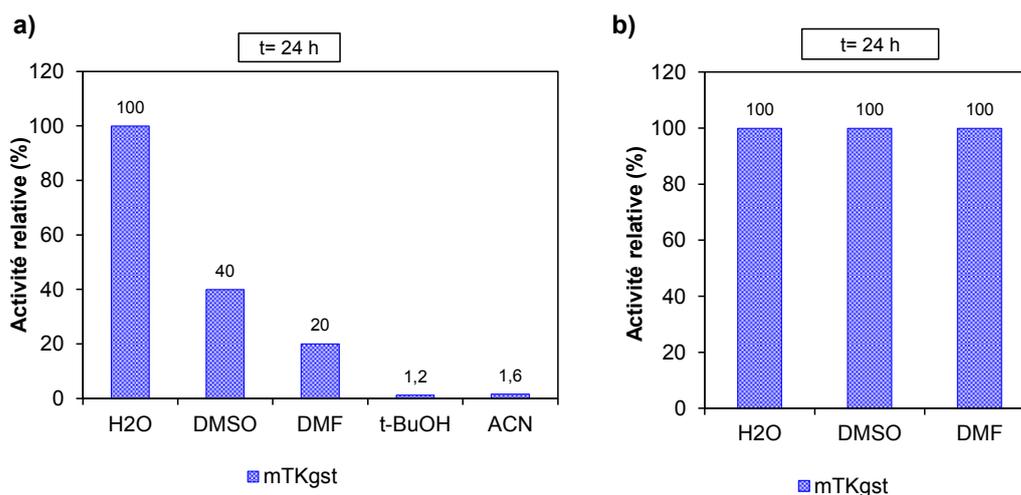


Figure 51 : Activités résiduelles de mTK_{gst} après incubation à 50 °C dans 30 % ou 20 % de cosolvant

Les activités résiduelles sont mesurées dans les conditions types du test_{NADH}. **a)** 30 % de co-solvant; **b)** 20 % de co-solvant

La tolérance de la mTK_{gst} vis-à-vis des co-solvants par rapport à celle de la TK_{eco} en fait un atout certain pour son utilisation en synthèse et notamment en présence de substrats accepteurs hydrophobes, peu ou pas solubles dans l'eau. Pour des synthèses à température ambiante et sur des temps courts (3 h), le t-BuOH et l'ACN pourront être employés, car ils peuvent être facilement éliminés ensuite par évaporation. Pour les réactions nécessitant d'être effectuées sur une plus longue durée ou à plus haute température, le DMSO ou le DMF à 20% pourront être employés car ils n'affectent pas l'activité de mTK_{gst}.

En présence de liquides ioniques

Suite aux résultats encourageants concernant la stabilité de mTK_{gst} dans les co-solvants organiques, l'étude a été élargie aux liquides ioniques. L'utilisation de liquides ioniques présente un certain nombre d'avantages en synthèse organique : leur faible tension de vapeur en font des solvants dits « verts » et ils permettent dans certains cas d'augmenter la sélectivité et les vitesses de réaction d'une enzyme.[149] Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le Dr. T. Moreau, durant son stage post-doctoral dans notre équipe.

Quatre liquides ioniques qui diffèrent par la nature des cations et des anions ont été choisis afin d'obtenir un milieu monophasique (Tableau 9).

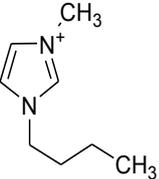
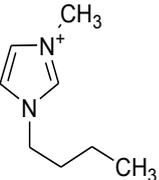
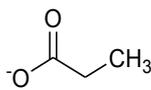
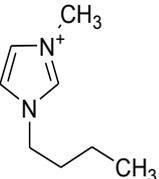
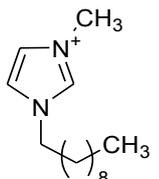
Liquide ionique	Cation	Anion
Chlorure de 1-Butyl-3-méthylimidazolium ([BMIM]Cl)		Cl ⁻
Acétate de 1-Butyl-3-méthylimidazolium ([BMIM]OAc)		
Tetrafluoroborate de 1-Butyl-3-méthylimidazolium ([BMIM]BF ₄)		BF ₄ ⁻
Chlorure de 1-décyl-3-méthylimidazolium ([C10MIM]Cl)		Cl ⁻

Tableau 9 : Liquides ioniques hydrophiles testés comme co-solvants pour la mTK_{gst}

La stabilité de la mTK_{gst} a été testée en présence de ces quatre liquides ioniques, dans différentes proportions dans une solution aqueuse de tampon Gly-gly 50 mM, et comparée à celle de la TK_{eco} dans les mêmes conditions. Le test_{NADH} a été employé ici, une fois vérifiée la stabilité de l'enzyme auxiliaire (ADH) dans ces conditions. Le chlorure de 1-Butyl-3-méthylimidazolium [BMIM]Cl, s'est avéré être le liquide ionique le plus favorable pour maintenir l'activité de la mTK_{gst}: celle-ci conserve près de 80% de son activité après 16 h d'incubation dans une solution à 60 % de ce liquide ionique (Figure 52). En revanche, la TK_{eco} perd son activité au-delà de 36 % en [BMIM]Cl.

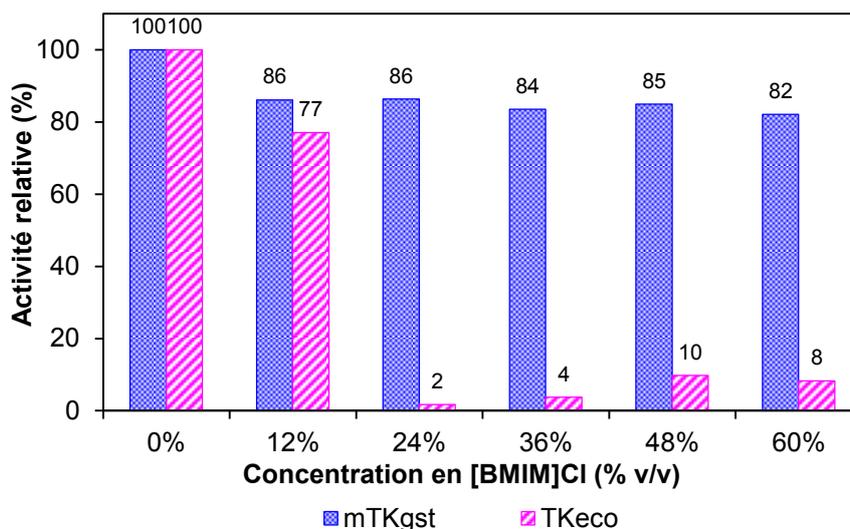


Figure 52 : Activités résiduelles de mTK_{gst} et TK_{eco} après 16h d'incubation dans différentes concentrations de [BMIM]Cl

Les activités sont mesurées dans les conditions types du test_{NADH}.

La remarquable tolérance de la mTK_{gst} aux fortes concentrations en [BMIM]Cl permettra potentiellement d'augmenter la solubilité et l'activité de certains substrats de mTK_{gst}. L'étude de l'activité de mTK_{gst} vis-à-vis d'un éventail de substrats hydrophiles et hydrophobes en présence de liquides ioniques est en cours dans notre laboratoire et fait l'objet d'un autre projet financé par l'ANR.

1.3.1.4. Détermination des constantes cinétiques vis-à-vis du L-érythrulose et du D-ribose-5-phosphate

Deux constantes cinétiques permettent de caractériser une réaction enzymatique. La constante de Michaelis-Menten, K_M , reflète l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Elle est d'autant plus forte que le K_M est petit. Elle correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est à la moitié de la vitesse initiale maximale (V_{max}). La vitesse maximale V_{max} correspond à la vitesse de transformation d'un substrat par une enzyme en présence d'une concentration saturante de substrat. Au-delà de cette concentration saturante de substrat, la vitesse de la réaction enzymatique atteint un maximum. Enfin, le rapport V_{max}/K_M permet de mesurer l'efficacité de l'enzyme pour un substrat. Plus sa valeur est élevée, meilleur est le substrat.

Ces constantes cinétiques ont été déterminées pour la mTK_{gst} avec les substrats intervenant dans le test d'activité, à 25 °C et à 50 °C. Pour cela, les vitesses de réaction ont été

mesurées en fonction de la concentration en substrat. A titre d'exemple, les courbes correspondantes sont présentées pour le L-érythrose à 25 °C (Figure 53). La Figure 53a montre que la cinétique de réaction est du type Michaelis-Menten. La représentation de Hanes-Woolf correspondante (rapport vitesse/concentration en fonction de la concentration en substrat) donne en effet une droite (Figure 53b). La méthode de Hanes-Woolf a permis de déterminer les valeurs respectives de la constante de Michaelis K_M et la vitesse maximale V_{max} .

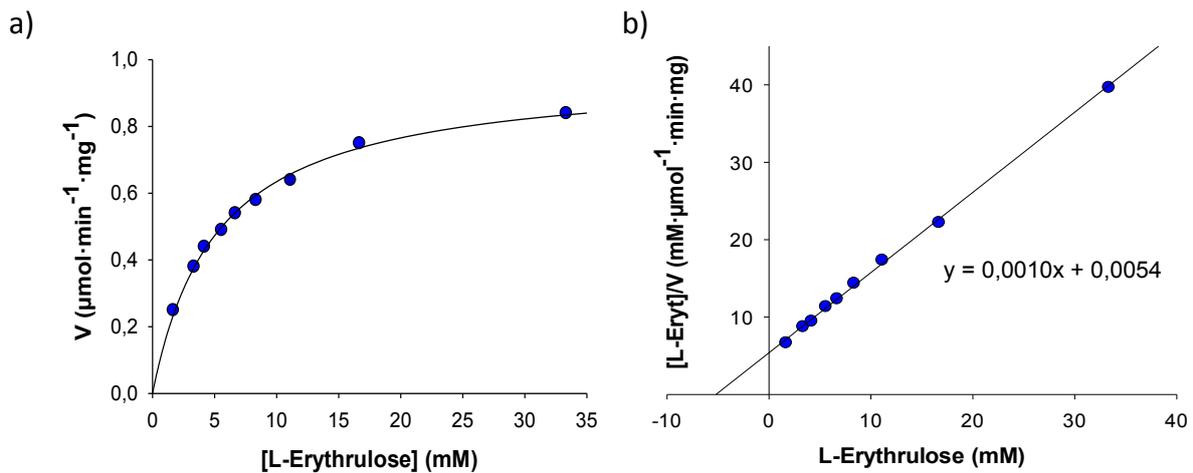


Figure 53 : Courbes cinétiques pour le substrat L-érythrose de mTK_{gst} à 25 °C
 a) Courbe de Michaelis-Menten b) Représentation de Hanes-Woolf

A 25°C, la valeur du K_M calculée pour le L-érythrose (pour une concentration en D-R5P fixée à 50 mM) est de $5,2 \pm 0,2$ mM et son V_{max} de $0,97 \pm 0,02$ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Tableau 10). Pour le D-R5P le K_M est de $0,20 \pm 0,03$ mM et le V_{max} est de $1,01 \pm 0,03$ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (avec une concentration en L-érythrose fixée à 90 mM).

TK	T [°C]	L-Erythrose			D-Ribose-5-P		
		K_M [mM]	V_{max} [$\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$]	V_{max}/K_M [$\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{mM}$]	K_M [mM]	V_{max} [$\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$]	V_{max}/K_M [$\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{mM}$]
mTK_{gst}	25 °C	$5,2 \pm 0,2$	$0,97 \pm 0,02$	0,2	$0,20 \pm 0,03$	$1,01 \pm 0,03$	5,1
	50 °C	$8,0 \pm 0,7$	$6,6 \pm 0,1$	0,8	$0,13 \pm 0,09$	$8,4 \pm 0,2$	64,8
TK_{eco}	25 °C	$17,6 \pm 1,5$	$12,3 \pm 1,0$	0,7	1,4	50,4	36,0

Tableau 10 : Paramètres cinétiques de mTK_{gst} et TK_{eco} en fonction de la température

A 50 °C, les K_M restent très proches tandis que les V_{max} augmentent significativement : d'un facteur d'environ 7 pour le L-érythrose et d'environ 8 pour le D-R5P. La sensibilité du test diminuant avec l'augmentation de la température, les paramètres cinétiques de ces substrats n'ont pu être déterminés à la température optimale de l'enzyme.

Enfin, nous avons comparé ces données à celles de la TK_{eco} . Les K_M sont très proches pour les deux TK. Les paramètres cinétiques du L-érythrose ont été déterminés dans les mêmes conditions et ceux du D-R5P étaient reportés dans la littérature.[24] Pour le L-érythrose les rapports V_{max}/K_M augmentent d'un facteur 4 pour mTK_{gst} entre 25 °C et 50 °C ce qui indique une efficacité catalytique de cette enzyme à 50°C (0,8) du même ordre que celle de TK_{eco} à 25 °C (0,7). Pour le D-ribose-5-phosphate, ce même rapport augmente d'un facteur 13 environ ce qui se traduit par une efficacité catalytique de mTK_{gst} à 50 °C (64,8) deux fois supérieure à celle de TK_{eco} à 25°C (36).

1.3.2. Etude de la spécificité de substrat de mTK_{gst}

La spécificité de substrat des TK_{sce} et TK_{eco} a été largement décrite dans la littérature et les vitesses relatives comme les constantes cinétiques, déterminées pour des substrats physiologiques ou non, montrent un comportement semblable de ces deux enzymes.[24, 51-53] Nous avons donc envisagé de réaliser une étude similaire pour mTK_{gst} et ainsi de comparer les résultats avec ces deux TK. Pour cela, nous avons dans un premier temps déterminé les vitesses relatives de mTK_{gst} vis-à-vis d'un ensemble de substrats accepteurs testés avec les TK_{sce} et TK_{eco} . De plus, l'influence de la température sur ces vitesses relatives a été étudiée ici. Dans un second temps, nous avons déterminé les constantes cinétiques de la TK_{gst} vis-à-vis de quelques-uns de ces substrats pour leur utilisation en synthèse.

Les études vis-à-vis des substrats accepteurs sont réalisées en vue d'utiliser la mTK_{gst} dans des réactions de synthèse. Dans ce cadre, le substrat donneur utilisé est toujours l'hydroxypyruvate sous forme de sel de lithium (Li-HPA) car il rend la réaction irréversible (Figure 54).

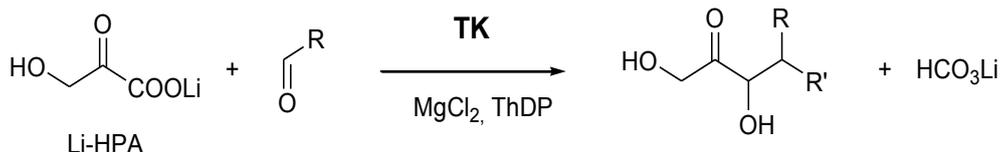


Figure 54 : Réaction catalysée par la TK en présence du Li-HPA

La détermination du K_M du Li-HPA vis-à-vis de la mTK_{gst} et l'étude de la stabilité de ce substrat à différentes températures est donc un prérequis à toutes les études ultérieures utilisant ce substrat.

1.3.2.1. Etudes préliminaires sur le Li-HPA

Stabilité du Li-HPA en fonction de la température et du tampon

Nous avons étudié la stabilité du Li-HPA seul à 20°C, 50°C et 65°C durant une heure dans l'eau et dans différents tampons à 50 mM et à pH 7,5 : glycylglycine (Gly-gly, pK_a 8,17), triéthanolamine (TEA, pK_a 7,8), acide 2-[4-(2-hydroxyéthyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonique (HEPES, pK_a 7,48) et enfin phosphate de potassium monobasique (pK_a 6.82) (Figure 55). A 20°C, le Li-HPA est stable dans l'eau et dans tous les tampons (Figure 55a). En revanche à 50°C il se dégrade rapidement dans l'HEPES (Figure 55b), et à 65°C, il n'est plus stable que dans l'eau pure (Figure 55c). A haute température, le tampon Gly-gly apparaît être le tampon le plus favorable à la stabilité du Li-HPA, mise à part l'eau pure.

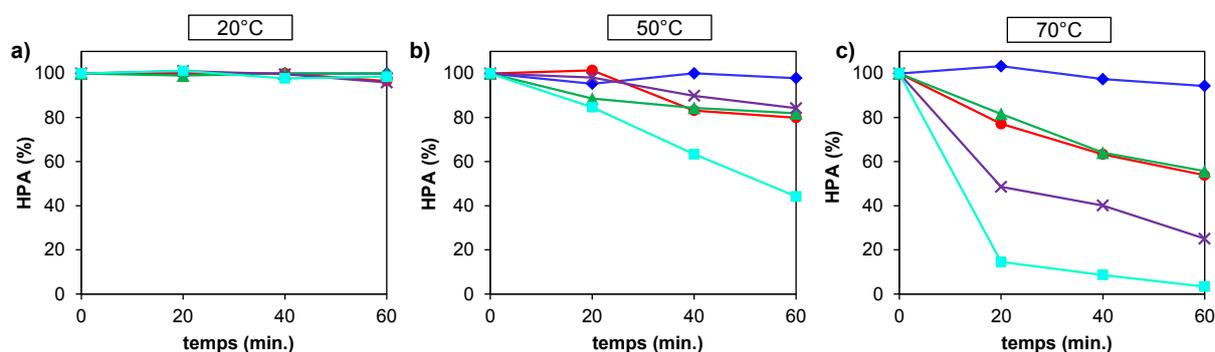


Figure 55 : Stabilité du Li-HPA en fonction de la température

a) à 20°C ; b) à 50°C ; c) à 70°C ; ♦ H₂O, ● TEA, ▲ Gly-gly, × KH₂PO₄, ■ HEPES

La stabilité du Li-HPA dans les conditions de la réaction, c'est-à-dire en présence de la TK et de ses cofacteurs, a ensuite été étudiée dans le tampon Gly-gly (Figure 56). La présence de

TK dans le milieu accroît la vitesse de dégradation du HPA, même sans ajout du substrat accepteur. Ce phénomène a déjà été reporté dans la littérature.[54] La décarboxylation du Li-HPA en milieu tamponné ou catalysée par la TK libèrerait du glycolaldéhyde qui réagirait alors comme substrat accepteur de la TK, conduisant à la formation de L-érythrose. Cette réaction parasite de décomposition du Li-HPA en présence de TK, négligeable à température ambiante, est fortement accrue à température plus élevée. Pour notre part, nous n'avons pas isolé d'érythrose. Il sera nécessaire d'étudier ultérieurement la dégradation du Li-HPA en présence de TK ou de tampon afin de caractériser les sous-produits formés. La RMN *in situ* ou HPLC couplée à la spectrométrie de masse pourront par exemple être utilisées dans ce but.

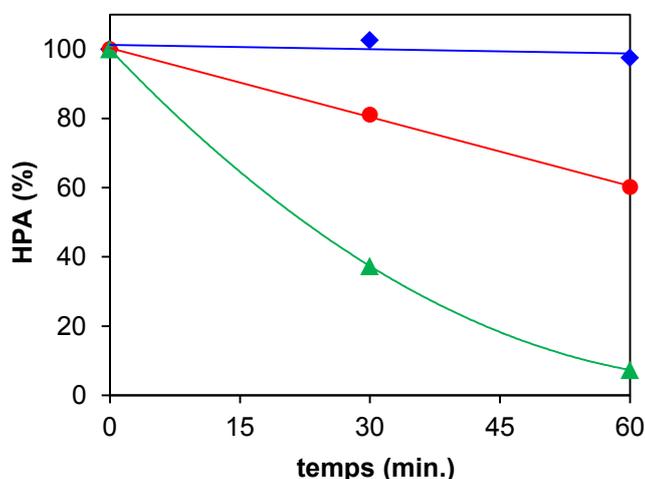


Figure 56 : Stabilité du Li-HPA en présence de mTK_{gst} en fonction de la température

◆ 20°C, ● 50°C, ▲ 70°C

Ainsi, étant donnée l'instabilité du Li-HPA dans les milieux tamponnés au-delà de la température ambiante, les synthèses à l'échelle préparative avec la mTK_{gst} seront effectuées dans l'eau, à 50°C ou moins, et l'augmentation du pH durant l'avancement de la réaction sera compensée au moyen d'un pH-stat. Pour des raisons pratiques, l'étude des vitesses vis-à-vis des aldéhydes pourra néanmoins être réalisée dans le tampon Gly-gly, à condition de travailler sur des temps courts, à une température inférieure à 50 °C et en prenant en compte la dégradation du Li-HPA sans aldéhyde.

Constantes cinétiques du Li-HPA

Les paramètres cinétiques du Li-HPA, substrat donneur ont été étudiés en vue de son utilisation dans les réactions. La mesure des vitesses initiales a été effectuée par dosage

indirect du Li-HPA. Différentes concentrations de Li-HPA ont été mises en réaction en présence de la mTK_{gst} , des cofacteurs (ThDP et Mg^{2+}), du tampon Gly-gly (50mM, pH 7,5) et avec le glycolaldéhyde (50 mM) comme substrat accepteur. Des échantillons du milieu réactionnel ont été prélevés au cours du temps et la concentration du Li-HPA résiduel a été déterminée en présence de LDH et de NADH (Figure 58).

La TK_{gst} présente une cinétique de type Michaelis-Menten vis-à-vis du HPA. Un traitement selon Hanes-Woolf a permis de calculer un K_M de $2,5 \pm 0,2$ mM et un V_{max} de 135 ± 7 U.mg⁻¹ à 25°C (Tableau 11). Ce K_M vis-à-vis du Li-HPA est bien meilleur que celui de la TK_{eco} (18 mM) et de la TK_{sce} (33 mM).[24]

	K_M [mM]	V_{max} [U.mg ⁻¹]	V_{max}/K_M [U.mg ⁻¹ .mM]
mTK_{gst}	2,5	135	54
TK_{eco}	18	60	3
TK_{sce}	33	-	-

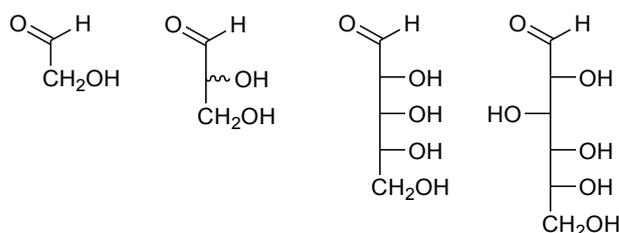
Tableau 11 : Constantes cinétiques du Li-HPA pour TK_{gst} , TK_{eco} et TK_{sce} à 25 °C

Malheureusement, la dégradation de Li-HPA en milieu tamponné à 50°C ne nous a pas permis de déterminer les paramètres cinétiques à cette température.

1.3.2.2. Détermination des vitesses relatives vis-à-vis de différents aldéhydes

Les vitesses initiales ont été déterminées pour un éventail de substrats choisis pour leur diversité structurale et parce qu'ils ont déjà été testés avec les TK_{sce} et TK_{eco} : des aldéhydes hydroxylés non-phosphorylés (C3 à C6) et des aldéhydes aliphatiques (C4 à C5) (Figure 57).

Aldéhydes hydroxylés :



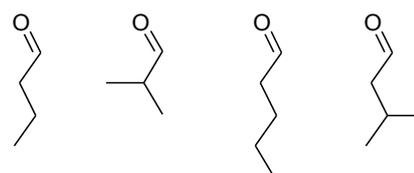
Glycolaldéhyde

Glycéraldéhyde

D-ribose

D-glucose

Aldéhydes non-hydroxylés :



butanal

isobutanal

pentanal

isopentanal

Figure 57 : Aldéhydes testés en présence de mTK_{gst}

La concentration en Li-HPA a été fixée à 50 mM, soit au-dessus de dix fois le K_M de 2,5 mM déterminé précédemment. Les vitesses initiales ont été mesurées à 20 °C et à 50 °C, dans le tampon Gly-gly 50 mM à pH 7,5 par suivi indirect de la disparition du Li-HPA durant 15 minutes. Des prélèvements sont effectués dans le milieu réactionnel et la concentration du Li-HPA est dosée par spectrophotométrie à 340 nm, en présence de la L-lactate déshydrogénase (LDH) et du NADH (Figure 58).

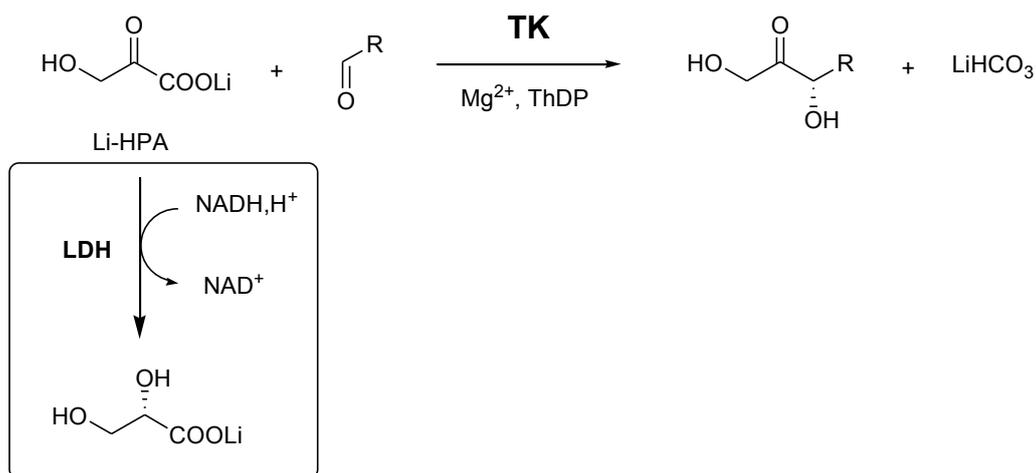


Figure 58 : Principe du dosage du Li-HPA

Les vitesses initiales déterminées pour chaque aldéhyde accepteur prennent en compte la dégradation du Li-HPA en absence d'accepteur.

Glycolaldéhyde

Le glycolaldéhyde a été choisi car il est le meilleur substrat non-phosphorylé des TK_{eco} et TK_{sce} , ce qui fait de lui le substrat aldéhydique de référence pour toutes les études de spécificité décrites dans la littérature. En présence de mTK_{gst} , les vitesses initiales ont été mesurées jusqu'à 65 °C. Les vitesses relatives pour ce substrat à 50 °C et 65 °C sont respectivement 8 fois et 14 fois plus élevées qu'à 20 °C. Si l'on compare ces valeurs avec celles obtenues avec la TK_{eco} , pour une même quantité d'enzyme (en mg), la vitesse initiale pour mTK_{gst} à 50°C est 4,7 fois plus élevée que pour la TK_{eco} à la même température (Figure 59).

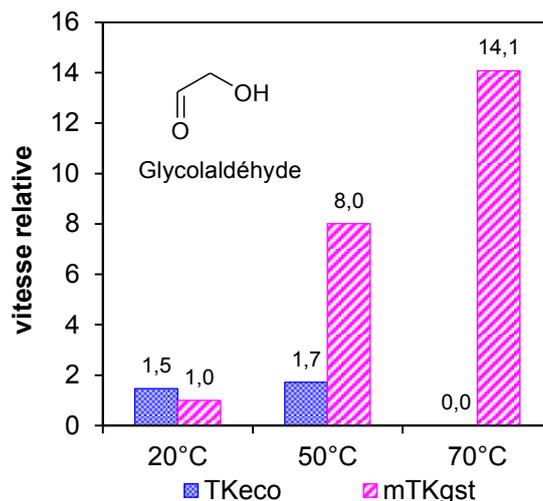


Figure 59 : Vitesses initiales relatives vis-à-vis du glycolaldéhyde en fonction de la température pour la mTK_{gst} comparées à la TK_{eco}

Les vitesses relatives sont calculées par rapport à l'activité obtenue avec mTK_{gst} vis-à-vis du glycolaldéhyde à 20°C, qui est fixée à 1.

Autres aldéhydes

Des aldéhydes polyhydroxylés et non-hydroxylés ayant une longueur de chaîne variable ont été testés en tant que substrats accepteurs potentiels de mTK_{gst} à 20 °C et 50 °C (Figure 57). Les aldéhydes polyhydroxylés testés comportent deux à six atomes de carbone. Parmi eux, le glycéraldéhyde a été sélectionné car il est disponible commercialement sous formes optiquement pures (2*R*) ou (2*S*) et sous forme racémique, ce qui nous permettra d'étudier l'énantiopréférence de la mTK_{gst}. Des aldéhydes aliphatiques linéaires ou ramifiés, comportant quatre à cinq atomes de carbone, mauvais substrats des TK_{sce} et TK_{eco} ont également été testés.

Les résultats montrent que les vitesses initiales sont en moyenne trois fois plus élevées à 50 °C qu'à 20 °C (Figure 60). Comme les autres TK connues, mTK_{gst} accepte très préférentiellement les aldéhydes α-hydroxylés de configuration (2*R*). Il est à souligner qu'une faible activité a été détectée avec le L-glycéraldéhyde (environ 1-2 % de celle du (2*R*)-glycéraldéhyde) alors qu'aucune activité avec la TK_{eco} n'était détectable pour ce substrat.[48]

De plus, l'activité vis-à-vis du racémique D, L-glycéraldéhyde (100 mM) n'est égale qu'à un quart de l'activité observée avec le D-glycéraldéhyde, ce qui suggère une potentielle inhibition de la mTK_{gst} par le L-glycéraldéhyde. Ce résultat a déjà été décrit dans la littérature avec les autres sources de TK.[48, 150] En présence d'aldoses non phosphorylés à plus

longues chaînes carbonées, tels que le D-ribose (C5) ou le D-glucose (C6), mTK_{gst} comme les autres sources de TK présente une faible activité (Figure 60).

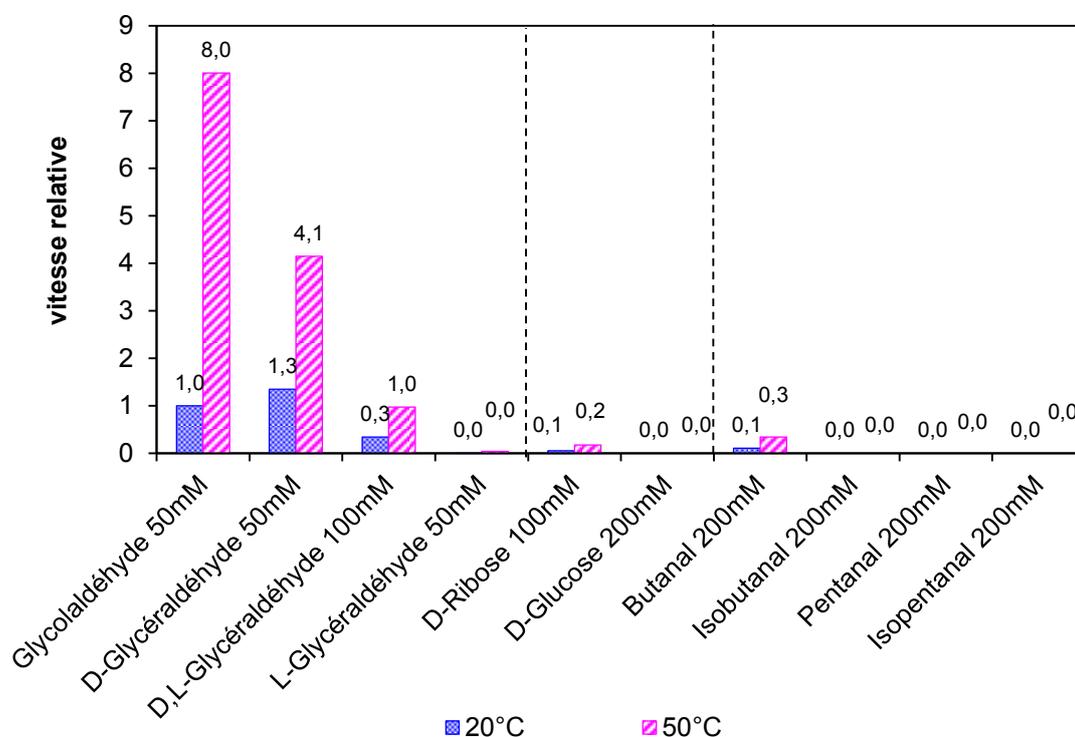


Figure 60 : Spécificité de substrat de mTK_{gst} pour différents accepteurs

Les vitesses relatives sont calculées par rapport à l'activité obtenue avec le glycolaldéhyde à 20°C, qui est fixée à 1.

Enfin, mTK_{gst} accepte préférentiellement les aldéhydes polyhydroxylés par rapport aux aldéhydes hydrophobes. Parmi ces derniers, seule une activité vis-à-vis du butanal a été détectée. Il est à noter que le butanal et l'isobutanal étaient solubles dans l'eau aux concentrations envisagées, alors que la dissolution du pentanal et de l'isopentanal a nécessité l'ajout de 20% de DMSO au milieu réactionnel (teneur compatible avec l'activité de la mTK_{gst} comme indiqué précédemment).

1.3.2.1. Détermination des constantes cinétiques et du facteur d'énantiosélectivité *E*

Les constantes cinétiques de mTK_{gst} ont été déterminées vis-à-vis de deux aldéhydes accepteurs non-phosphorylés ayant conduit précédemment aux meilleures vitesses relatives, le glycolaldéhyde et le D-glycéraldéhyde, et de l'aldéhyde pour lequel aucune activité n'avait

été détectée jusqu'ici avec les autres TK, le L-glycéraldéhyde. Ces constantes nous ont permis d'estimer une valeur du facteur d'énan tiosélectivité E .

Constantes cinétiques d'aldéhydes non-phosphorylés

Le glycolaldéhyde et le D-glycéraldéhyde sont de bons substrats accepteurs des TK_{eco} et TK_{sce} . [52] Nous avons déterminé les K_M de ces substrats vis-à-vis de la mTK_{gst} de façon directe et à 25 °C, grâce à un test d'activité colorimétrique que nous avons mis au point [151] et dont le principe sera décrit ultérieurement. La méthode de Hanes-Woolf a permis de déterminer un K_M de $8,9 \pm 0,5$ mM et une V_{max} de 15 ± 3 U.mg⁻¹ pour le glycoladéhyde et de 6 ± 1 mM une V_{max} de $15,8 \pm 0,6$ U.mg⁻¹ pour le D-glycéraldéhyde. Ces valeurs sont meilleures par rapport à celles indiquées dans la littérature pour les TK_{eco} et TK_{sce} (Tableau 6). Enfin, les paramètre en présence du L-glycéraldéhyde, moins bon substrat, ont pu être estimés par cette méthode et sont de 300 ± 50 mM pour le K_M et de 9 ± 1 U.mg⁻¹ pour la V_{max} . Cette valeur est une estimation, car il nous a été en pratique impossible de mesurer les activités pour les concentrations au-delà de 500 mM en L-glycéraldéhyde, soit au moins deux fois le K_M .

	mTK _{gst}			TK _{sce}	TK _{eco}
	K _M [mM]	V _{max} [U.mg ⁻¹]	V _{max} /K _M	K _M [mM]	K _M [mM]
Glycolaldéhyde	8,9	15	1,7	21	14
D-glycéraldéhyde	6	15,8	2,6	40	48
L-glycéraldéhyde	300	9	0,03	nd	nd

Tableau 12 : Comparaison des K_M de mTK_{gst} aux autres TK microbiennes pour des aldéhydes non-phosphorylés à 25 °C

A 25 °C le D-glycéraldéhyde semble être un meilleur substrat que le glycolaldéhyde pour la mTK_{gst} contrairement aux TK_{eco} et TK_{sce} qui acceptent préférentiellement le glycolaldéhyde. Ceci corrobore les résultats obtenus lors de la détermination des vitesses relatives vis-à-vis des différents substrats accepteurs (Figure 57). Cette tendance s'était inversée à 50 °C, où le glycolaldéhyde était alors le meilleur substrat accepteur de mTK_{gst} . Malheureusement, le test d'activité utilisé ici n'a pas permis la détermination des paramètres cinétiques de mTK_{gst} à 50 °C.

Détermination du coefficient d'énantiosélectivité E

L'une des caractéristiques des enzymes les plus utilisées est leur sélectivité. L'énantiosélectivité d'une enzyme vis-à-vis d'un couple de substrats énantiomères est mesurée par le rapport des V_{max}/K_M mesuré pour chaque énantiomère, appelé facteur d'énantiosélectivité E . [152]

$$E = \frac{(V_{max}/K_M)_{\text{énantiomère rapide}}}{(V_{max}/K_M)_{\text{énantiomère lent}}} \quad (1)$$

Ainsi, dans le cas du glycéraldéhyde, la mTK_{gst} présente une énantiosélectivité E_R d'environ 90 en faveur de l'énantiomère D ($2R$) (soit un E_S d'environ 0,01).

1.3.3. Etude de la stéréochimie en C3 et C4 des produits formés par la mTK_{gst}

1.3.3.1.1. Introduction

La stéréochimie des produits obtenus avec les TK_{eco} et TK_{sce} ont été décrites dans la littérature sur un large spectre de substrats accepteurs aldéhydiques et en présence du Li-HPA comme donneur. Les réactions catalysées par ces TK sont hautement stéréosélectives sur le nouveau carbone asymétrique C3, de configuration ($3S$). La stéréochimie du C4 est inhérente au substrat accepteur. Les études en présence d'aldéhydes α -hydroxylés racémiques montrent que seuls les énantiomères ($2R$) sont acceptés par les TK_{eco} et TK_{sce} , conduisant à un produit cétose de configuration ($4R$). On parle alors d'énantiosélectivité en faveur des substrats ($2R$). Cette propriété a été utilisée pour obtenir des aldéhydes α -hydroxylés ($2S$) énantiomériquement purs à partir de mélange racémiques. [54]

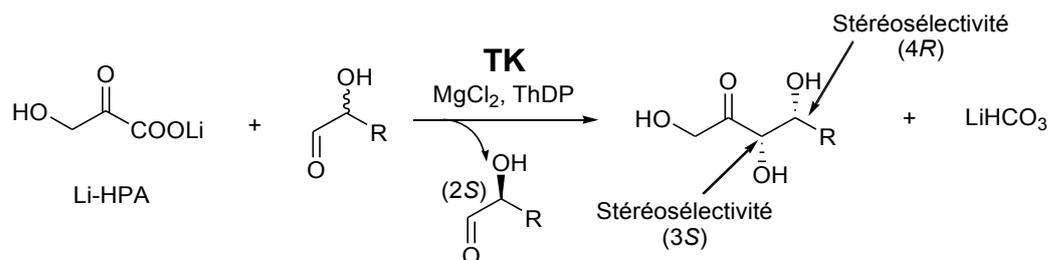


Figure 61 : Stéréochimie en C3 et C4 des cétooses obtenus avec les TK_{eco} et TK_{sca}

Afin d'étudier la stéréosélectivité de mTK_{gst} sur les C3 et C4 nous avons réalisé des synthèses à l'échelle préparative de différents cétooses et analogues, à partir du Li-HPA comme donneur et de différents aldéhydes accepteurs, puis nous avons isolé les produits formés dans le but de les caractériser. Nous avons choisi pour cela trois substrats accepteurs parmi ceux testés précédemment à échelle analytique : le glycolaldéhyde, le glycéraldéhyde et le butanal. Le glycolaldéhyde et le butanal ne présentant pas de carbone asymétrique, ils nous permettront d'étudier la stéréosélectivité de mTK_{gst} au niveau du C3 formé et de comparer celle-ci à celle obtenue en présence d'un aldéhyde α -hydroxylé ou non. Le glycéraldéhyde, aldéhyde α -hydroxylé disponible commercialement sous les configurations respectives (2R) et (2S) nous permettra quant à lui d'examiner la stéréosélectivité de mTK_{gst} au niveau du C4.

Toutes les réactions ont été réalisées à 50°C, dans l'eau et le pH est maintenu à 7,5 au moyen d'un pH-stat avec une solution d'acide chlorhydrique 0,1 N. L'aldéhyde est toujours à une concentration de 50 mM. Le Li-HPA est en concentration équimolaire pour les réactions effectuées sur un temps court (jusqu'à trois heures) mais à 100 mM pour les réactions effectuées sur des durées plus longues, afin de compenser sa dégradation. Enfin, la mTK_{gst} est introduite dans le milieu à une concentration d'environ 0,2 mg/mL. Les réactions sont suivies au cours du temps par chromatographie sur couche mince (CCM) et par dosage du Li-HPA par voie enzymatique en présence de LDH et de NADH. A la fin de la réaction, les protéines sont précipitées et éliminées par centrifugation. Le surnageant est évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice.

1.3.3.2. Etude de la stéréosélectivité de mTK_{gst} au niveau du C3 formé

En présence du glycolaldéhyde

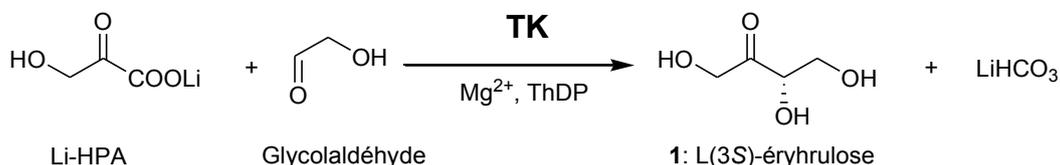


Figure 62 : Synthèse du L-(3S)-érythrose catalysée par la mTK_{gst}

Le produit attendu lors de la synthèse à partir du glycolaldéhyde comme accepteur est le L-(3S)-érythrose 1 (Figure 62). Après une heure de réaction, le Li-HPA est entièrement consommé. La CCM révèle la présence d'un seul produit dont le rapport frontal (R_f) correspond à celui de l'érythrose. Après purification sur gel de silice, ce produit est isolé avec un rendement de 36 % et l'analyse des spectres de RMN ^1H et ^{13}C confirment la structure de l'érythrose. La mesure de son pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{25} : +6,3$ (c 1,48, H_2O) correspond à celui du L-(3S)-érythrose indiqué dans la littérature ($[\alpha]_D^{25} : +6.3$ (c 1,1, H_2O)[69] et $[\alpha]_D^{25} : +6.7$ (c 1.48, H_2O)[127]). La réaction catalysée par mTK_{gst} est donc stéréospécifique. Ceci corrobore les propriétés connues des TK_{eco} et TK_{sce} envers ce même substrat. En effet, après dérivatisation en triacétate du L-érythrose obtenu avec ces enzymes, l'excès énantiomérique mesuré par HPLC chirale est supérieur à 95%. [69, 127]

En présence du butanal

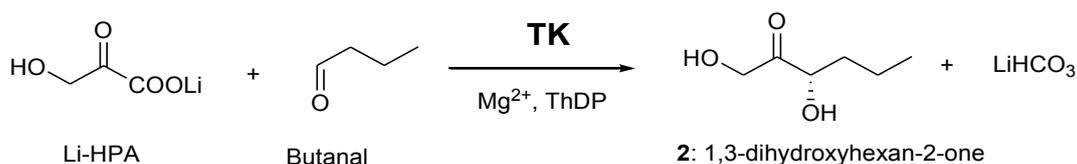


Figure 63 : Synthèse de la 1,3-dihydroxyhexan-2-one catalysée par la mTK_{gst}

La synthèse à partir du butanal comme accepteur a été réalisée par l'équipe du Pr. W.-D. Fessner, notre partenaire dans ce projet ANR (Figure 63). Après 24h de réaction, un seul produit a été obtenu et il a été isolé avec un rendement de 43 %. Le temps de réaction beaucoup plus long qu'en présence du glycolaldéhyde, est en adéquation avec les vitesses relatives déterminées lors des études analytiques. L'analyse des spectres de RMN ^1H et ^{13}C confirme que le produit formé correspond à la 1,3-dihydroxyhexan-2-one. [126] La

dérivatisation du produit **2** en présence de chlorure de benzyle a permis de déterminer par HPLC chirale[126] un excès énantiomérique *ee* de 85 %. Un aldéhyde non hydroxylé tel que le butanal conduit donc à valeur légèrement inférieure de l'*ee* par rapport à celle observée précédemment avec le glycolaldéhyde mais confirme stéréosélectivité de la mTK_{gst} en faveur de la configuration (S) au niveau du C3 du produit formé. Il est à noter que celle-ci est supérieure à celle indiquée dans la littérature pour la TK_{eco} avec le butanal (*ee*=75 %).[127]

1.3.3.3. Etude de la stéréosélectivité de mTK_{gst} au niveau du C4 formé

Cette étude a été réalisée en présence d'un substrat accepteur α -hydroxylé, le glycéraldéhyde, les deux énantiomères (2*R*) et (2*S*), afin de vérifier que les activités détectées précédemment vis-à-vis de ces substrats à l'échelle analytique sont confirmées par la présence des produits correspondants.

En présence du D-glycéraldéhyde

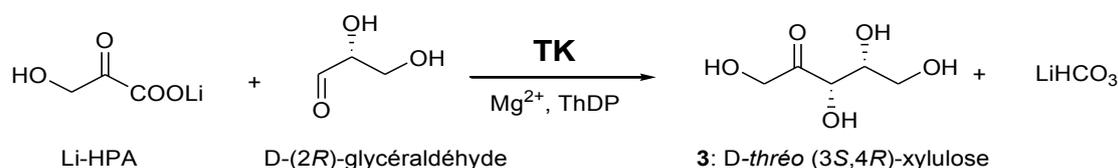


Figure 64 : Synthèse du D-xylulose catalysée par la mTK_{gst}

La réaction de synthèse à partir du D-glycéraldéhyde, en présence de 0,2 mg.mL⁻¹ de mTK_{gst} et à 50°C a conduit à la consommation complète du Li-HPA au bout de trois heures. Le D-xylulose **3**, seul produit visible par CCM a été isolé avec un rendement de 38%. Le pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D^{25}$: -30,9 (c 2,0, H₂O)) correspond bien à celui du D-xylulose indiqué dans la littérature. L'analyse des spectres de RMN ¹H et ¹³C montre que le composé **3** D-*thréo* (3*S*, 4*R*) a été obtenu avec une grande diastéréosélectivité. En effet si la stéréospécificité de mTK_{gst} au niveau du C3 formé n'avait pas été totale, le diastéréoisomère L-*érythro* (3*R*, 4*R*) aurait été observé, ce qui n'est pas le cas (excès diastéréoisomérique du composé **3** : *de* > 95 %, d'après la RMN ¹H).

En présence du L-glycéraldéhyde

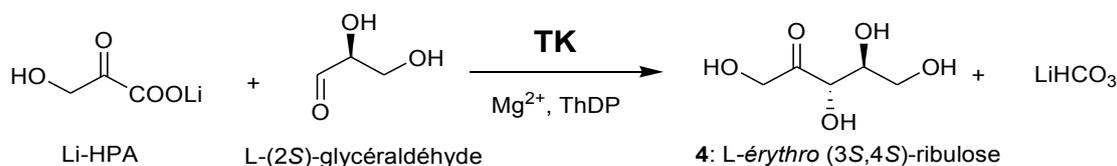


Figure 65 : Synthèse du L-ribulose catalysée par la mTK_{gst}

Une synthèse à échelle préparative a été réalisée à 50 °C à partir du L-glycéraldéhyde afin de confirmer l'activité détectée à échelle analytique. Bien que le suivi du Li-HPA indique une conversion plus lente de celui-ci (24 h environ, contre 3 h avec le D-glycéraldéhyde), le ribulose **4** formé a été effectivement isolé, avec un rendement de 45 %. Sa structure a été confirmée par les analyses de RMN ¹H et ¹³C et par comparaison de ces spectres à ceux de la littérature.[153] Cependant, le pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D^{25} : +3,40$ (c 2,0, H₂O)) est inférieur à celui du L-(3S,4S)-ribulose donné dans la littérature ($[\alpha]_D^{26} : +16,5$ (c 0,1, H₂O)).[2] En effet bien que la RMN ¹³C, montre très majoritairement le L-ribulose, des pics supplémentaires indiquent des traces d'un produit secondaire, différent du diastéréoisomère, difficile à identifier et que nous n'avons pas pu isoler. Malgré tout, ce résultat reste très intéressant car jusqu'ici aucune étude n'a montré que les TK_{sce} et TK_{eco} permettaient d'obtenir des cétooses L-érythro (3S, 4S) à partir d'aldéhydes alpha-hydroxylés (2S).

Afin de s'assurer que la formation du L-ribulose est bien due à l'activité de la TK et non catalysée par à un autre constituant du milieu réactionnel comme cela a parfois été observé,[154] une expérience complémentaire consistant à mettre tous les réactifs en présence et remplacer la mTK_{gst} par des protéines de BSA a été réalisée. Mais aucun produit n'a été formé, ce qui prouve que le L-ribulose n'est pas issu d'une réaction chimique.

1.3.3.4. Conclusion

Cette étude a permis de montrer que comme toutes les TK décrites jusqu'ici, la mTK_{gst} était stéréospécifique, avec la création d'un nouveau centre asymétrique (3S), et acceptait préférentiellement les aldéhydes de configuration (2R), conduisant ainsi majoritairement aux produits cétoose de configuration (3S, 4R). Cependant, un résultat surprenant a montré que contrairement à tout ce qui a été décrit précédemment avec les autres TK, mTK_{gst} était

capable d'accepter un aldéhyde de configuration (2*S*), même si cette activité est faible. En effet, le L-ribulose a été isolé suite à la réaction à partir du L-glycéraldéhyde en présence de mTK_{gst} avec un rendement de 45 %.

1.4. Conclusion

Dans cette étude, nous avons produit et caractérisé la première TK thermostable issue de l'organisme thermophile *G. stearothermophilus*. Ainsi notre objectif initial de disposer d'une TK plus robuste que celles utilisées jusqu'ici et ce en vue des expériences de mutagenèse a été atteint.

Cette étude a également permis de mettre en évidence un certain nombre de caractéristiques avantageuses de cette nouvelle TK pour son utilisation en biocatalyse. Tout d'abord, sa stabilité à des températures élevées (100% d'activité durant une semaine au moins à 50°C, trois jours à 65°C) permet de la purifier aisément par traitement thermique. Cette thermostabilité permet également d'améliorer les cinétiques de réaction. Par exemple, la vitesse de réaction de mTK_{gst} vis-à-vis du glycolaldéhyde est améliorée d'un facteur 14 entre 20 °C et 70 °C ; sa vitesse à 50°C est améliorée d'un facteur 4,7 par rapport celle de la TK_{eco} dans les mêmes conditions. Globalement, la spécificité de substrat de mTK_{gst} est la même que celle des TK_{eco} et TK_{sce}, avec une plus forte affinité pour les aldéhydes polyhydroxylés et en particulier pour les aldéhydes de configuration (2*R*). Par ailleurs, la stabilité thermique de mTK_{gst} allant de pair avec une bonne tolérance aux cosolvants organiques, quelques aldéhydes hydrophobes ont pu être testés. Cependant ces derniers n'étaient pas substrats de la mTK_{gst}.

Les synthèses à échelle préparative en présence de quelques aldéhydes ont permis d'étudier la stéréochimie des produits formés : comme les TK_{eco} et TK_{sce}, mTK_{gst} est stéréosélective en C3 car elle catalyse la formation d'un nouveau centre asymétrique de configuration (*S*) et énantiosélective des aldéhydes de configuration (2*R*). Cependant un phénomène surprenant a été observé : contrairement à tout ce qui a été décrit précédemment avec les autres TK, mTK_{gst} est capable d'accepter faiblement un aldéhyde α-hydroxylé de configuration (2*S*) et le produit correspondant de configuration (3*S*,4*S*) a été isolé.

L'objectif à présent est d'augmenter cette activité de mTK_{gst} vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés de configuration (2S), pour *in fine* inverser l'énantiosélectivité de mTK_{gst} des accepteurs de configuration (2R) vers les accepteurs de configuration (2S). Pour cela la technique de l'évolution dirigée sera appliquée à la mTK_{gst} et c'est l'objet du chapitre suivant.

2. Modification de l'énantiosélectivité de la mTK_{gst} par ingénierie

2.1. Construction des banques de mTK_{gst} mutées

2.1.1. Introduction

Dans le but d'augmenter l'activité de la mTK_{gst} vis-à-vis des substrats accepteurs aldéhydiques α-hydroxylés de configuration (2S) et *in fine* inverser son énantiosélectivité qui est en faveur de l'énantiomère (2R) pour l'enzyme sauvage, nous avons envisagé de modifier son site actif par mutagenèse.

Pour cela, un modèle structural de la mTK_{gst} sera construit par homologie de séquence avec la TK_{ban} afin d'examiner les résidus du site actif interagissant avec le substrat accepteur et déterminer les positions clés qui pourraient conduire, une fois mutées, à une modification voire une inversion de l'énantiosélectivité. Le substrat modèle utilisé pour les études *in silico* puis *in vitro* sera le glycéraldéhyde, sous ses deux formes énantiomériques pures L (2S) et D (2R), la forme D étant celle préférentiellement acceptée. Deux approches ont été envisagées. L'une est une approche rationnelle qui consistera à muter les résidus sélectionnés du site actif individuellement puis simultanément par mutagenèse par saturation de site. Chaque résidu est alors remplacé par les 19 autres acides aminés. La seconde approche est une approche « semi-rationnelle » permettant de créer des mutations aléatoires sur une séquence de quelques résidus contigus autour des positions clés identifiées dans le site actif. La technique de mutagenèse par cassette sera pour cela employée. Enfin, les conditions de culture et de lyse des clones exprimant les mTK_{gst} mutées selon ces deux approches seront optimisées en vue du criblage.

2.1.2. Construction d'un modèle structural de la mTK_{gst} par homologie

Il n'existe pas à ce jour de structure cristallographique de mTK_{gst}. Un modèle a donc été construit par homologie de séquence au moyen des logiciels Modeller 9V11 et Chimera1.7.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec L. Nauton et le Dr V. Théry, responsables de la plateforme modélisation moléculaire de notre institut.

La structure cristallographique de TK_{ban} (3M49.pdb) a été utilisée comme modèle de départ. Le gène codant pour cette TK présente en effet une identité de séquence nucléotidique de 74 % avec TK_{gst}, ce qui en fait le meilleur candidat (Tableau 6 p 87). Pour la construction du modèle de TK_{gst}, les molécules d'eau les plus importantes, c'est-à-dire celles ayant une forte occupation et un facteur d'agitation thermique proche de celui de la protéine, ainsi que les liaisons hydrogènes qui définissent la structure tertiaire (hélices alpha et feuillets beta) de la structure 3M49 de la TK_{ban} ont été prises en compte. A l'aide du monomère de mTK_{gst} ainsi obtenu, l'homodimère a été reconstruit par superposition avec la structure 3M49 de la TK_{ban}. Les cofacteurs ThDP et Ca²⁺ ont été placés dans des positions identiques à celles observées dans la structure de TK_{ban}. Le modèle dimérique de mTK_{gst} ainsi obtenu a alors été traité par le logiciel Sybyl afin de réaliser une minimisation d'énergie qui permet de vérifier que toutes les interactions entre les deux monomères sont adéquates, sans conflit stérique.

Le site actif de TK_{gst} a été comparé à ceux de TK_{eco} et TK_{sce}. La Figure 66 montre que les résidus clés intervenant dans le mécanisme catalytique et la reconnaissance des substrats physiologiques sont identiques et leurs positions presque superposables pour ces trois TK.

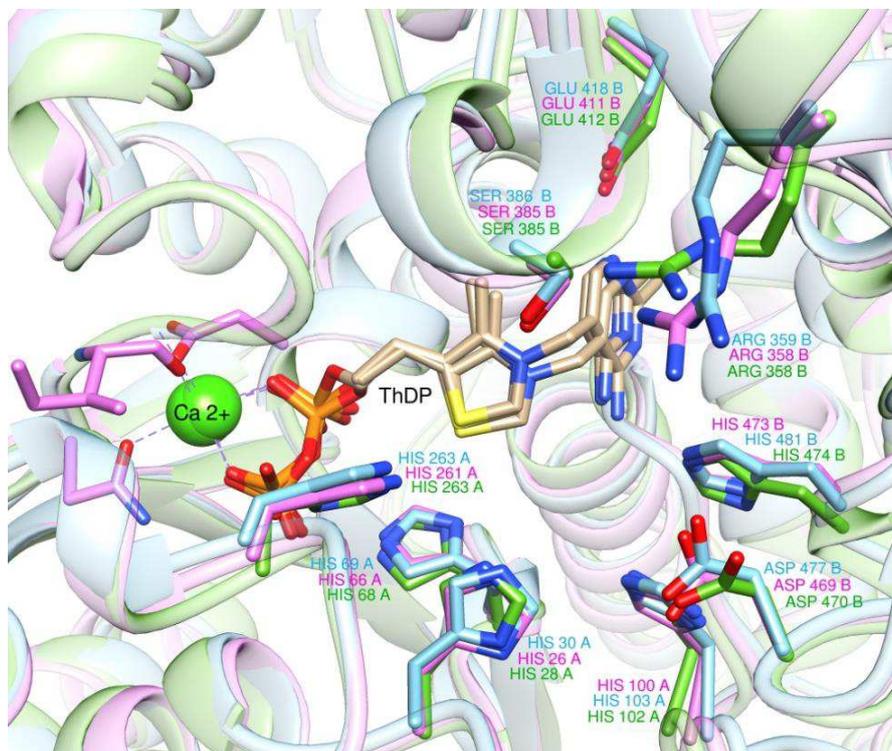


Figure 66 : Superposition des sites actifs de TK_{sce} (1GQD.pdb, bleu) TK_{eco} (1TRK.pdb, rose) et TK_{gst} (vert)

2.1.3. Choix des positions clés du site actif pour la modification de l'énantiosélectivité de mTK_{gst}

D'après les résultats décrits dans la littérature et l'analyse des sites actifs des TK_{eco} et TK_{sce}, le résidu Asp en position 469 chez la TK_{eco} et 477 chez la TK_{sce} joue un rôle clé pour la reconnaissance du substrat accepteur. En effet, il a été montré par le Pr. G. Schneider en collaboration avec le Prof. L. Hecquet que l'interaction par liaison hydrogène entre le résidu Asp en position 477 chez la TK_{sce} et le groupement hydroxyle en position α de l'aldéhyde était responsable de l'énantiosélectivité de la TK vis-à-vis des accepteurs de configuration (2R) (Figure 67).[42]

Plus récemment, une étude basée sur la mutagenèse par saturation de site de la TK_{eco} a été réalisée par l'équipe des Pr. H. Hailes et P. Dalby afin d'étudier l'activité de la TK vis-à-vis d'accepteurs non- α -hydroxylés, en utilisant le propanal comme substrat de référence.[125, 127] Cette étude, basée sur la modification du site actif par mutagenèse a mis en évidence des mutations bénéfiques au niveau des positions Asp469, Ala29, Asp259 et His26, parmi lesquelles le mutant Asp469Glu s'est avéré avoir la meilleure activité vis-à-vis du propanal avec une amélioration d'un facteur 8 par rapport à la TK_{eco} sauvage. Le remplacement de l'Asp469 par d'autres résidus présentant une chaîne plus longue permet de rétrécir la poche d'accès de l'accepteur et limite la mobilité de ce substrat non-hydroxylé.

La mTK_{gst} présente un résidu équivalent en position Asp470. Cette position jouant un rôle stratégique dans le contrôle de l'énantiosélectivité pour la TK_{sce} et aussi dans la reconnaissance de substrats non α -hydroxylés pour la TK_{eco}, nous avons envisagé de muter ce résidu.

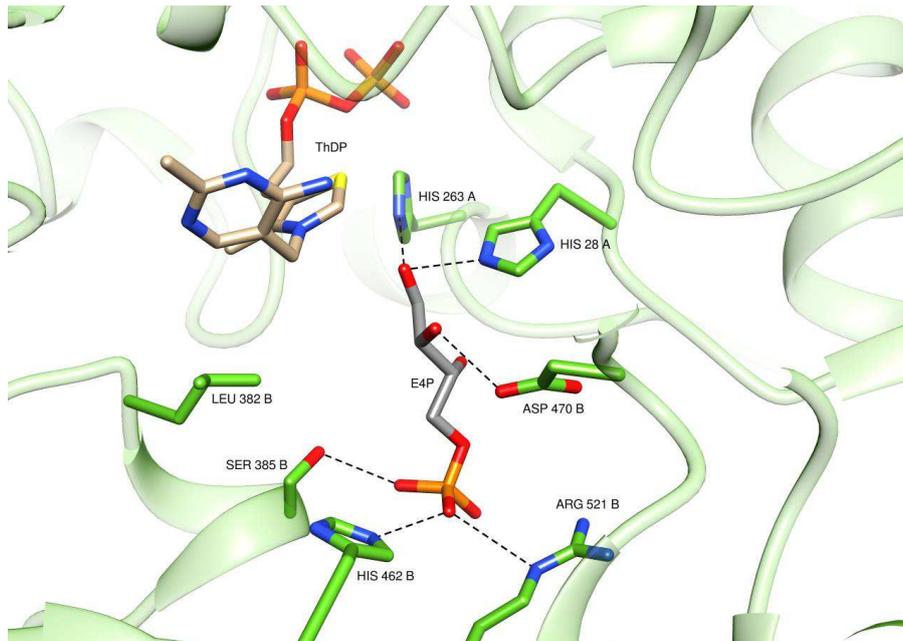


Figure 67 : Modèle du site actif de mTK_{gst} en présence du substrat accepteur physiologique D-(2R,3R)-érythrose-4-phosphate [155]

La conformation du substrat a été déterminée par analogie avec la TK_{sce} (1NGS.pdb)

D'autre part, l'analyse du site actif de la mTK_{gst} montre qu'un résidu Leu en position 382 est situé exactement à l'opposé de cet Asp470 par rapport au C2 du substrat aldéhydique (Figure 67 avec le D-E4P, Figure 68a avec le D-glycéraldéhyde). Bien que ce résidu ne paraisse pas avoir de rôle dans reconnaissance de l'aldéhyde α -hydroxylé (2R) reconnu substrat dans la structure de la mTK_{gst} sauvage, sa modification pourrait avoir un effet complémentaire à celle de l'Asp470 pour la modification voire l'inversion de l'énantiosélectivité. La proximité du groupement hydroxyle du C(2S) du L-glycéraldéhyde (Figure 68b) et du résidu Leu382 laisse envisager une telle interaction avec un autre résidu chargé à la place de la Leu382. D'après ces considérations basées sur l'observation de la structure du site actif, nous avons choisi de muter les positions Asp470 et Leu382.

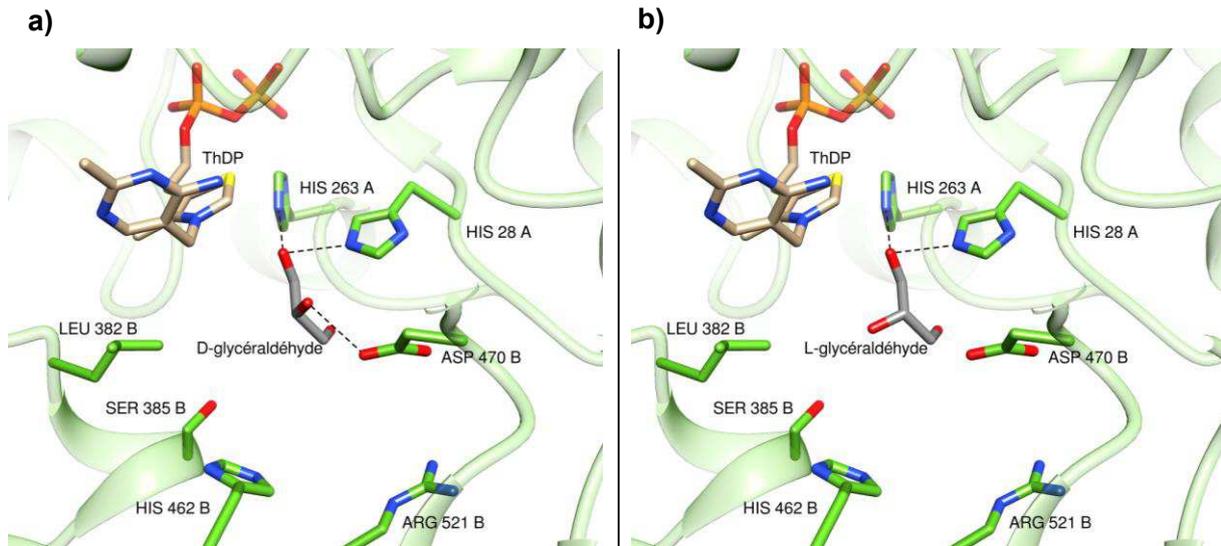


Figure 68 : Modèle du site actif de mTK_{gst} en présence du substrat accepteur
a) le D-(2R)-glycéraldéhyde et b) le L-(2S)-glycéraldéhyde

2.1.4. Banques obtenues par saturation de site (« SSM »)

L'ingénierie rationnelle repose sur l'analyse de la structure du site actif et des interactions enzyme-substrat. Un bel exemple d'inversion de l'énantiosélectivité d'une enzyme par une approche rationnelle est illustré par les travaux du Pr F.M. Rauschel (Etats-unis) sur une phosphotriesterase.[156] L'étude minutieuse du site actif de cette enzyme a permis de passer d'un facteur 31 en faveur de l'énantiomère *S* pour l'enzyme sauvage à un facteur proche de 500 en faveur de l'énantiomère *R* pour les meilleurs variants, sans perte de l'activité catalytique et à partir d'un nombre restreint de mutations.

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, la mutagenèse par saturation de site («SSM») est une technique efficace basée sur une approche rationnelle. Elle consiste à remplacer un acide aminé dans une position donnée par les 19 autres acides aminés. Nous l'avons choisie afin de construire trois banques : deux banques obtenues par SSM sur une position, respectivement Leu382 et Asp470 (notées SSM-L382 et SSM-D470), et une banque obtenue par SSM sur les deux positions Leu382 et Asp470 simultanément (notée SSM-L382D470) de façon à créer un effet coopératif des mutations sur ces deux positions. Ces banques ont été construites par le Dr. D. Yi de l'équipe du Pr. W.-D. Fessner (Université de Darmstadt, Allemagne).

2.1.4.1. Construction des banques

Une stratégie basée sur des codons de type « NNS », où N représente 25% de chaque base A, T, G et C et S représente 50% de C ou de G, a été envisagée pour ces trois banques, afin de réduire le nombre de clones et donc d'enzymes mutées à tester. Selon cette méthode, pour obtenir un taux de représentation d'au moins 95 % des mutations possibles, les banques SSM sur une seule position devront contenir 95 clones et la banque SSM sur les deux positions devra comporter 3066 clones, chaque clone exprimant une mTK_{gst} mutée.[157]

Pour la construction des banques SSM, un protocole a été optimisé à partir de la méthode QuickChange®.[155] Dans le cas de la banque SSM double-sites, deux stratégies ont été envisagées : la première recourt à l'utilisation simultanée de deux paires d'amorces correspondant aux deux positions de mutation Leu382 et Asp470 tandis que la seconde est basée sur la mutation séquentielle d'une position puis de l'autre. La mutation simultanée des deux positions n'ayant pas conduit à de grandes quantités d'ADN plasmidique après PCR, c'est finalement la seconde méthode qui a été employée : après un cycle de mutagenèse effectuée sur la position Asp470, le mélange de plasmides obtenu sert alors de matrice pour un second tour de mutagenèse sur la position Leu382 (Figure 69).

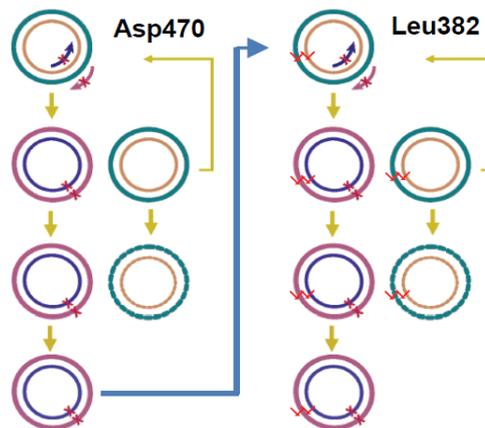


Figure 69 : Principe de la construction de la banque de mutagenèse par saturation de site sur deux positions simultanément [155]

Des cellules compétentes BL21(DE3) d'*E. coli* ont ensuite été transformées avec les plasmides obtenus et les clones résultants ont été mis en culture sur plaque d'agarose. Pour chacune des banques obtenues par mutagenèse sur un site unique (SSM-L382 et SSM-D470), 192 clones (soit 2 microplaques 96-puits) ont été sélectionnées, c'est-à-dire deux fois

plus que la valeur théorique de 95 clones nécessaires pour la représentation de 95 % au moins des mutations possibles. Pour la banque obtenue par mutagenèse sur les deux sites (SSM-L382D470), 3 456 clones (96 microplaques 96-puits) ont été sélectionnées au lieu des 3066 préconisés.

2.1.4.2. Analyse de la qualité des banques

Pour les banques obtenues par mutagenèse sur un site unique, les codons originaux TTG pour la Leu382 et GAT pour l'Asp470 ont été remplacés avec succès par un codon de type NNS (Figure 70). En effet, les résultats de séquençage montrent des pics superposés pour A/T/G/C aux positions N avec des proportions proches de 25% calculées grâce aux hauteurs de pics et un mélange G/C à la position S, dans des proportions proche de 50%.

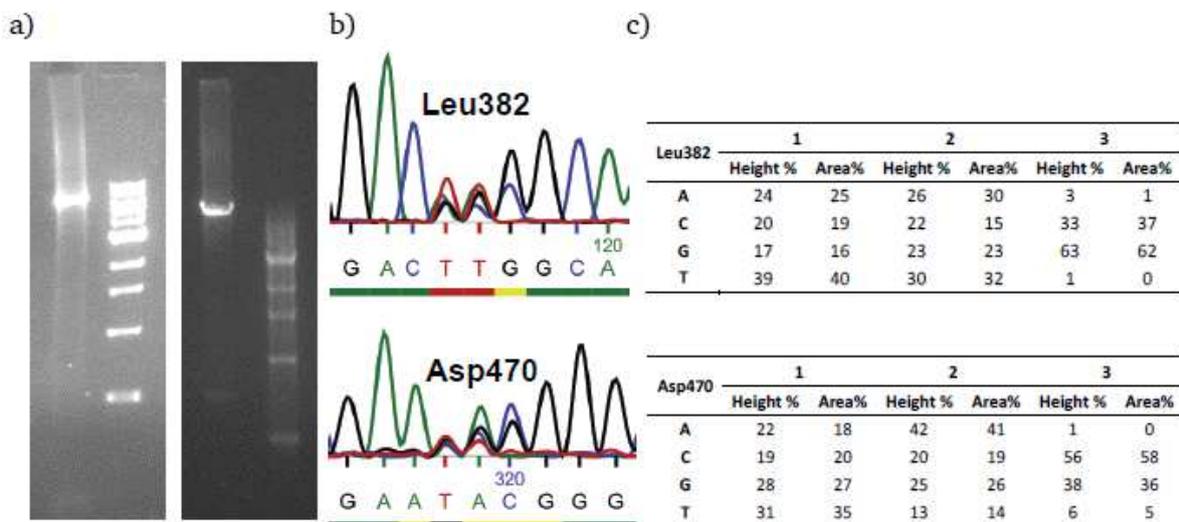


Figure 70 : Analyse des banques SSM-L382 et SSM-D470 [155]

a) Identification du produit de PCR sur gel d'agar. Gauche : Leu382; Droite : Asp470. b) résultats de séquençage d'un extrait du mélange de plasmides c) Hauteurs des pics calculées à partir des résultats de séquençage

L'analyse de la banque de plasmides obtenue après deux cycles de mutagenèse, sur la position Asp470 puis sur la position Leu382, a également montré des résultats très satisfaisants : la distribution des nucléotides sur les positions N et S sont celles attendues (Figure 71).

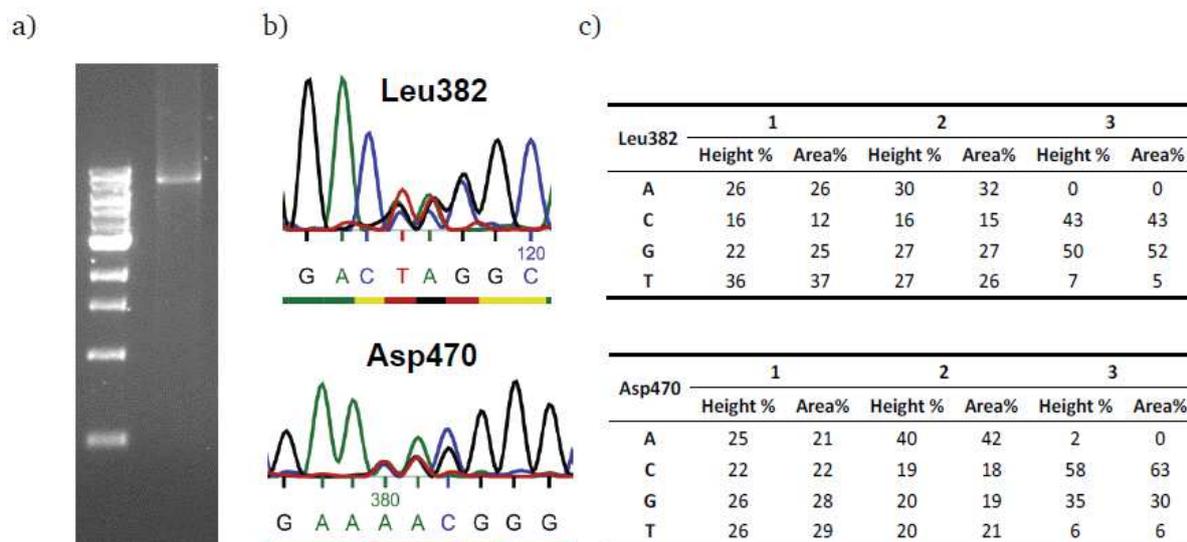


Figure 71 : Analyse de la banque SSM-L382D470 [155]

a) Identification du produit de PCR sur gel d'agar. b) résultats de séquençage d'un extrait du mélange de plasmides c) Hauteurs des pics calculées à partir des résultats de séquençage

2.1.5. Banques obtenues par la technique de mutagenèse par cassettes (« CM »)

Bien qu'il existe quelques exemples de cas où l'énantiosélectivité d'une enzyme a été inversée par ingénierie rationnelle, il arrive souvent qu'une telle stratégie n'aboutisse pas au résultat escompté.[158] L'équipe du Pr. M. Reetz a développé de nombreuses stratégies combinant approches rationnelles et approches aléatoires pour améliorer ou inverser l'énantiosélectivité des enzymes, comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique (page 63). En appliquant entre autres les techniques de la mutagenèse combinatoire par cassettes multiple (CMCM), de la mutagenèse aléatoire (ep-PCR) et de DNA shuffling, l'énantiosélectivité d'une lipase (E_S : 1,1) a été améliorée (E_S : 51) puis inversée (E_R : 30). [159, 160] Or la plupart des mutations identifiées étaient situées sur des positions n'étant pas en interaction directe avec le substrat dans l'enzyme sauvage. L'effet coopératif de certaines de ces mutations a permis de créer une nouvelle poche de fixation pour le substrat d'intérêt. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres groupes pour l'inversion de l'énantiosélectivité de lipases [161, 162] ou d'une hydantoinase.[163]

Ainsi, afin de renforcer l'effet coopératif des résidus mutés Leu382 et Asp470 avec d'autres mutations dans leur environnement proche, nous avons envisagé une seconde approche : l'approche « semi-rationnelle ». Dans le cas de la mTK_{gst} , la stratégie consiste à identifier deux séquences de résidus contigus au niveau du site actif contenant chacune un des deux

résidus clés (Leu382 ou Asp470) puis des mutations aléatoires et non systématiques seront créées sur ces séquences par la technique de mutagenèse par cassettes (CM). Cette stratégie dérive de la méthode de mutagenèse par saturation de site et utilise comme amorces des oligonucléotides dégénérés, conduisant à des mutations aléatoires sur les séquences protéiques correspondantes. Elle permet de muter plusieurs positions simultanément tout en conservant « l'ossature sauvage » de la séquence ciblée. Ce travail a été réalisé au Genoscope (CEA, Evry) par le Dr. I. Sorel, chercheur post-doctoral recruté dans le cadre du projet ANR deoTK.

Le principe de la CM, décrit précédemment dans la partie bibliographie, consiste à introduire une séquence mutée appelée « cassette » dans le gène de la TK_{gst} en remplacement de la séquence d'origine. Pour cela, le gène aura été préalablement modifié afin d'y introduire des sites de restrictions aux positions appropriées (Figure 72).

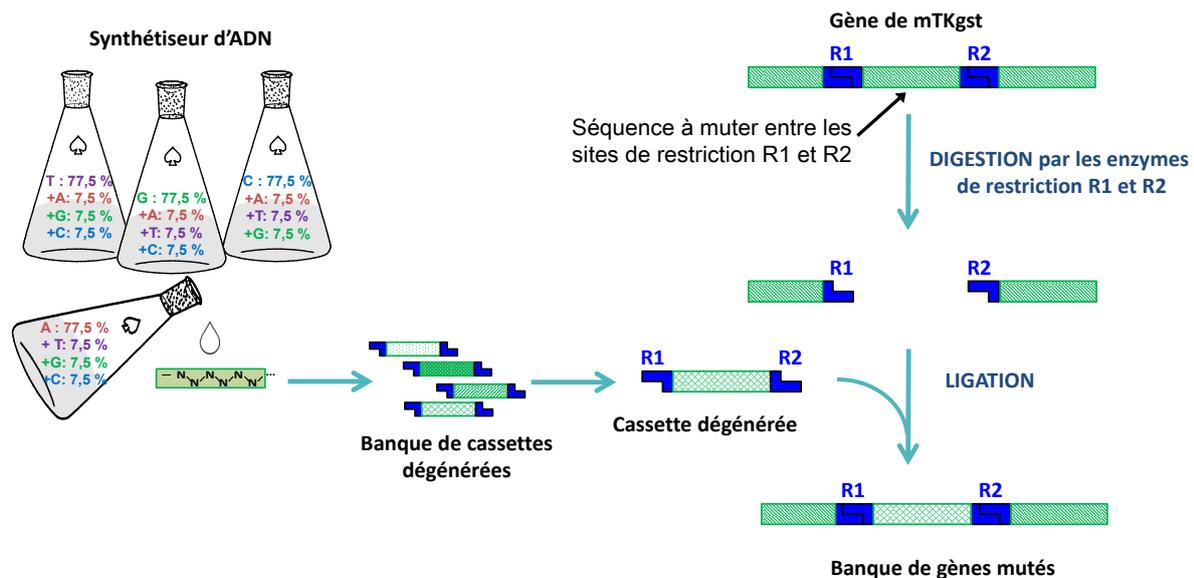


Figure 72 : Principe de la mutagenèse par cassette
Avec R1 et R2 : sites de restriction

2.1.5.1. Choix des séquences

Des séquences comportant cinq acides aminés contigus proches du substrat d'après le modèle de la mTK_{gst} ont été identifiées autour des positions Leu382 et Asp470. La séquence comportant la Leu382 est constituée des résidus Ala378 à Ser384 (ADLAS) et celle comportant l'Asp470 est constituée des résidus Glu469 à Thr473 (EDGPT) (Figure 73 et Figure 74).

MAHSIEELAITTIRTLSDIAIEKAKSGHPGMPMGAAPMAYTLWTKFMNHNPNANPNWFNRDRFVLSAGH
 GSMLLYSLLHLSGYDVSMDLQKFRQWGSKTPGHPEYGHPTGVEATTGPLGQGIAMAVGMAMAER
 HLAATYNRDGFEIINHYYAICGDGDLMEGVASEAASLAGHLKLGRLIVLYDSNDISLDGELNLSFSENV
 AQRFAQYGWQYLRVEDGNNIEEIAKALEEARADLSRPTLIEVKTITIGYGAPNKAGTSGVHGAPLGAQE
 AKLTKEAYRWTFADFVYVPEEVYAHFRATVQEPGAKKEAKWNEQLAAYEQAHPELAAQLKRAIEGKL
 PDGWEASLPVYEAGKSLATRSSSGEVINAIAKAVPQLFGGSADLAS^{ADLAS}SNKTLIKGGGNFLPDSYEGRN
 WFGVREFAMGAALNGMALHGGLKVFGGTFVFSYDLRPAIRLAALMGLPVIYVLTHTDSIAVGEDGPT^{EDGPT}H
 EPIEHLASLRAMPNLSVIRPADANETAAAWRLALESTDKPTALVLTRQDVPTLAATAELAYEGVKKGAY
 VVSPAKNGAPEALLLATGSEVGLAVKAQEALAAEGIHVSVISMPSWDRFEAQPKSYRDEVLP^{PAVTKR}
 LAIEMGASLWERYVGAEGDILADRFGASAPGEKIMAEYGFTVDNVVRRRTKALLGK

Figure 73 : Séquence protéique de mTK_{gst}. En bleu : fenêtre comportant la Leu382, en vert : fenêtre comportant l'Asp470

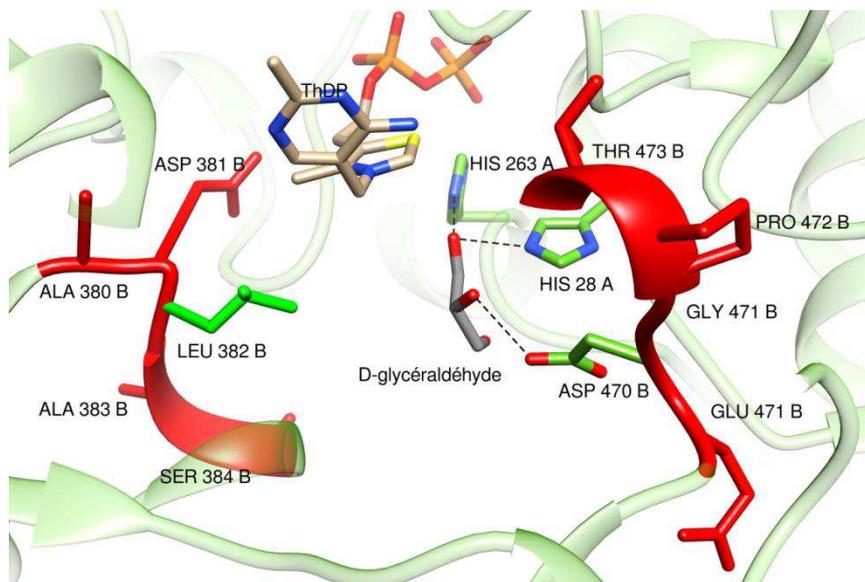


Figure 74 : Modèle du site actif de la mTK_{gst} avec les séquences ciblées Ala378-Ser384 et Glu469- Thr473 (en rouge) en présence du substrat accepteur D-glycéraldéhyde

Des cassettes comportant les séquences mutées de façon aléatoire seront introduites dans le gène à la place de la séquence d'origine grâce à des sites de restrictions. Pour cela de nouveaux sites de restriction ont été introduits sur la séquence nucléotidique correspondante . Pour choisir ces sites, le logiciel Webcutter 2.0 a été utilisé. Ainsi, les sites de restriction KpnI et Aval encadrent la séquence de cinq acides aminés comportant la Leu382. Cette séquence sera donc appelé KA5. Les sites de restriction AgeI et NheI encadre la séquence de cinq acides aminés comportant l'Asp470 et celle-ci sera donc nommée AN5. D'autres sites de restriction ont été ajoutés pour des études futures sur d'autres séquences (Figure 75). Au final l'ajout et la suppression de sites de restriction n'aura entraîné que la modification de trois acides aminés sur la TK_{gst} sauvage (L397F, D399G et H479Q) qui, comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, n'entraînent pas de modification de l'activité enzymatique.

atggcgattcaatcgaggagttggcgattacgacgattcgaacgctgtcgattgacgcatcgaaaaagcgaaatccgggcaTccgggcat
gccgatgggcgggcgccaatggcgtacacgcttggacgaaatgatgaatcataaccggcgaaatccaaactggttcaaccgagaccgTtt
tgtctgtcagccgggacgggtcgtatgtattgtacagcttctcatttaagcggctacgcatcgatggatgattgaaacaattccgtcaatg
gggaagcaaaacccgggcatccggaatacggccatacggggcgtggaagcgacgaccggccactcgccaagggattgcatg
gcggtcggcatggcgtatggcggaaacggcatttggccgctacatacaaccgacgggttgagattatcaatcattatacgtacgacatttgcg
gcatggcgattgatggaaggagtgccgagcgaagctcgtcactcggccacttgaagctcggTcgActgatcgtcctgtatgactcga
acgacatttgcgtggacgggagagctcaacctgtcgttctcgaaaacgctgcccacggttccaagcAtaccggtggaatatttgcgcttga
ggacggcaacaatattgaagaaatcgccaaagcgtGgaggagggcgggcgggacactcagccggccgacgctcattgaagtaaaaacg
acgattggctacggcgcccaataaagcgggcacgtccggcgtccacgggtcctcggcggcccaagagggcgaagtgacgaaaga
ggcgtatcgttggacatttgcggaagattttacgtgccagaagaagtgtacgccacttccgtgacggtgcaagagccgggagcgaaaaa
agaggcgaatggaatgagcagctcggcctatgaacaggccatccggaactggccgccaattgaagcgagcgtatgaaagcgaac
ttccagatggatgggaagcttcttccgggtatacgaagcaggcaaaagcttggcaaccgctcatcgtccggggaagtgatcaacgccatcg
ccaaagcgggTaccgcaattgttggcgggtcgcggacttggcaagcTcaataaaacgctcatcaaagcggggcaacttctCccggGca
gctacgaagggcgcaacggttgggttggcgtgcgagttgcccattggggggcggcgtgaacggcatggcgcttaccgggggctgaaagtgt
tcggcggcacgttctcgttctcgtactatttgcgtccggcgtatccgcttggcggcgtgatggcttAccgggcatctacgtcttgacgcagc
agcatcggcgtcggcgaagacgggcccggacgacgagccgatcgaacaGctAgcttccgttccggcgtatccgaaacttgcgtcgtcctc
cggctgacgcaaacgaaacggcggcagcatggcggctggcgtcgaatcagcggacaagccgactgctcgtcttgacgcgtcaagatg
tgccgacgttggcggcaacagctgagttggcgtatgaaggcgtgaaaaaggtgcAtaccggttaccggcgaaaaacggcgtccgga
ggcgtctgttggcggactggctcgggaagtcggtctggcgttaaaagcgaagaagcgtcggcgtgaggcattcattcctcgtcag
catgccatcgtgggaccgctcgaagcgcagcaaaatcgtaccgcatgaagtgtcctcggcggcgtgacgaagcggcgtcggcattgaa
atgggcgctcgtcgttgggagcgtacgtcggcggcagggcgacatttggccatcgaccgattcgggtcgtcctcgggagagaaa
atcatggcggagatggttacggttgacaacgctcggcggcacaagcgtcgtcggcaagtaa

Figure 75 : Séquence nucléotidique de mTK_{gst}.

En capitales : nucléotides modifiés ; en orange : sites de restriction supprimés ; en rouge : sites de restriction ajoutés ; en bleu : séquence comportant la Leu382 ; en vert : séquence comportant l'Asp470.

Ensuite, les oligonucléotides dégénérés ont été synthétisés pour les fenêtres KA5 et AN5. La synthèse des oligonucléotides a été commandée à la société MGW avec un taux de dégénérescence de 30 % (Figure 76).

$$\begin{aligned} \mathbf{A} &= \mathbf{A} 77,5\% + \mathbf{C} 7,5\% + \mathbf{G} 7,5\% + \mathbf{T} 7,5\% = \mathbf{A} 70\% + \mathbf{N} 30\% \\ \mathbf{C} &= \mathbf{C} 77,5\% + \mathbf{G} 7,5\% + \mathbf{T} 7,5\% + \mathbf{A} 7,5\% = \mathbf{C} 70\% + \mathbf{N} 30\% \\ \mathbf{G} &= \mathbf{G} 77,5\% + \mathbf{T} 7,5\% + \mathbf{A} 7,5\% + \mathbf{C} 7,5\% = \mathbf{G} 70\% + \mathbf{N} 30\% \\ \mathbf{T} &= \mathbf{T} 77,5\% + \mathbf{A} 7,5\% + \mathbf{C} 7,5\% + \mathbf{G} 7,5\% = \mathbf{T} 70\% + \mathbf{N} 30\% \end{aligned}$$

Figure 76 : Synthèse des oligonucléotides avec un taux de dégénérescence de 30 %

Ainsi pour 15 nucléotides dégénérés, le taux théorique de séquences d'ADN sauvage est de 2 % ($0,775^{15}=0,02$). L'analyse des résultats de séquençage sur un échantillon de 96 clones exprimant les mTK_{gst} mutées montre que la fréquence de mutations obtenue (25 – 27 %) est proche de celle attendue (environ 22,5 %) et que la proportion en TK sauvage (1 %) est acceptable (Tableau 13).

Séquence	nombre de clones	séquencage	fréquence de mutation	Séquence ADN wt	Séquence protéique wt
KA5	200 000	86 bons/96	27 % (théorique : 22,5 %)	0	1%
AN5	200 000	78 bons/96	25 % (théorique : 22,5 %)	0	0

Tableau 13 : Résultats de séquençage de 96 clones issus de la banque CM

2.1.5.2. Préparation des cassettes et clonage

La mutagenèse par cassettes est une méthode largement utilisée, qui implique des étapes de digestion du plasmide portant le gène codant pour la mTK_{gst} , pour l'ouvrir au niveau des sites de restriction, puis la ligation des cassettes amplifiées par PCR dans ce plasmide et enfin la transformation du plasmide obtenu dans une souche de clonage (Figure 72). Cependant ce grand nombre d'étapes limite l'efficacité de cette méthode. C'est pourquoi nous avons décidé de mettre au point une nouvelle méthode utilisant la recombinaison *in vivo*, en se basant sur un protocole décrit dans la littérature.[164]

La recombinaison *in vivo* repose l'utilisation de cellules d'*E. coli* exprimant la λ red recombinase. Ces cellules sont alors transformées avec le plasmide linéarisé amplifié par PCR et avec les cassettes en une seule étape. Cette méthode nécessite que les deux séquences KA5 et AN5 soient incluses sur une même cassette, dont chaque extrémité comporte des séquences homologues au plasmide pour permettre la recombinaison (figure 11).

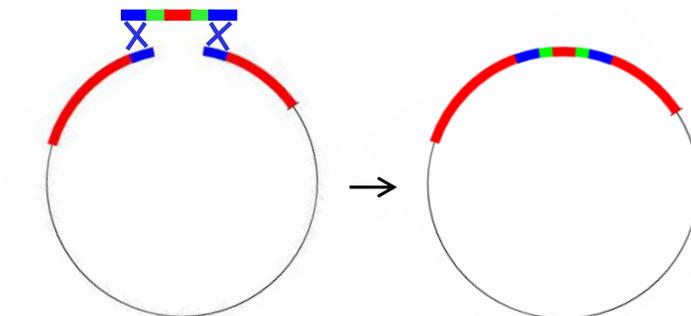


Figure 77 : Principe de la recombinaison *in vivo*

En rouge : le gène de TK_{gst} ; En bleu : les séquences homologues ; En vert : les séquences mutées.

L'obtention des cassettes nécessite la préparation par PCR de trois sous-fragments: le fragment KAAN comportant les deux séquences dégénérées et les fragments H1 et H2 comportant des séquences homologues au plasmide pour permettre la recombinaison (Figure 78). Le fragment KAAN est préparé avec les amorces nommées 4675 et 4255, oligonucléotides qui contiennent chacun les 15 bases dégénérées correspondant aux deux séquences protéiques ciblées KA5 (ADLAS) et AN5 (EDGPT). Le fragment H1 est préparé avec les oligonucléotides 4161 et 4190, et le fragment H2 est préparé avec les oligonucléotides 4191 et 4170. Les cassettes sont alors produites par PCR recombinante en présence des trois fragments KAAN, H1 et H2.



Figure 78 : Obtention des cassettes comportant les deux séquences dégénérées (vert) et les deux séquences homologues au plasmide H1 et H2 (en bleu)

Les cellules d'*E. coli* exprimant la λ red recombinaison sont transformées par le plasmide linéarisé et les cassettes pour la recombinaison. Les nouveaux plasmides obtenus sont extraits puis transformés dans la souche d'expression BL21(DE3) d'*E. coli*. Les clones obtenus ont été mis en culture sur plaque. 7680 colonies (soit 80 plaques 96-puits) ont été sélectionnées.

2.1.5.3. Analyse des biais générés par la méthode CM

Le séquençage de 22 clones exprimant les mTK_{gst} mutées de la banque CM obtenue permet de mettre en évidence un biais de cette méthode. En effet ici, chaque acide aminé n'est pas remplacé systématiquement par les 19 autres comme dans le cas de la mutagenèse par saturation de site, mais des oligonucléotides sont synthétisés avec 15 bases dégénérées. Par conséquent, pour un codon donné, la probabilité de modifier simultanément ses trois nucléotides est très faible.

Par exemple, pour l'Ala380, le codon sauvage est GCG ; on obtient 11 séquences avec le codon GCG, 8 séquences avec un des trois nucléotides muté, 3 séquences avec deux des trois nucléotides mutés et 0 séquence avec les trois nucléotides mutés (Tableau 14).

	KA5										AN5																				
	A380	D381	L382	A383	S384	E469	D470	G471	P472	T473																					
Séquence sauvage	G	C	G	G	A	C	C	T	G	G	C	A	A	G	C	G	A	A	G	A	C	G	G	G	C	C	G	A	C	G	
Séquences mutées	G	C	G	T	A	C	G	T	G	G	C	A	A	G	C	T	A	A	T	A	A	G	G	G	C	C	G	A	A	G	
	G	C	G	G	G	C	C	T	G	A	T	A	A	C	C	G	A	A	G	A	C	G	A	G	C	C	A	A	C	G	
	G	C	G	G	G	C	C	T	G	G	C	A	A	G	C	G	A	A	G	A	C	G	G	C	C	C	T	C	T		
	T	C	G	T	G	A	C	T	G	G	C	T	A	G	C	G	A	A	G	A	C	C	G	G	C	C	C	A	A	G	
	G	G	G	T	A	C	C	T	G	G	C	T	A	T	T	A	A	A	G	A	C	G	G	C	C	G	G	C	A		
	G	C	G	G	T	C	C	T	G	G	G	A	C	T	C	G	A	T	A	A	C	A	G	G	A	C	A	A	C	C	
	G	C	G	C	A	C	C	T	C	G	C	A	A	T	T	G	A	A	G	A	C	G	G	G	C	C	G	A	C	A	
	G	C	A	G	A	T	T	T	G	G	C	A	T	G	C	A	T	C	G	A	C	G	G	G	C	C	C	T	C	A	
	A	C	T	G	A	C	C	T	G	G	C	T	A	T	T	G	A	A	G	A	C	G	C	G	C	C	T	A	C	G	
	G	C	G	G	A	C	C	C	T	T	C	C	T	C	G	A	A	G	A	C	G	A	G	C	G	A	C	G			
	G	C	G	T	A	C	C	T	G	A	C	A	A	G	A	A	A	A	C	T	C	A	T	G	C	C	T	A	C	G	
	A	C	G	G	A	C	T	T	A	G	C	A	A	G	C	T	G	A	G	A	C	G	C	G	C	G	G	G			
	G	C	G	G	T	C	C	G	G	C	T	A	T	C	G	A	A	A	A	C	C	A	G	C	C	G	A	C	G		
	G	C	G	G	T	C	C	G	G	C	T	A	T	C	G	A	A	A	A	C	C	A	G	C	C	G	A	C	G		
	G	C	G	G	T	C	C	G	G	C	T	A	T	C	G	A	A	A	A	C	C	A	G	C	C	G	A	C	G		
	G	C	G	G	T	C	C	T	T	T	C	A	A	G	T	C	A	A	G	A	C	A	G	G	C	C	G	T	C	G	
	G	C	G	G	A	C	T	T	T	C	A	A	G	T	G	A	A	G	A	C	A	G	G	C	C	G	A	T	G		
	A	C	C	G	A	A	C	T	A	A	T	T	A	G	C	T	A	A	G	A	C	G	G	G	C	A	G	A	C	T	
	A	C	G	G	T	C	C	T	G	C	C	C	G	G	G	T	A	A	C	A	T	G	G	G	T	C	G	C	A	G	
	G	C	A	G	A	G	A	T	A	G	C	G	A	T	C	C	A	A	G	C	C	G	G	G	C	C	G	A	G	G	
	A	C	G	G	T	C	C	T	T	G	G	A	A	G	C	C	A	T	G	A	C	G	G	G	C	C	G	A	C	G	
	G	C	G	G	A	T	C	T	G	G	C	A	A	A	C	G	A	A	C	A	C	T	G	T	C	C	G	A	C	T	
	C	G	G	T	T	C	A	T	G	G	C	A	A	A	C	G	C	A	C	C	C	C	C	C	G	C	T	G	G	C	G
	G	G	G	G	A	C	C	T	G	G	C	A	C	C	C	A	A	G	G	T	C	A	G	T	C	A	A	A	C	G	

Tableau 14 : Données obtenus après séquençage de 22 clones issus de la banque CM

Suivant la position du ou des nucléotides mutés dans le codon, la ou les mutations donneront ou non un acide aminé muté. En effet, pour muter l’Ala380 comme pour la plupart des acides aminés, il faut muter le premier et/ou le deuxième nucléotide (voir tableau du code génétique en annexe). Pour l’Ala380, le séquençage montre que sur les 11 codons mutés, 2 ont une mutation silencieuse, c’est-à-dire une mutation en troisième position.

Nous avons vu avec l’exemple de l’Ala380 qu’en utilisant des oligonucléotides avec un taux de dégénérescence de 30% pour un codon donné, un seul nucléotide est souvent muté. Dans ce cas, à cause de la dégénérescence du code génétique, si le premier nucléotide est muté, une serine, une proline ou une thréonine sera obtenue ; et, si le deuxième nucléotide est muté, une valine, un glutamate ou une glycine sera obtenu (e). Pour obtenir les autres acides aminés, il faut avoir deux ou trois nucléotides mutés, ce qui est moins fréquent (Tableau 15)

Résidu Position	A 380	D 381	L 382	A 383	S 384	E 469	D 470	G 471	P 472	T 473
A	0,59	0,00	0,00	0,59	0,00	0,05	0,05	0,09	0,00	0,09
R	0,05	0,00	0,05	0,00	0,05	0,00	0,00	0,14	0,00	0,05
N	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00
D	0,00	0,32	0,00	0,00	0,00	0,05	0,59	0,00	0,00	0,00
C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00
Q	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00	0,05	0,09	0,05
E	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,41	0,00	0,09	0,00	0,00
G	0,09	0,14	0,00	0,09	0,05	0,00	0,00	0,45	0,00	0,05
H	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,05	0,09	0,00	0,00	0,00
I	0,00	0,00	0,05	0,09	0,23	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00
L	0,00	0,00	0,77	0,00	0,05	0,00	0,05	0,00	0,05	0,00
K	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,09
M	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,05
F	0,00	0,05	0,00	0,05	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P	0,00	0,00	0,05	0,05	0,05	0,00	0,05	0,05	0,77	0,00
S	0,05	0,00	0,00	0,09	0,36	0,00	0,00	0,05	0,05	0,14
T	0,23	0,00	0,00	0,05	0,05	0,00	0,00	0,00	0,05	0,50
W	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Y	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
V	0,00	0,18	0,05	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00
STOP	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,18	0,05	0,00	0,00	0,00
Taux de mutation	0,41	0,68	0,23	0,41	0,64	0,59	0,41	0,55	0,23	0,50

Tableau 15 : Taux de présence de chaque acide aminé dans la banque CM

Les résultats du Tableau 15 montrent que le taux de mutation pour chaque position est très variable : de 23 % à 68 %. Pour la Leu382, le faible taux de mutation peut s'expliquer par le fait que la Leucine est codée par 6 codons alors que la plupart des acides aminés sont codés par 4 codons. Ainsi pour ce résidu, la mutation du premier nucléotide peut être silencieuse.

2.1.6. Mise au point d'un protocole de culture et de lyse en vue du criblage des banques SSM et CM

Les banques SSM et CM ayant été produites, des protocoles de culture et de lyse des clones de ces deux banques exprimant les mTK_{gst} mutées ont été mis au point, d'une part de manière à optimiser le nombre d'étapes étant donné le grand nombre de clones à cribler et d'autre part afin d'obtenir les extraits enzymatiques dans un milieu non tamponné, généralement défavorable à la stabilité des protéines, mais qui est un pré-requis pour la mise en œuvre du test de criblage présenté par la suite.

Les cultures sont réalisées dans du milieu LB-kanamycine en présence d'IPTG (inducteur) sous agitation à 30°C durant une nuit dans des plaques 96-puits « deepwell ». L'IPTG, a été introduit dès le début des cultures afin d'éviter le suivi de la densité optique (DO) à 600 nm au cours du temps et l'ajout de ce dernier lorsque l'absorbance atteint une valeur d'environ 0,7, comme c'est le cas dans les protocoles traditionnels.

Ensuite, une méthode récemment publiée a été adoptée pour la lyse des cellules.[165] Ce protocole présente deux avantages. Tout d'abord, il permet de s'affranchir de l'utilisation des ultra-sons pour la lyse des cellules, étape matériellement limitante pour un grand nombre de clones à lyser. De plus, ce protocole permet d'obtenir les extraits enzymatiques dans un milieu faiblement tamponné tout en évitant la dénaturation des protéines durant la durée du criblage. Pour cela, les cellules sont mises en suspension dans une solution de BugBuster® 1/10^e commercialisée par la société Merck, à laquelle 0,5 mg/ml de lysozyme et 4 U/ml d'endonucléase benzonase ont été ajoutés. La suspension cellulaire est agitée à température ambiante pendant 1 h. L'examen microscopique montre qu'après cette durée pratiquement toutes les cellules de l'hôte d'*E. coli* ont été lysées.

Les banques SSM ont été cultivées et lysées respectivement dans les deux laboratoires à Darmstadt et à Clermont-Ferrand. Dans ce cas, les clones sont obtenus à partir de cultures de volumes de 400 µL de milieu, conduisant chacune à environ 100 µL de lysat (contenant environ 2,5 mg.mL⁻¹ de protéines), disponibles pour le criblage immédiat (Figure 79).

En revanche, la culture et la lyse des clones de la banque CM ont été réalisées au Genoscope à Evry. Les cultures ont été réalisées dans des volumes de 1,6 mL et ont permis d'obtenir 300 µL de lysat cellulaire (contenant environ 2,4 mg.mL⁻¹ de protéines) pour chaque clone. Puis, 20 % de glycérol et les cofacteurs ont été ajoutés pour limiter la perte d'activité de la protéine lors de la congélation à - 80°C et de l'envoi des lysats à Darmstadt et à Clermont-Ferrand (Figure 79).

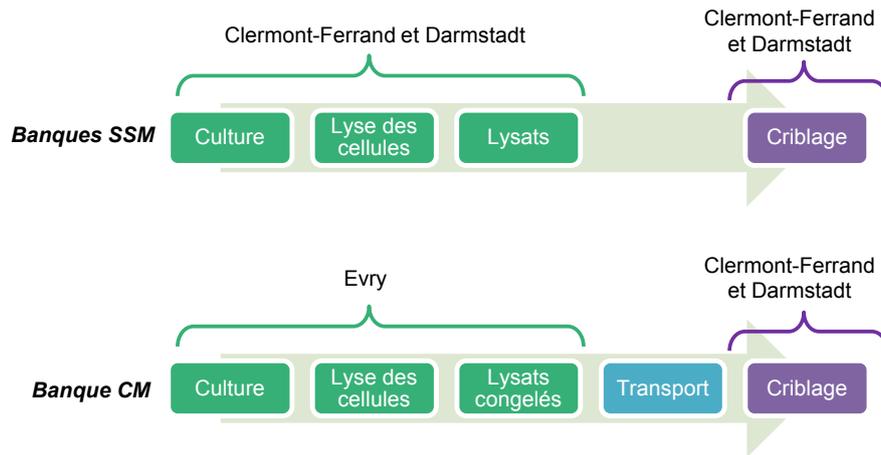


Figure 79 : Obtention des lysats pour le criblage des banques SSM et CM réalisés par les deux partenaires Clermont-Ferrand et Darmstadt

2.1.7. Conclusion

Un modèle structural de mTK_{gst} a été construit par homologie de séquence avec la TK_{ban} indiquant que les résidus clés du site actif de cette TK intervenant dans le mécanisme catalytique et la reconnaissance des substrats sont identiques à ceux des TK_{sco} et TK_{eco} . L'étude du site actif de la mTK_{gst} en présence d'un substrat accepteur physiologique d'une part et du substrat d'intérêt, le L-(2S)-glycéraldéhyde vis-à-vis duquel une activité accrue de la mTK_{gst} est recherchée, a permis de mettre en évidence deux positions clés, Leu382 et Asp470, qui auraient un rôle stratégique pour l'inversion de l'énantiosélectivité de l'enzyme.

Des banques de mTK_{gst} mutées dans ces positions ont été obtenues selon deux approches différentes (Tableau 16). D'une part, une approche par saturation de site (SSM) dirigée sur les deux positions L382 et D470 a conduit à l'obtention de trois banques : deux banques de saturation de site sur chacune des positions respectives (192 clones chacune) et une banque dans laquelle les deux positions ont été mutées simultanément (3456 clones). D'autre part, une banque de mutagenèse par cassettes (CM), dans laquelle des séquences de cinq résidus ont été modifiées autour des positions Leu382 et Asp470 afin d'étendre l'effet coopératif des mutations en ces deux positions à d'autres résidus proches (7680 clones). Cette technique crée des mutations aléatoires sur les séquences sélectionnées et non systématiques sur chaque position.

Dénomination de la banque	Technique de mutagenèse	Position(s) mutée(s)	Nombre de clones
SSM-L382	Saturation de site (SSM)	Leu382	192 (2 plaques 96-puits)
SSM-D470	Saturation de site (SSM)	Asp470	192 (2 plaques 96-puits)
SSM-L382D470	Saturation de site (SSM)	Leu382 et Asp470	3 456 (38 plaques 96-puits)
CM	Mutagenèse par cassette (CM)	Ala380 à Ser384 (ADLAS) Glu469 à Thr473 (EDGPT)	7 680 (80 plaques 96-puits)

Tableau 16 : Différentes banques de mTK_{gst} mutées obtenues par SSM et CM

Les techniques de biologie moléculaire développées ici et en particulier la CM ont nécessité de nombreuses expériences d'optimisation mais les méthodes mises au point pourront à l'avenir être utilisées pour de nouvelles expériences de mutagenèse sur la mTK_{gst}.

Enfin, les protocoles de culture et de lyse des clones ont été optimisés afin de minimiser leur temps de mise en œuvre en vue du criblage des banques de mTK_{gst} mutées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et d'autres aldéhydes α -hydroxylés de configuration (2S).

2.2. Développement d'un test pH-métrique pour la TK

2.2.1. Introduction

Afin d'évaluer l'activité des banques d'enzymes mutées vis-à-vis d'un ou de plusieurs substrats, il est nécessaire de disposer de méthodes génériques pour le criblage haut-débit. Ces méthodes doivent être rapides, sensibles, fiables et applicables à un large spectre de substrats.

Il existe de nombreux tests permettant de déterminer l'activité de la TK, décrits dans la partie bibliographique. Certains de ces tests permettent un dosage en continu du produit de réaction, comme les tests spectrophotométriques en présence de NADH [24, 107, 108] ou le test fluorogénique basé sur la libération de l'umbelliférone,[110, 111] mais ils sont hautement spécifiques de substrats donnés, et ne peuvent pas être envisagés pour le criblage d'autres composés. Des stratégies de dosage discontinu soit du substrat restant, soit du produit formé ont été décrites dans la littérature. Par exemple, le Li-HPA restant peut être dosé par spectroscopie UV [166] ou par voie enzymatique en présence de la LDH et du NADH.[167] Ou encore, les substrats et/ou les produits peuvent être suivis par chromatographie HPLC ou GC.[118, 119, 168] Enfin, un test de criblage colorimétrique a été développé pour la détection du produit formé en présence de rouge de tétrazolium. [114] Cependant cette méthode nécessite un traitement intermédiaire du milieu réactionnel pour éliminer le substrat donneur n'ayant pas réagi, et est de plus limitée aux substrats aldéhydiques non- α -hydroxylés. Ces méthodes discontinues sont fastidieuses à mettre en œuvre car elles nécessitent des étapes intermédiaires chimiques ou enzymatiques, ce qui par ailleurs augmente les sources d'erreurs expérimentales. A l'heure actuelle, il n'existe donc pas de test permettant de déterminer quantitativement l'activité de la TK et alliant toutes les qualités requises pour le criblage à haut débit de banques d'enzymes mutées.

Nous avons envisagé de développer un nouveau test d'activité simple à mettre en œuvre, applicable à des substrats accepteurs variés et permettant de mesurer l'activité de la TK en continu, dans le cadre d'un criblage à haut débit. Le Li-HPA étant utilisé dans les réactions de synthèse car il rend la réaction irréversible, il nous a semblé primordial d'utiliser ce même substrat donneur pour le test d'activité de la TK. Nous nous sommes alors orientés vers le suivi pH-métrique de la réaction catalysée par la TK en présence d'un indicateur coloré, permettant ainsi de s'affranchir de l'utilisation d'enzymes auxiliaires. Ce test a été optimisé

indépendamment pour son utilisation dans deux cas de figure : i) pour mesurer quantitativement l'activité enzymatique d'une TK donnée vis-à-vis de substrats accepteurs variés, ii) pour cribler un très grand nombre de TK, telles que nos banques de TK mutées, vis-à-vis d'un substrat accepteur donné afin d'en identifier les TK les plus performantes.

2.2.2. Principe du test

Lors de la réaction catalysée par la TK en présence de Li-HPA comme donneur, un proton H^+ est consommé à chaque cycle ce qui libère un équivalent d'ions bicarbonates HCO_3^- entraînant l'augmentation du pH dans le milieu (Figure 80).

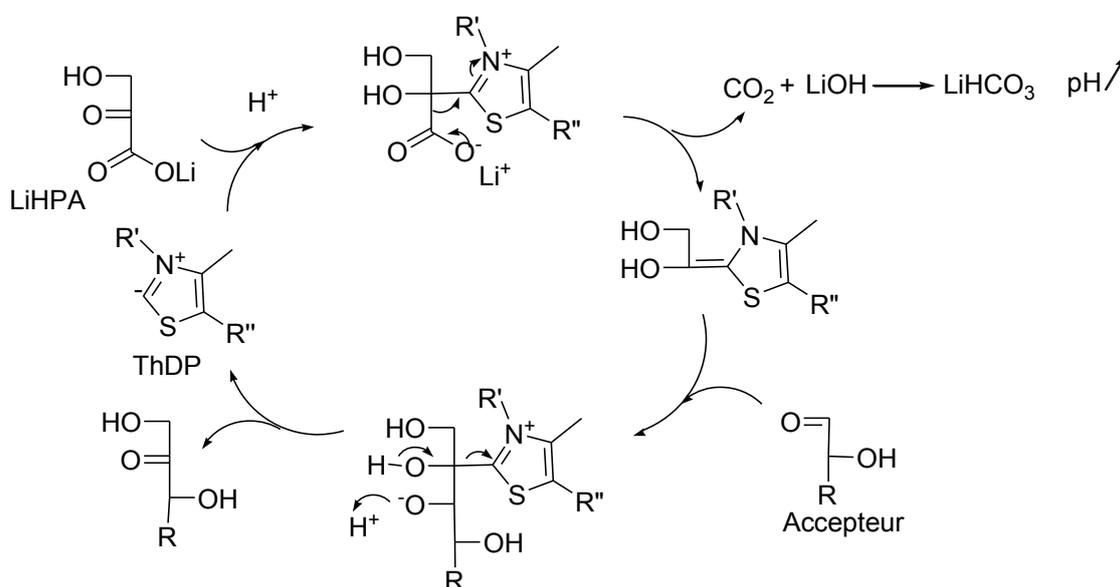


Figure 80 : Cycle catalytique de la TK en présence du Li-HPA [54]

En effet, l'ion bicarbonate est la forme dissociée de l'acide carbonique et il est impliqué dans un équilibre dynamique de dissociation dans l'eau qui conduit à une basification de la solution en raison de la formation partielle d'ion hydroxyde au pH du milieu qui est d'environ 7,5 (Figure 81).



Figure 81 : Equilibre de dissociation de l'ion bicarbonate en solution dans l'eau

Si la variation du pH de la réaction catalysée par la TK est habituellement compensée au moyen d'un pH-stat ou d'un tampon afin d'éviter l'inactivation de l'enzyme à pH élevé, elle permettra au contraire ici de suivre l'avancement de la réaction, en présence d'un indicateur pH-métrique approprié.

Le changement du pH du milieu réactionnel au cours de réactions enzymatiques a déjà été exploité pour la détermination de l'activité de nombreuses enzymes catalysant des réactions diverses telles que l'hydrolyse d'un ester,[169, 170] le transfert d'un groupement phosphoryle,[171] d'un groupement nucléotidyle,[172] ou d'un groupement glycosyle [165, 173] ainsi que des réactions de décarboxylation. Les méthodes basées sur un dosage pH-métrique présentent de nombreux avantages : les indicateurs pH-métriques sont peu coûteux, les enzymes auxiliaires ne sont pas nécessaires, les vitesses initiales de réaction peuvent être suivies en temps réel et les tests peuvent être effectués en microplaques.

Un test pH-métrique de la TK a été décrit dans la littérature utilisant le *p*-nitrophénol comme indicateur.[174] Cependant, ce test présente une faible sensibilité (d'au moins un ordre de magnitude de moins que les tests en présence de NADH) et son changement de couleur de l'incolore au jaune pâle, ne permet pas de visualiser aisément si une réaction a lieu. Nous avons donc mis au point un nouveau test d'activité basé sur un autre indicateur colorimétrique, le rouge de phénol. Ce travail a été mené en parallèle avec l'équipe du Pr. W.-D. Fessner de l'Université de Darmstadt (Allemagne), notre partenaire dans ce projet.

Nous avons dans un premier temps développé ce test pH-métrique pour la détermination quantitative des activités des TK sauvages purifiées vis-à-vis de divers aldéhydes. Puis dans un second temps, nous avons modifié les paramètres de ce test afin de l'adapter au criblage de lysats cellulaires vis-à-vis du L-glycéraldéhyde, en vue du criblage des banques de mTK_{gst} mutées pour l'amélioration de l'activité de la mTK_{gst} vis-à-vis de cet aldéhyde (test qualitatif). Enfin dans un troisième temps, nous avons amélioré le test pH-métrique quantitatif initialement développé afin de l'adapter à la détermination des activités des mTK_{gst} mutées purifiées sélectionnées à l'issue du crible qualitatif.

2.2.3. Paramètre du test pH-métrique pour la quantification des activités de la TK

Dans cette partie, seront présentés l'optimisation des différents paramètres du test, notamment le choix du système tampon-indicateur coloré, puis les expériences de calibration

permettant d'utiliser le test de manière quantitative pour la mesure l'activité des TK et enfin la vérification de la fiabilité du test par comparaison des constantes cinétiques déterminées par ce test avec celles décrites dans la littérature vis-à-vis de divers aldéhydes.

Les expériences d'optimisation des paramètres ont été réalisées de part et d'autre des laboratoires de Darmstadt et de Clermont-Ferrand, puis dans le but d'obtenir un protocole commun entre les deux laboratoires, j'ai eu l'opportunité d'effectuer une mission de deux semaines à l'Université de Darmstadt, dans l'équipe du Pr. W.D. Fessner durant laquelle les expériences de calibration du test ont été réalisées.

La mTK_{gst} purifiée par IMAC a été utilisée comme modèle pour la mise au point du test.

2.2.3.1. Choix du système tampon-indicateur coloré

Les paramètres les plus importantes d'un test pH-métrique sont les choix du tampon et de l'indicateur coloré. Ceux-ci doivent avoir des pK_a les plus proches possible afin que le changement de couleur soit proportionnel à la consommation en protons.[169] Dans notre cas, nous avons décidé d'optimiser le test pour un pH 7,5, qui est le pH optimal pour la plupart des réactions catalysées par les TK connues. L'indicateur coloré présentant la zone de virage la plus proche de ce pH est le rouge de phénol dont la zone de virage est de 6,8 à 8,4. De plus, le rouge de phénol sous sa forme déprotonée présente un coefficient d'extinction élevé de $56\ 000\ M^{-1}.s^{-1}$ à 557 nm ce qui permet de le détecter par spectrophotométrie.[171] Enfin, il offre un large spectre de couleurs puisqu'il vire du jaune vif au rose vif avec l'augmentation du pH ce qui permet une observation visuelle plus aisée que dans le cas du *p*-nitrophénol déjà utilisé dans la littérature avec la TK.

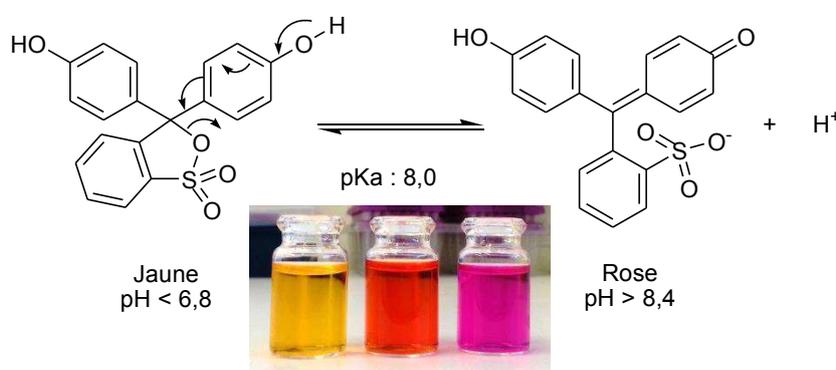


Figure 82 : Equilibre acido-basique du rouge de phénol

Le pK_a du rouge de phénol étant de 8,0 nous avons envisagé des tampons de pK_a voisins : le Gly-gly (pK_a 8,17), le Tris (pK_a 8,07) et l'HEPES (pK_a 7,55) (Figure 83). La présence d'un tampon est indispensable pour deux raisons. Premièrement son absence engendrerait des fluctuations de couleur de l'indicateur pH-métrique à la moindre variation des conditions réactionnelles et du fait de la dissolution du CO_2 de l'air dans le milieu.[175] Deuxièmement, le pH ne doit pas subir une augmentation trop importante afin de maintenir l'activité de la TK dont le pH optimal est autour de 7,5. Cependant, une trop forte concentration en tampon est néfaste car elle empêcherait tout changement de pH dans le milieu.

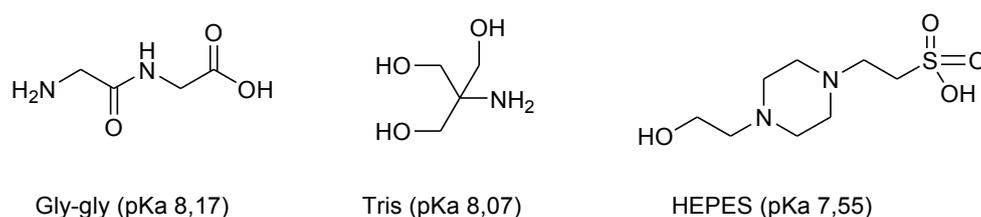


Figure 83 : Structures et pK_a des tampons envisagés

Ainsi, une première série d'expériences a consisté à rechercher la concentration en tampon la plus faible telle que l'activité enzymatique soit maintenue. La TK_{eco} purifiée, la seule disponible au début des travaux, a été utilisée comme modèle et son activité a été mesurée avec le test $_{NADH}$ en présence des tampons précédemment cités, pour des concentrations de 100 mM à 2 mM en tampon (Figure 84).

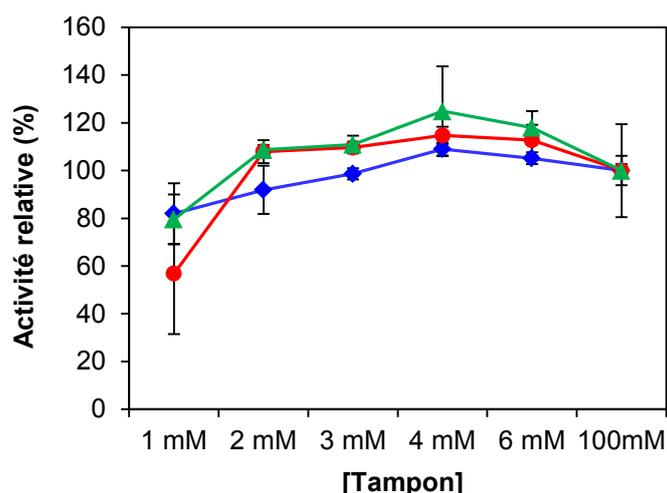


Figure 84 : Activité de la TK_{eco} en fonction de la nature et de la concentration du tampon
 ◆ Tris, ● Gly-gly, ▲ HEPES ; L'activité relative de 100 % représente l'activité mesurée avec le test $_{NADH}$ pour une concentration de 100 mM dans chacun des tampons

L'expérience montre que l'activité de la TK_{eco} est constante de 100 mM à 2 mM en tampon mais diminue en dessous de cette concentration. Les résultats montrent également que la nature du tampon n'a pas d'influence sur l'activité enzymatique. Ainsi nous avons choisi le tampon Tris car son pK_a est le plus proche de celui du rouge de phénol, et avons fixé sa concentration à 2 mM.

La concentration du tampon ayant été choisie, nous avons réalisé des premiers essais en présence de rouge de phénol, du Li-HPA et des aldéhydes accepteurs tels que le glycolaldéhyde et le D,L-glycéraldéhyde, car ce sont bons substrats de la TK et peu coûteux.

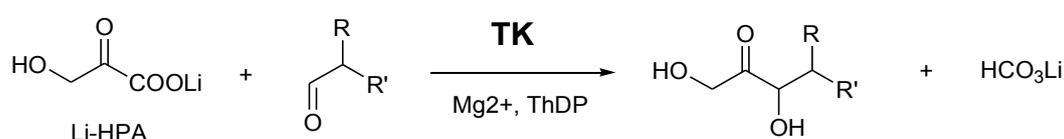


Figure 85 : Réaction catalysée par la TK en présence de Li-HPA et d'un aldéhyde

Cependant, lors de la mise en pratique du test, une diminution de l'absorbance a été observée dans les premières minutes, avant même l'ajout de Li-HPA (Figure 86). Cette décroissance, conduisant à un palier au bout de quelques minutes, apparaît pour les mélanges témoins contenant le tampon Tris et soit un aldéhyde, soit le Li-HPA. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'amine primaire présente dans le Tris réagit lentement avec le carbone électrophile de la fonction carbonyle des aldéhydes ou du Li-HPA pour former des composés de type héli-aminal et imine qui, du fait de leur basicité moins élevée entraînent une diminution du pH et donc de l'absorbance du rouge de phénol à 560 nm (Figure 87).[176]

Ainsi, nous avons finalement opté pour l'utilisation du tampon triéthanolamine (TEA) car d'une part il ne comporte pas d'amine primaire et d'autre part son pK_a (7,74) est proche de ceux du Tris et du rouge de phénol. La Figure 86 montre en effet que l'absorbance du rouge phénol en présence du mélange contenant le tampon TEA et un aldéhyde est stable.

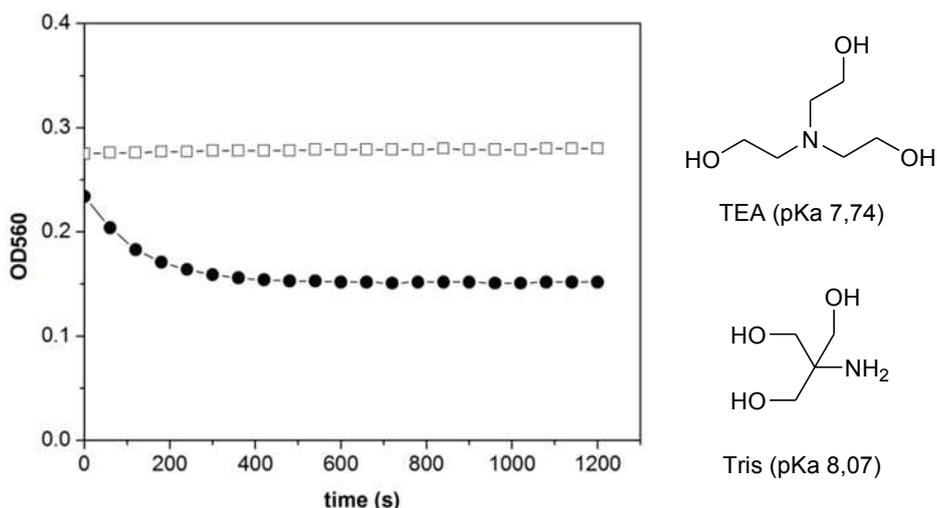


Figure 86 : Variation de l'absorbance initiale à 560 nm en présence de tampons aminés [155]

● Tris (2 mM, pH 7,5) ; □ TEA (2 mM, pH 7,5) ; Le milieu contient 28 μM de rouge de phénol, 50 mM de glycolaldéhyde et le tampon. Volume total : 200 μL

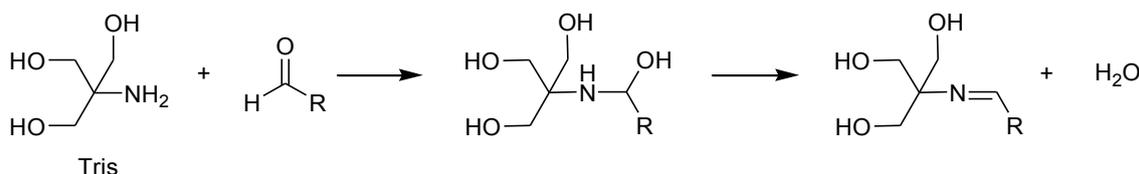


Figure 87 : Réaction entre le Tris et un aldéhyde

En résumé, le test pH-métrique sera effectué en microplaques 96-puits dans les conditions suivantes :

Rouge de phénol	28 μM
ThDP	2,4 mM
MgCl ₂	9 mM
Li-HPA	50 mM
tampon TEA	2 mM
Aldéhydes	Concentrations variables
TK purifiée	Concentrations variables
Volume total	200 μL
pH	7,5
Mesure	Suivi de l'absorbance à 560 nm au cours du temps et détermination de la pente initiale

Tableau 17 : Résumé des paramètres du test pH-métrique pour la détermination de l'activité TK

L'absorbance du milieu à 560 nm sera mesurée par un lecteur de microplaques, à 28 °C (température de fonctionnement de l'appareil).

2.2.3.2. Calibration du test

Lorsque l'indicateur pH-métrique est l'unique source de protons du milieu, la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration de la forme déprotonnée de l'indicateur (notée I^-). La vitesse est alors directement reliée à l'absorbance (A) à la longueur d'onde correspondante par la loi de Beer-Lambert :

$$vitesse = \frac{\Delta[I^-]}{dt} = \frac{\Delta A/dt}{\epsilon \cdot \ell} \quad (2)$$

Avec ϵ , le coefficient d'extinction molaire et ℓ la hauteur du puits

Cependant dans notre cas, d'autres espèces dans le milieu peuvent interagir avec les protons, comme le tampon TEA et le Li-HPA ($pK_a < 2$) ce qui rend l'équation de la vitesse en fonction de l'absorbance trop complexe. Dans ce cas il est alors nécessaire d'effectuer des expériences de calibration du test.[152] Nous avons tout d'abord calibré le test en présence d'ions HCO_3^- pour simuler l'avancement de la réaction et corrélérer l'absorbance à l'activité, puis nous avons vérifié la zone de linéarité du test en faisant varier la quantité d'enzyme.

Calibration en présence des ions bicarbonates

Contrairement aux réactions usuellement suivies en présence du rouge de phénol et libérant des acides ou bases fortes (H^+ ou OH^-), la réaction catalysée par la TK libère du bicarbonate (HCO_3^-), qui est une base faible. Ainsi, la courbe de calibration de l'absorbance à 560 nm en fonction de la concentration en ions HCO_3^- a été déterminée (Figure 88). Le milieu contient tous les réactifs du test sauf l'aldéhyde accepteur, et différentes concentrations en $NaHCO_3$ allant de 0 à 0,8 mM, afin de mimer une conversion de 15 % de Li-HPA par la TK en vitesse initiale. Le bicarbonate de sodium est utilisé en remplacement du bicarbonate de lithium qui n'est pas commercial.

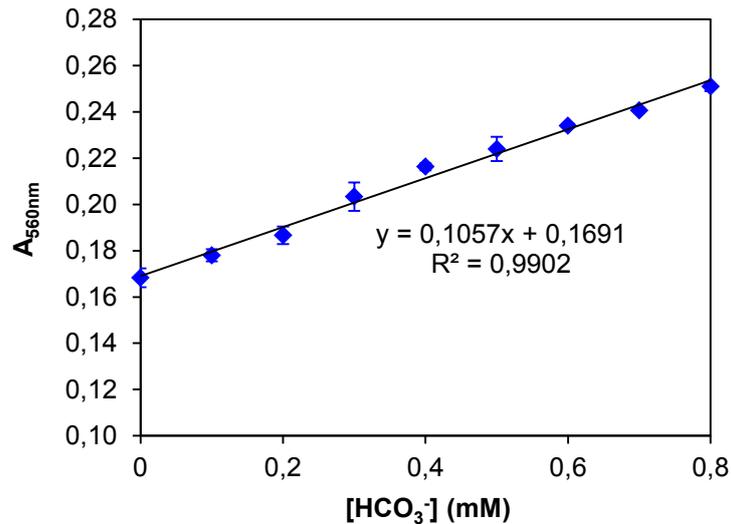


Figure 88 : Courbe de calibration en présence de NaHCO₃

Le milieu contient 28 μM de rouge de phénol, 14 μg de mTK_{gst} purifiée par IMAC, 2,4 mM de ThDP, 9 mM de MgCl₂, 50 mM de Li-HPA, 2 mM de tampon TEA et 0 – 0,8 mM de NaHCO₃. Volume total : 200 μL

Cette droite de calibration est linéaire sur la gamme de concentrations étudiée et sa pente indique que la formation d' 1 mM d'ions HCO₃⁻ correspond à une augmentation de l'absorbance de 0,1057 UA (unités d'absorbance). Ce test est donc moins sensible qu'un test en présence de NADH dans lequel 1 mM de produit formé correspond à une variation d'absorbance de 3,5 UA.

La limite de détection (LOD) de 0,06 mM en ions HCO₃⁻ formés a été calculée à partir de la régression linéaire de cette droite.[177] Elle correspond à une variation d'absorbance de 0,006 UA. La limite de quantification (LOQ), définie ici comme trois fois la valeur de la LOD, vaut alors 0,18 mM, ce qui correspond à une variation d'absorbance de 0,019 UA. En d'autres termes, cela signifie qu'une variation d'absorbance sera considérée différente du bruit de fond si elle dépasse 0,006 UA et qu'elle pourra être raisonnablement quantifiable à partir de 0,019 UA.

La droite de calibration ainsi définie permettra donc de quantifier l'activité enzymatique à partir de l'absorbance à 560 nm au cours du temps grâce à l'équation (3). Une unité (U) correspondra à la formation d' 1 μmol d'ions HCO₃⁻ par minute, dans les conditions du test.

$$\text{Activité (U)} = \frac{\Delta A_{560}}{dt} (\text{UA} \cdot \text{min}^{-1}) \times \frac{1}{0,1057 (\text{UA} \cdot \text{mM}^{-1})} \times V_{\text{puits}} (200 \cdot 10^{-6} \text{L}) \times 10^{-3} \quad (3)$$

Calibration en fonction de la quantité de TK

La linéarité du test a ensuite été vérifiée en mesurant l'activité de la mTK_{gst} , l'enzyme d'intérêt de ces travaux, en fonction de la quantité de protéines en μg . Pour cela, différentes quantités de mTK_{gst} purifiée (de 3 à 14 μg) ont été mises en présence de 50 mM de D,L-glycéraldéhyde, dans les conditions du test décrites dans le Tableau 17. Le D,L-glycéraldéhyde a été choisi car c'est un bon substrat de la TK, mais moins bon que le glycolaldéhyde qui aurait nécessité une dilution importante de l'enzyme pour avoir une pente mesurable. De plus, ce substrat est peu coûteux, contrairement au D-glycéraldéhyde. Les pentes ($UA \cdot min^{-1}$) ont été mesurées pour chacune des quantités en mTK_{gst} (Figure 89a et Figure 89b) puis l'équation (3) a été utilisée pour convertir ces pentes en activité (U) (Figure 89c).

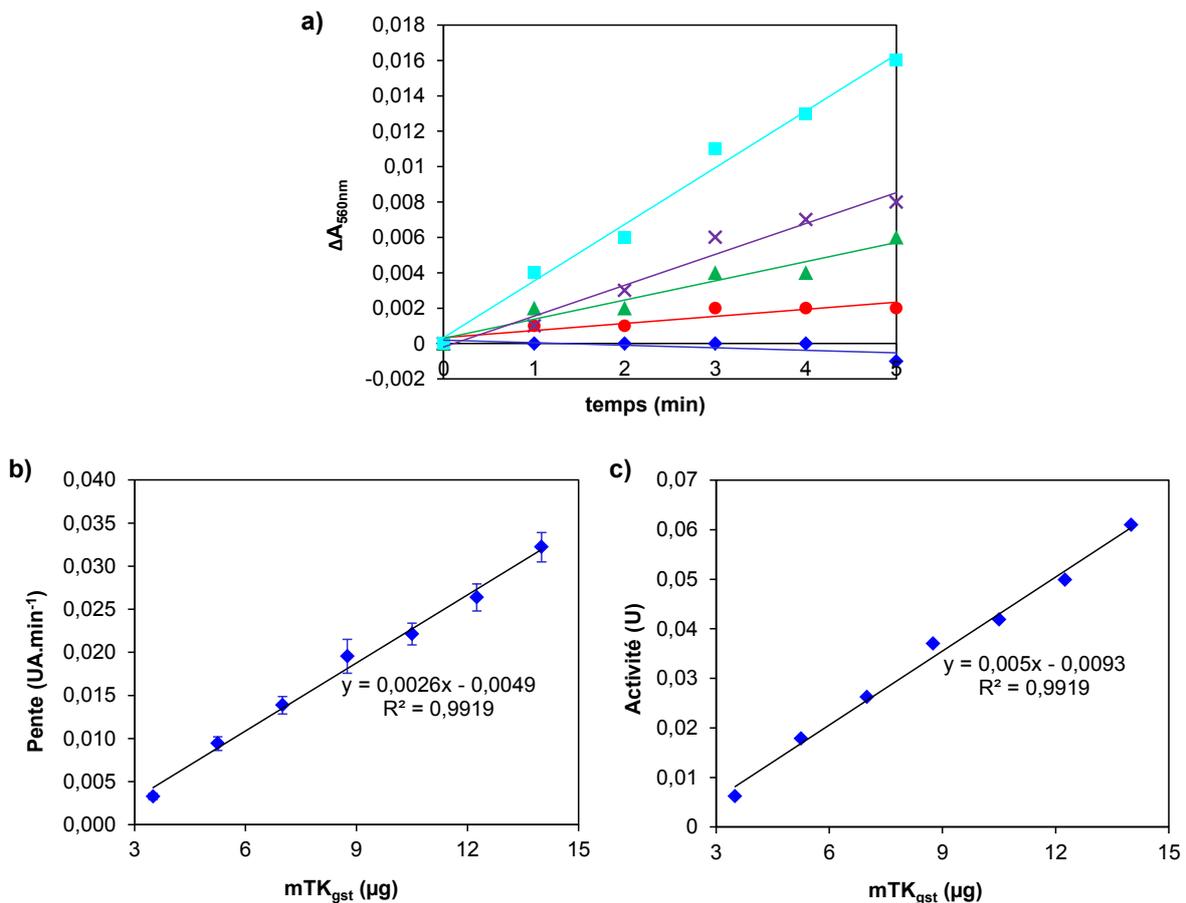


Figure 89 : Courbes de calibration en fonction de la quantité de mTK_{gst}

Le milieu contient 28 μM de rouge de phénol, 2,4 mM de ThDP, 9 mM de $MgCl_2$, 50 mM de D,L-glycéraldéhyde, 50 mM de Li-HPA, 2 mM de tampon TEA pH 7,5 et 0 – 14 μg de mTK_{gst} purifiée. Volume total : 200 μL . **a)** Variation de l'absorbance à 560 nm au cours du temps pour différentes quantités de mTK_{gst} purifiée : \blacklozenge 0 μg , \bullet 1,75 μg , \blacktriangle 3,5 μg , \times 5,25 μg , \blacksquare 12,25 μg ; **b)** Pentes des courbes de (a) en fonction de la quantité de mTK_{gst} ; **c)** Activités en fonction de la quantité de mTK_{gst} , calculées à partir des pentes (b)

L'activité mesurée (en U) est bien proportionnelle à la quantité de mTK_{gst} mise en jeu, ce qui prouve que ce test peut être utilisé pour la détermination quantitative de l'activité de la TK. La régression linéaire correspondante a permis de déterminer une LOD de 4,7 mU (correspondant à une pente de $0,0025 \text{ UA}\cdot\text{min}^{-1}$) et une LOQ de 14,1 mU (correspondant à une pente de $0,0075 \text{ UA}\cdot\text{min}^{-1}$). Cela signifie que l'activité minimale qui peut être mesurée dans un puits est de 14,1 mU.

2.2.3.3. Evaluation du test : détermination de constantes cinétiques

Afin d'évaluer l'exactitude des mesures résultant de ce nouveau test d'activité pH-métrique, nous avons comparé les constantes cinétiques de quelques substrats de TK connues (TK_{eco} et TK_{sce}) existantes dans la littérature et obtenues avec d'autres tests avec celles mesurées avec ce test colorimétrique. De bons substrats accepteurs ont été choisis : le glycolaldéhyde, le D- et le D,L-glycéraldéhyde et le D-érythrose, et ont été mis en présence du Li-HPA comme substrat donneur. Les constantes cinétiques ont été déterminées en faisant varier la concentration du substrat et en maintenant tous les autres paramètres du test constants (Tableau 18). Cette étude a été réalisée par le Dr D. Yi, alors en thèse dans l'équipe du Pr. W.-D Fessner (Université de Darmstadt).

Les K_M concernant la TK_{sce} correspondent tout à fait à ceux décrits dans la littérature [24] : 21 mM pour le glycolaldéhyde contre 21 mM dans la littérature et 214 mM pour le D-érythrose contre 214 mM dans la littérature. De même pour la TK_{eco} , le K_M mesuré avec le test pH-métrique est de 13 mM pour le glycolaldéhyde contre 14 mM dans la littérature.[24] Dans les cas du D,L-glycéraldéhyde et du L-érythrose, les K_M sont cependant supérieurs à ceux indiqués dans la littérature : respectivement 57 mM contre 10 mM, et 194 mM contre 150 mM.[24]

	TK_{sce}			TK_{eco}		
	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ ·mM ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ ·mM ⁻¹)
Glycolaldehyde CHO-CH ₂ OH	21 ± 2	29 ± 2	1,4	13 ± 2	34 ± 2	2,6
D-glycéraldehyde CHO-CHOH(R)-CH ₂ OH	40 ± 2	24 ± 1	0,61	48 ± 4	32 ± 1	0,67
D,L-glycéraldehyde CHO-CHOH(R,S)-CH ₂ OH	45 ± 4	11 ± 1	0,24	57 ± 6	11 ± 1	0,20
D-érythrose CHO-CHOH(R)-CHOH(R)-CH ₂ OH	214 ± 17	39 ± 2	0,18	194 ± 33	38 ± 4	0,20

Tableau 18 : Détermination des paramètres cinétiques pour les TK_{sce} et TK_{eco} [151]

Ainsi, le test pH-métrique est considéré comme suffisamment fiable pour la mesure quantitative des constantes cinétiques vis-à-vis des aldéhydes accepteurs et la comparaison de ces valeurs entre elles avec un même test commun, tout en étant plus facile et rapide à mettre en œuvre que les méthodes conventionnelles, généralement basées sur l'utilisation de sucres phosphorylés très coûteux et en présence d'enzymes auxiliaires fonctionnant en présence de NADH comme cofacteur.[24]

1.1.3.4. Evaluation du test vis-à-vis de divers substrats accepteurs

Une étude a été réalisée avec ce nouveau test pH-métrique par nos partenaires de l'Université de Darmstadt sur large gamme de substrats aldéhydiques accepteurs hydroxylés ou non, en présence de Li-HPA avec les TK_{eco} et TK_{sce} dont les spécificités de substrats sont déjà connues (Voir la publication « *A pH-Based High-Throughput Assay for Transketolase: Fingerprinting of Substrate Tolerance and Quantitative Kinetics* » à la fin de ce manuscrit). Les résultats montrent que les profils obtenus pour ces deux enzymes sont similaires à ceux déjà décrits dans la littérature. Le test colorimétrique développé est donc générique et peut donc être envisagé pour le criblage sans *a priori* d'une large gamme de substrats aldéhydiques.

Ce résultat permet de lever un verrou technologique car jusqu'alors aucun test d'activité de la TK permettait de répondre simultanément aux critères suivants : simple à mettre en œuvre, automatisable et surtout applicable à tous types d'aldéhydes accepteurs.

2.2.4. Adaptation du test au criblage des TK mutées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde

Un autre impératif dans le cadre de nos travaux est d'utiliser le test pH-métrique pour le criblage haut-débit des banques de mTK_{gst} mutées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde, à partir cette fois d'extraits bruts cellulaires non purifiés (lysats). Dans cette optique, il ne s'agit plus d'employer le test pH-métrique de manière quantitative afin de mesurer des activités enzymatiques mais de manière qualitative afin d'identifier rapidement les mTK_{gst} mutées les plus performantes vis-à-vis de ce substrat. Il est à rappeler que nous recherchons des mTK_{gst} mutées plus active vis-à-vis du L-(2S)-glycéraldéhyde que la mTK_{gst} sauvage qui reconnaît quant à elle préférentiellement l'énantiomère D de configuration (2R).

En effet, nous avons vu précédemment que le L-glycéraldéhyde était accepté par la mTK_{gst} sauvage. Bien que cette activité soit faible, nous avons décidé de la considérer comme référence ou « borne basse » pour le criblage des mTK_{gst} mutées. Nous avons donc dans un premier temps mesuré l'activité de la mTK_{gst} vis-à-vis de ce substrat en utilisant les conditions du test mises au point précédemment (Tableau 17, page 143). Cependant dans ce cas, les pentes initiales mesurées sur les 10 premières minutes sont très faibles (environ 0,0013 A.min⁻¹) ce qui est en dessous de la limite de détection que nous avons déterminée (0,0025 A.min⁻¹) et qui se traduit par un écart-type important (environ 30% du signal). Ainsi, nous avons envisagé d'optimiser de nouveau le test pour augmenter le signal mesuré pour la mTK_{gst} afin qu'il puisse servir de référence, sans toutefois que ce signal soit trop haut pour laisser une marge de détection suffisante pour détecter les activités des mTK_{gst} mutées les plus performantes. Dans ce but, nous avons fait varier différents paramètres : le temps de la mesure, la concentration en rouge de phénol, le pH de départ et le volume d'extrait enzymatique.

2.2.4.1. Remarques préliminaires

Pour réaliser ces expériences, deux substrats de référence seront utilisés : le L-glycéraldéhyde, car c'est le substrat vis-à-vis duquel le criblage sera effectué et le D-glycéraldéhyde, énantiomère bien mieux reconnu par la mTK_{gst} sauvage, qui permettra de mimer l'activité qu'aurait un très bon mutant vis-à-vis du L-glycéraldéhyde (contrôle positif ou borne haute).

La mTK_{gst} sauvage sera utilisée comme enzyme de référence (borne basse). Le bruit de fond sera mesuré en présence d'extrait soluble obtenu à partir des cellules hôtes (*E. coli* BL21DE3) transformées par le plasmide vide et contenant donc uniquement la TK chromosomique (Contrôle négatif). Les expériences d'optimisation du test de criblage présentées ici sont réalisées en présence des extraits bruts préparés dans les conditions identiques aux TK mutées de la banque CM (voir le chapitre « *Construction des banques de TK mutées* »), l'optimisation pour les extraits issus des banques SSM ayant été réalisée par nos partenaires du laboratoire de Darmstadt. Les extraits obtenus à partir des cellules surexprimant la mTK_{gst} sauvage seront notés « lysats mTK_{gst} », quant à ceux obtenus à partir des cellules hôtes sans plasmide seront notés « lysats CH ».

2.2.4.2. Influence du temps de la mesure

Les pentes mesurées sur les 20 premières minutes de la réaction en présence de lysat mTK_{gst} et du L-glycéraldéhyde sont très faibles car la réaction est lente. Nous avons donc envisagé de suivre ces réactions sur une durée plus longue. Dans ce cas, ce ne sont plus des pentes qui sont mesurées mais des absorbances finales à un temps donné. Le paramètre considéré correspond alors à la différence entre l'absorbance finale et l'absorbance initiale. La réaction a été effectuée respectivement en présence de lysat mTK_{gst} et de lysat CH, l'absorbance obtenue avec ce dernier étant considérée comme le bruit de fond. Le rapport signal sur bruit a alors été calculé pour différents temps de 20 min à 24 h (Figure 90).

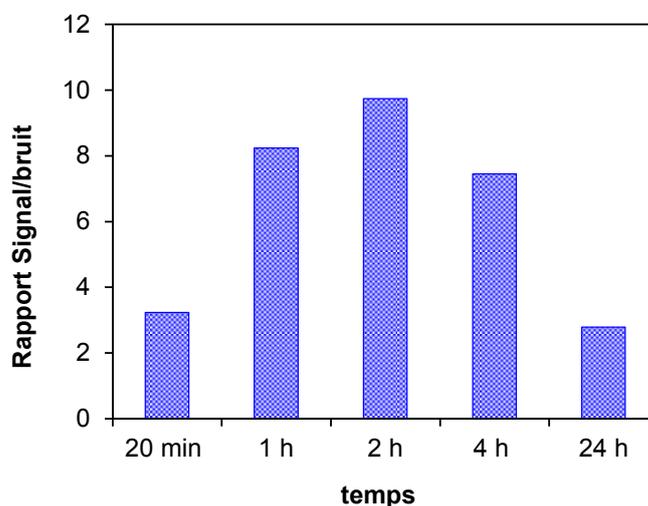


Figure 90 : Rapport Signal/Bruit en fonction du temps

Le milieu contient 28 μM de rouge de phénol, 2,4 mM de ThDP, 9 mM de MgCl_2 , 20 mM de L-glycéraldéhyde, 50 mM de Li-HPA, 2 mM de tampon TEA pH 7,5 et 40 μL de lysat mTK_{gst} ou de lysat CH (bruit de fond). Volume total : 200 μL .
Signal = $A_{\text{finale}} - A_{\text{initiale}}$ à 560 nm.

Le meilleur rapport signal/bruit a été obtenu pour une mesure de l'absorbance finale après 2 h de réaction. En effet, au bout de 20 min, la réaction n'a pas suffisamment avancé pour que le signal se différencie nettement du bruit de fond et à 24 h, des phénomènes extérieurs tels que la dissolution du CO_2 de l'air ou l'évaporation parasitent le signal. Ainsi, dans le protocole de criblage des mTK_{gst} mutées, la différence d'absorbance du milieu réactionnel entre 0 et 2 h sera mesurée.

2.2.4.3. Influence du volume de lysat utilisé

L'influence du volume de lysat sur le signal a ensuite été étudiée, en présence de L-glycéraldéhyde et de D-glycéraldéhyde, avec les lysats mTK_{gst} et CH (Figure 91).

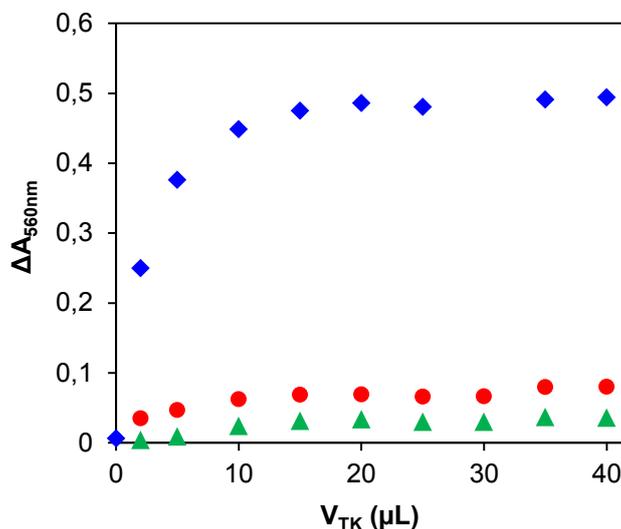


Figure 91 : Absorbance en fonction du volume d'extrait de TK

Le milieu contient 28 μM de rouge de phénol, 2,4 mM de ThDP, 9 mM de MgCl₂, 50 mM de Li-HPA, 2 mM de tampon TEA pH 7,5, 0-40μL de lysat mTK_{gst}. Volume total : 200 μL. L'absorbance finale est mesurée à 560 nm après 2 h de réaction. ◆ lysat mTK_{gst}, 20 mM de D-glycéraldéhyde (contrôle positif) ● lysat mTK_{gst}, 20 mM de L-glycéraldéhyde (contrôle positif), ▲ lysat CH, 20 mM de L-glycéraldéhyde (bruit de fond)

Dans le cas du D-glycéraldéhyde (contrôle positif), on remarque que l'absorbance atteint rapidement le seuil de saturation avec l'augmentation du volume d'extrait de mTK_{gst}. Cette saturation s'explique par la concentration limitante en rouge de phénol. Lorsque celui-ci est entièrement sous sa forme basique, l'absorbance à 560 nm est alors maximale. Nous avons donc envisagé d'augmenter la concentration en rouge de phénol.

Par ailleurs, l'absorbance correspondant aux réactions en présence du L-glycéraldéhyde atteint elle aussi un plateau à partir de 10 μL de lysats mTK_{gst}. Pourtant dans ce cas l'absorbance n'a pas atteint le maximum fixé par la concentration en rouge de phénol. Cette question sera examinée par la suite.

2.2.4.4. Influence de la concentration en rouge de phénol

L'augmentation de la concentration en indicateur pH-métrique augmente la sensibilité d'un test, car les variations d'absorbances sont plus importantes.[152] Ainsi l'absorbance à 560 nm a été mesurée pour différentes concentrations en rouge de phénol, tout d'abord à pH neutre. Puis la solution a été rendue basique par l'ajout d'une solution de NaOH (1 M) et la variation d'absorbance a été de nouveau mesurée (Figure 92).

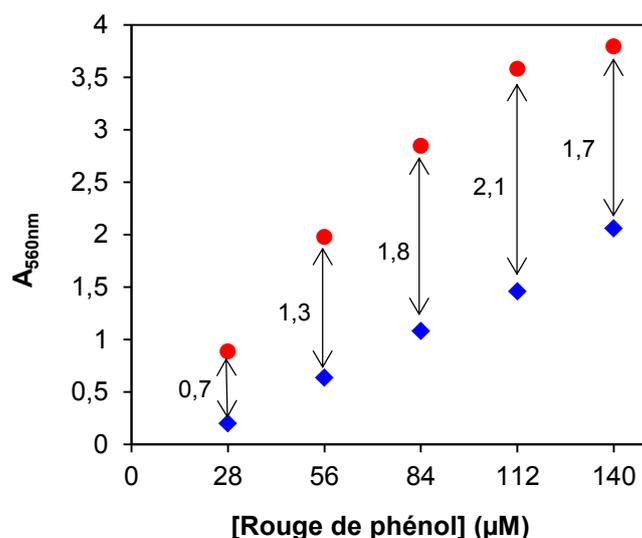


Figure 92 : Absorbance à 560 nm en fonction de la concentration en rouge de phénol

Le milieu contient le tampon TEA 2 mM et différentes concentrations en rouge de phénol.

Volume total : 200 µL ♦ à pH 7,0 • à pH 14

Comme attendu, la variation de l'absorbance entre les pH 7 et 14 augmente avec la concentration en rouge de phénol. Cette variation est linéaire jusqu'à environ 84 mM en rouge de phénol. Au-delà l'absorbance dépasse la valeur de 3 UA qui est la limite de détection du spectrophotomètre. La concentration en rouge de phénol sera donc fixée à 84 mM pour le criblage.

2.2.4.5. Influence du pH initial

A pH 7,5, le rouge de phénol présente déjà une couleur rouge ce qui signifie qu'il est déjà au milieu de sa zone de virage (du jaune au rose). Afin d'exploiter toute la gamme de variation de l'absorbance, nous avons décidé de choisir le pH initial au début de la zone linéaire de la courbe de l'absorbance en fonction du pH, soit 7,15 (Figure 93).

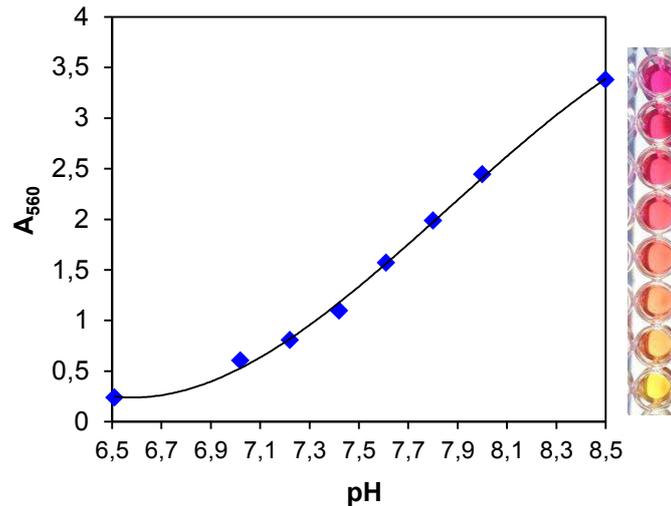


Figure 93 : Courbe de l'absorbance en fonction du pH

L'activité de mTK_{gst} est toujours optimale à pH 7,15. De plus, la couleur de l'indicateur correspondant à ce pH initial dans le puits est jaune-orangée ce qui permet une détermination visuelle des candidats positifs (roses) plus aisée que lorsque la couleur initiale est rouge.

2.2.4.6. Influences combinées de la concentration en rouge de phénol et du volume de lysat

En théorie, plus la quantité d'enzyme est importante, plus la variation d'absorbance est élevée. Or nous avons constaté précédemment qu'en présence de 28 μM de rouge de phénol, l'absorbance atteint un plateau au-delà de 10 μL de lysat mTK_{gst} . Dans le cas du D-glycéraldéhyde, ce plateau avait été attribué à la concentration limitante en rouge de phénol. Dans le cas du L-glycéraldéhyde, ce phénomène était resté inexplicé.

Nous avons donc fait une dernière série d'expériences en présence du L-glycéraldéhyde et D-glycéraldéhyde et en faisant varier pour chaque substrat la concentration en rouge de phénol (28 μM et 84 μM) et le volume de lysat mTK_{gst} (10 μL et 40 μL) afin de vérifier si la variation de l'absorbance après 2 h de réaction atteint un plateau dans tous les cas (Figure 94).

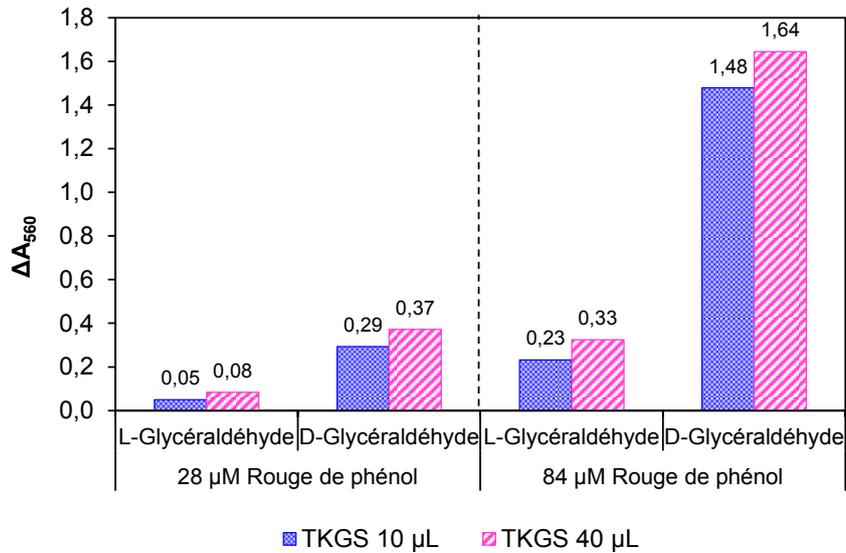


Figure 94 : Comparaison de la variation d'absorbance en fonction du volume de TK et de la concentration en rouge de phénol

Le milieu contient 28 μ M/84 μ M de rouge de phénol, 2,4 mM de ThDP, 9 mM de $MgCl_2$, 50 mM de Li-HPA, 2 mM de tampon TEA pH 7,15, 10 μ L/ 40 μ L de lysat mTK_{gst} et 20 mM de L- ou D-glycéraldéhyde. Volume total : 200 μ L. L'absorbance finale est mesurée à 560 nm après 2 h de réaction.

Dans le cas du D-glycéraldéhyde, l'absorbance obtenue est très proche pour les deux volumes 10 μ L et 40 μ L de lysat mTK_{gst} alors qu'un facteur 4 entre les deux absorbances devrait être obtenu si le test était linéaire. Ceci n'est pas surprenant car le D-glycéraldéhyde est un bon substrat de la TK, si bien qu'au bout de 2 h de réaction la majeure partie de Li-HPA étant consommée, le rouge de phénol est principalement sous sa forme déprotonnée, et l'absorbance est donc maximale.

En revanche, il est plus surprenant de constater que dans le cas du L-glycéraldéhyde, le rapport des absorbances obtenues avec 40 μ L et 10 μ L devrait être d'un facteur 4, or ici il est n'est que d'environ 1,5, que ce soit en présence de 28 μ M comme de 84 μ M de rouge de phénol. Rappelons que l'échantillon de mTK_{gst} utilisé ici est sous forme extrait brut, contenant les protéines et métabolites cellulaires ainsi que divers composés permettant la lyse des cellules et le stockage de l'extrait (dont la solution de Bugbuster et le glycérol). Nous avons émis l'hypothèse que plus le volume d'extrait introduit dans le milieu réactionnel augmente, plus les variations de pH dues à la réaction enzymatique sont masquées par un ou plusieurs des composés présents dans le lysat. Le test étant linéaire jusqu'à environ 10 μ L d'extrait enzymatique, ce volume sera donc utilisé pour le criblage.

Remarque : Dans les conditions choisies, c'est-à-dire en présence de 10 μL lysat mTK_{gst} et de 84 μM de rouge de phénol, on remarque que le rapport des absorbances obtenues pour le L-glycéraldéhyde ($\Delta A_{560} = 0,2$, référence) et pour le D-glycéraldéhyde ($\Delta A_{560} = 1,4$, contrôle positif) est d'un facteur 7. Or nous avons montré précédemment que l'activité relative de mTK_{gst} vis-à-vis du L-glycéraldéhyde était d'environ 2 % de celle du D-glycéraldéhyde ce qui équivaudrait à un rapport des signaux d'un facteur 50. Ceci n'est pas gênant dans le cadre du criblage dont la vocation n'est pas la quantification de l'activité mais simplement l'identification des mTK_{gst} actives. Il faudra cependant garder en mémoire qu'une mTK_{gst} mutée présentant un signal 7 fois supérieur à celui de la mTK_{gst} sauvage en présence du L-glycéraldéhyde aura en réalité potentiellement une activité plus importante.

2.2.4.7. Bilan des paramètres requis pour le criblage à haut-débit

Les conditions optimisées pour l'utilisation du test pH-métrique dans le cadre du criblage à haut-débit en présence de L-glycéraldéhyde sont résumées dans le Tableau 19.

Rouge de phénol	84 μM
ThDP	2,4 mM
MgCl ₂	9 mM
Li-HPA	50 mM
Tampon TEA	2 mM
L-glycéraldéhyde	20 mM
Lysat TK	10 μL (Banque CM) 40 μL (Banques SSM)
Volume total	200 μL
pH	7,15
Mesure	Différence entre les absorbances finale (2h) et initiale à 560 nm

Tableau 19 : Bilan des paramètres du test pour le criblage haut-débit en présence de L-glycéraldéhyde

Remarque : Le volume de lysat à utiliser pour les extraits enzymatiques obtenus dans les conditions des banques SSM a été optimisé par nos partenaires de Darmstadt et sera de 40 μL .

2.2.5. Optimisation du test pH-métrique pour la quantification de l'activité mTK_{gst}

Les expériences complémentaires réalisées ont donc permis d'améliorer la sensibilité du test pH-métrique en vue de son utilisation pour le criblage des banques de mTK_{gst} mutées sous forme de lysat en présence du substrat d'intérêt, le L-glycéraldéhyde. Afin d'étudier par la suite les mTK_{gst} mutées les plus intéressantes identifiées à la suite du criblage et de mesurer quantitativement les activités de ces mTK_{gst} purifiées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde, nous avons décidé de tirer profit des paramètres optimisés et les appliquer au protocole de détermination quantitative des activités décrit précédemment. Ainsi, les expériences de calibration réalisées dans le paragraphe 2.2.3.2 ont donc été renouvelées dans ces nouvelles conditions.

2.2.5.1. Bilan des conditions du test d'activité pH-métrique quantitatif

La concentration en rouge de phénol et le pH de départ ont été modifiés par rapport aux conditions initiales du test utilisé dans le paragraphe 2.2.3. Les nouvelles conditions du test d'activité pH-métrique quantitatif sont donc les suivantes :

Rouge de phénol	84 µM
ThDP	2,4 mM
MgCl ₂	9 mM
Li-HPA	50 mM
tampon TEA	2 mM
Aldéhydes	Concentrations variables
TK purifiée	Concentrations variables
Volume total	200 µL
pH	7,15
Mesure	Suivi de l'absorbance à 560 nm au cours du temps et détermination de la pente initiale

Tableau 20 : Bilan des nouveaux paramètres du test pH-métrique pour la détermination de l'activité de la TK

L'absorbance du milieu à 560 nm est mesurée par un lecteur de microplaques, à 28 °C (température de fonctionnement de l'appareil).

2.2.5.2. Calibration du test

Calibration en présence des ions bicarbonates

La courbe de calibration de l'absorbance à 560 nm en fonction de la concentration en ions HCO_3^- a été déterminée en présence de $84 \mu\text{M}$ de rouge de phénol (Figure 95). Le milieu contient tous les réactifs du test sauf le Li-HPA, et différentes concentrations en NaHCO_3 allant de 0 à 0,8 mM afin de mimer une faible conversion du Li-HPA par la mTK_{gst} en vitesse initiale.

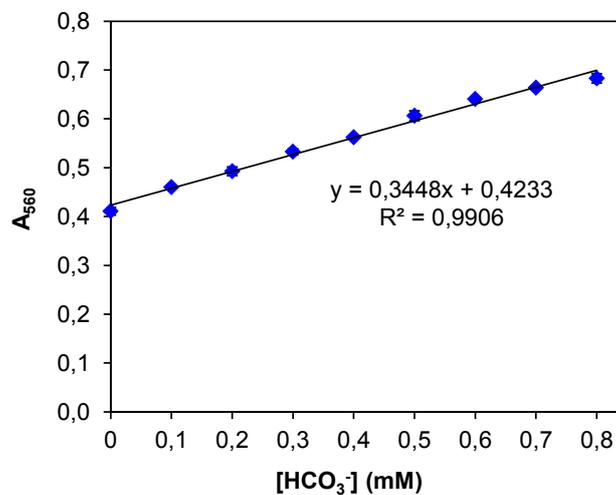


Figure 95 : Courbe de calibration en présence de NaHCO_3

Le milieu contient $84 \mu\text{M}$ de rouge de phénol, $14 \mu\text{g}$ de mTK_{gst} purifiée, $2,4 \text{ mM}$ de ThDP, 9 mM de MgCl_2 , 50 mM de Li-HPA, 2 mM de tampon TEA et $0 - 0,8 \text{ mM}$ de NaHCO_3 .
Volume total : $200 \mu\text{L}$

Cette droite de calibration est linéaire sur la gamme de concentrations étudiée et présente une pente de $0,3448 \text{ UA.mM}^{-1}$, soit une sensibilité environ trois fois supérieure à celle obtenue en présence de $28 \mu\text{M}$ de rouge de phénol.

La régression linéaire effectuée sur cette droite conduit à une LOD de $0,04 \text{ mM}$ et une LOQ de $0,12 \text{ mM}$ d'ions HCO_3^- , correspondant à des variations d'absorbance de $0,014 \text{ UA}$ et $0,041 \text{ UA}$ respectivement. Cette droite de calibration permet de calculer l'activité enzymatique à partir de la pente donnée par le suivi de l'absorbance à 560 nm au cours du temps grâce à l'équation suivante :

$$\text{Activité (U)} = \frac{\Delta A_{560}}{dt} (\text{A. min}^{-1}) \times \frac{1}{0,3448 (\text{UA. mM}^{-1})} \times V_{\text{puits}} (200. 10^{-6} \text{L}) \times 10^{-3} \quad (4)$$

Calibration en fonction de la quantité de TK

La linéarité du test a ensuite été vérifiée en mesurant l'activité enzymatique en fonction de la quantité d'enzyme. Différentes quantités de mTK_{gst} purifiée (de 0 à 10 µg) ont été mises en présence de 20 mM de D-glycéraldéhyde, dans les conditions du test (Tableau 20). Les pentes (UA.min⁻¹) ont été mesurées pour chacune des quantités en mTK_{gst} (Figure 96a) et l'équation **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** a été utilisée pour convertir ces pentes en activité (U) (Figure 96b).

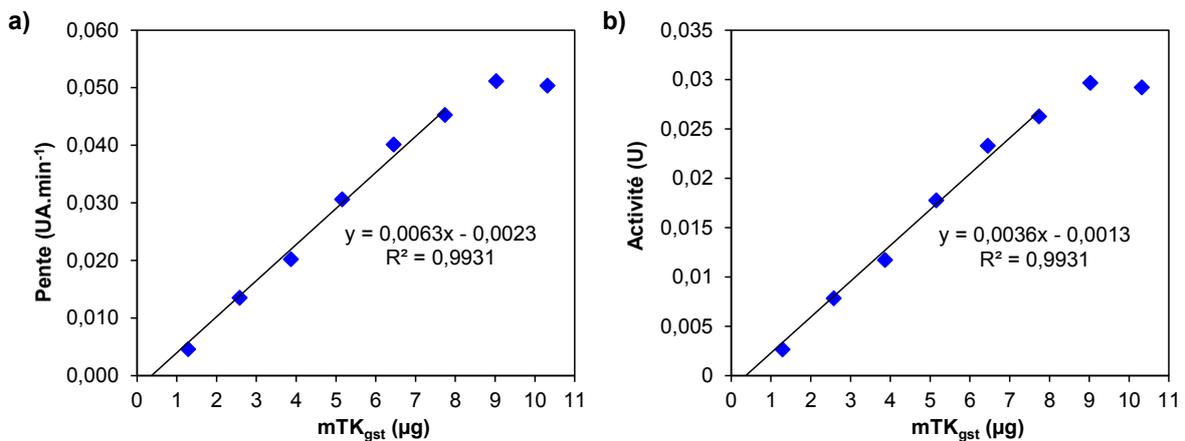


Figure 96 : Courbe de calibration en fonction de la quantité de mTK_{gst}

Le milieu contient 84 µM de rouge de phénol, 2,4 mM de ThDP, 9 mM de MgCl₂, 20 mM de D-glycéraldéhyde, 50 mM de Li-HPA, 2 mM de tampon TEA pH 7,5 et 0 – 10 µg de mTK_{gst} purifiée. Volume total : 200 µL. **a)** Pentes des absorbances au cours du temps en fonction de la quantité de mTK_{gst} ; **b)** Activités en fonction de la quantité de mTK_{gst}, calculées à partir des pentes (a)

L'activité enzymatique est linéaire entre 0 et 8 µg de mTK_{gst}. La régression linéaire effectuée sur ce domaine a permis de calculer une LOD de 1,7 mU (correspondant à une pente de 0,003 UA/min) et une LOQ de 5,2 mU (correspondant à une pente de 0,009 UA/min). Cela signifie que l'activité minimale qui pourra être mesurée dans un puits est de 5,2 mU, ce qui est une amélioration par rapport aux conditions initiales du test pour lesquelles l'activité minimale était de 14,1 mU. Par ailleurs, l'absorbance n'est plus linéaire au-dessus de 26 mU (soit une pente de 0,045 UA/min). En d'autres termes, l'étendue de mesure de ce test est de 5,2 mU à 26 mU.

2.2.6. Conclusion

Un test d'activité pH-métrique en présence de rouge de phénol a été mis au point, permettant la détermination quantitative de l'activité de la transcétolase en présence de Li-HPA comme substrat donneur vis-à-vis de différents substrats accepteurs. La fiabilité du test est attestée par les valeurs des constantes cinétiques obtenues équivalentes à celles indiquées dans la littérature. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *ChemBioChem* donnée en annexe du manuscrit.[151]

L'utilisation de ce test en présence de lysats cellulaires et d'un mauvais substrat, le L-glycéraldéhyde, a nécessité des expériences supplémentaires afin d'améliorer sa sensibilité. Notamment, la concentration en indicateur pH-métrique, la durée de la mesure et la variation de l'absorbance (par diminution du pH initial) ont été augmentées. Les conditions du test pH-métrique ont été optimisées d'une part pour le criblage haut-débit d'un grand nombre de clones, de façon qualitative afin d'identifier rapidement les mTK_{gst} mutées les plus actives, et d'autre part pour la mesure quantitative des activités des mTK_{gst} purifiées identifiées à l'issue du criblage.

Ce nouveau test d'activité pH-métrique de la TK présente de nombreux avantages par rapport aux tests décrits jusqu'ici. Bien qu'il soit moins sensible que les tests en présence de NADH et que son étendue de mesure soit réduite (de 5 à 26 mU), il est direct, rapide, quantitatif, et convient à tout type d'aldéhyde accepteurs. Il est de surcroît facile à mettre en œuvre, miniaturisable en microplaques 96-puits et peu coûteux. Ce test bénéficie donc de tous les critères requis pour le criblage à haut débit aussi bien d'un grand nombre de substrats vis-à-vis d'une TK donnée (appelé « Fingerprinting » [178]) que d'un grand nombre de TK mutées vis-à-vis d'un substrat donné. Un verrou technologique est donc levé car jusqu'alors il n'existait aucune méthode automatisable et générique permettant de déterminer l'activité de la TK de façon qualitative ou quantitative.

2.3. Criblage des mTK_{gst} mutées vis-à-vis d'un aldéhyde α-hydroxylé de configuration (2S)

2.3.1. Introduction

Les trois banques obtenues par saturation de site (SSM), dont deux sur une position unique (SSM-L380 et SSS-D470) et une sur les deux positions simultanées (SSM-L382D470) ainsi que la banque obtenue par mutagenèse par cassette (CM) seront criblées afin de rechercher une ou plusieurs mTK_{gst} mutée(s) présentant une activité vis-à-vis des aldéhydes α-hydroxylés de configuration (2S). Pour cela, le L-(2S) glycéraldéhyde a été choisi comme substrat modèle car comme nous l'avons vu précédemment dans le chapitre « *Production et caractérisation d'une nouvelle TK thermostable* », la mTK_{gst} de type sauvage présente une légère activité vis-à-vis de ce substrat à température ambiante. Il s'agit donc ici d'amplifier cette activité qui sera alors considérée comme référence lors du criblage (borne basse) (Figure 97). La mTK_{gst} sauvage présente par ailleurs une très bonne activité vis-à-vis de l'énantiomère D (2S) du glycéraldéhyde, ce qui constituera un contrôle positif lors du criblage. Le choix de ce substrat est conforté par le fait que les deux énantiomères L et D sont commerciaux.

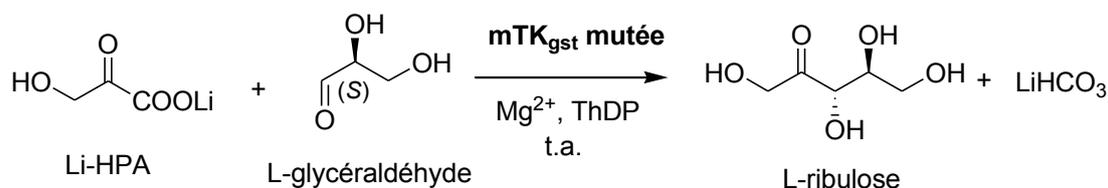


Figure 97 : Réaction utilisée pour le criblage des mTK_{gst} mutées en présence du Li-HPA comme donneur et du L-glycéraldéhyde comme accepteur

Les lysats contenant les mTK_{gst} mutées les plus actives vis-à-vis du L-glycéraldéhyde seront sélectionnées. Puis, afin d'éliminer d'éventuels faux positifs, les clones correspondants seront de nouveau soumis à un cycle de culture et de criblage. Les activités des lysats obtenus seront mesurées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde. Enfin, les gènes codant pour ces mTK_{gst} mutées seront séquencés.

2.3.2. Généralités concernant le criblage des banques CM et SSM

Rappel des conditions générales de criblage

Toutes les expériences de criblage présentées dans cette partie sont effectuées à partir des lysats cellulaires bruts contenant les mTK_{gst} mutées surexprimées. Dans le cas des banques SSM, les extraits enzymatiques ont été préparés fraîchement le jour du criblage alors que dans le cas de la banque CM, les extraits lysés sont décongelés avant le criblage (Figure 98).

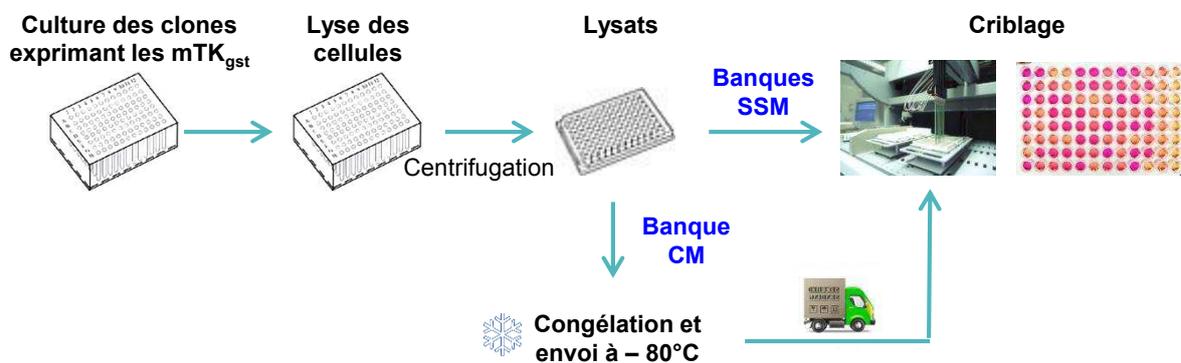


Figure 98 : Protocole général pour le criblage des banques SSM et CM : de la culture des clones jusqu'au criblage des lysats

Le criblage des banques est réalisé en microplaques 96-puits dans lesquelles les lysats (40 μ L pour les banques SSM, 10 μ L pour la banque CM, d'après les expériences d'optimisation décrites dans le chapitre précédent) sont tout d'abord introduits manuellement dans chaque puits, à l'aide d'une pipette multi-canaux. Puis la solution contenant les réactifs du test pH-métrique est ajoutée dans chaque puits à l'aide de l'automate de pipetage (TECAN). Cette solution, est préparée fraîchement avant chaque expérience de criblage. Les concentrations finales dans chaque puits sont les suivantes : 84 μ M de rouge de phénol, 2,4 mM de ThDP, 9 mM de MgCl₂, 2 mM de TEA, à pH 7,15. Les absorbances initiales à 560 nm sont mesurées puis la réaction est initiée par ajout de Li-HPA (50 mM en concentration finale). Les plaques sont incubées durant deux heures à température ambiante puis l'absorbance finale à 560 nm est mesurée.

Ce protocole permet de cribler 960 mutants par jour (10 microplaques 96 puits). Chaque plaque comporte deux puits (G12 et H12) contenant un lysat de mTK_{gst} sauvage (« wt ») obtenue dans les mêmes conditions que les TK mutées, afin de servir de référence interne à chaque plaque.

Normalisation des résultats à l'issue du criblage

Les étapes de culture, lyse et criblage des banques étant réalisé en différentes parties sur des journées différentes, des petites variations des conditions expérimentales peuvent survenir (rendement des cultures, pH et température du milieu réactionnel pendant la réaction de criblage, etc.) et engendrer des différences au niveau des absorbances mesurées d'une plaque à l'autre. Pour pallier à cela, toutes les absorbances seront normalisées par rapport à celle de la référence interne introduite dans la microplaque, c'est-à-dire les deux puits contenant les lysats de mTK_{gst} sauvage. Ainsi l'absorbance relative (notée A_{rel}) obtenue à partir des données du criblage décrit ci-dessus est calculée selon l'équation (5). Pour la mTK_{gst}, A_{rel} vaut donc 1.

$$A_{rel} = \frac{\Delta A_{560} (mTK_{gst} \text{ mutée})}{\Delta A_{560} (mTK_{gst} \text{ sauvage})} \tag{5}$$

Stratégie suivie pour l'identification des mTK_{gst} les plus performantes

Pour chacune des banques, un premier cycle de criblage est réalisé selon le protocole décrit ci-dessus. Les lysats contenant les mTK_{gst} mutées les plus actives vis-à-vis du L-glycéraldéhyde sont sélectionnées. Puis, afin d'éliminer d'éventuels faux positifs, les clones correspondants sont de nouveau soumis à un cycle de culture et de criblage. Les activités des lysats obtenus sont mesurées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde. Enfin, les gènes codant pour ces mTK_{gst} mutées sont séquencés (Figure 99).

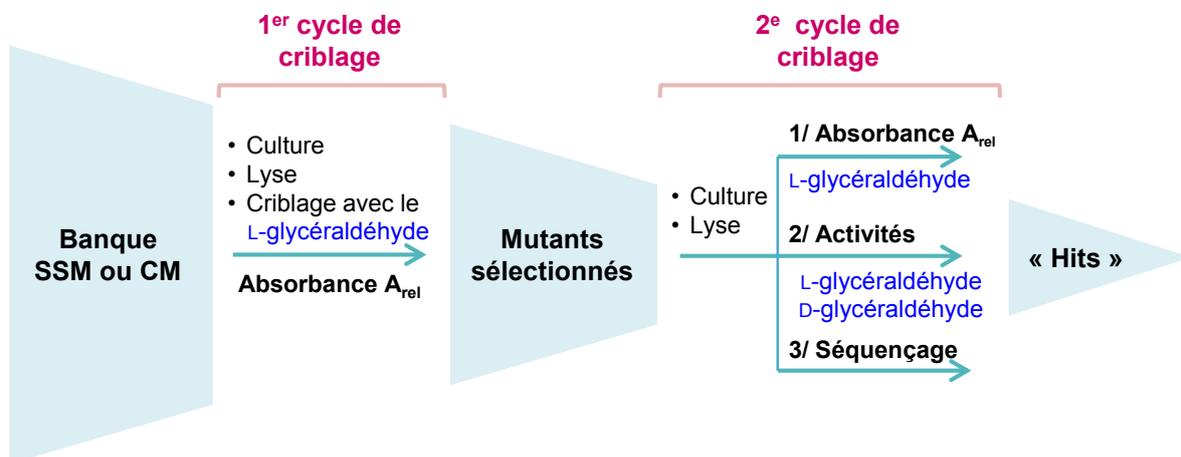


Figure 99 : Stratégie pour la sélection des mTK_{gst} les plus performantes

2.3.3. Criblage des banques obtenues par saturation de site (SSM)

Dans le chapitre « *Construction des banques de mTK_{gst} mutées* », les deux positions, Leu382 et Asp470 avaient été identifiées comme pouvant apporter un gain d'activité de la mTK_{gst} vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et *in fine* conduire à l'inversion de l'énantiosélectivité. Avec la technique SSM, chaque position est mutée de façon systématique par les 19 autres acides aminés. Les banques obtenues par SSM sur les positions Leu382 et Asp470 (banques SSM-L382 et SSM-D470) ont été criblées d'une part et la banque obtenue par SSM sur les deux positions simultanées (SSM-L382D470) a été criblée d'autre part ; puis les résultats obtenus pour ces deux types de banques SSM – simple position et double positions - ont été comparées.

Ce travail a été réalisé en parallèle dans les laboratoires de Darmstadt et de Clermont-Ferrand afin de vérifier la reproductibilité de la méthode de criblage.

2.3.3.1. Contrôles préliminaires

Tout d'abord, une première plaque de référence a été réalisée afin de contrôler l'ensemble du protocole mis en œuvre au SEESIB (Clermont-Ferrand) depuis la culture jusqu'au criblage. Deux paramètres ont été vérifiés : la reproductibilité d'un puits à l'autre d'une même plaque ainsi que la présence de contamination liée à la culture cellulaire. En effet, pour des raisons pratiques, les cultures sont effectuées en milieu non-stérile mais en présence d'un antibiotique (la kanamycine). Cette plaque comporte 72 puits inoculés de façon indépendante avec la souche d'*E. coli* exprimant le gène de mTK_{gst} sauvage et 24 puits contenant le milieu de culture qui n'a pas été inoculé.

Les lysats obtenus ont été mis en présence des substrats (Li-HPA et L-glycéraldéhyde) et des réactifs du test colorimétrique. Les résultats indiquent que la variation d'absorbance sur deux heures pour les puits contenant la mTK_{gst} sauvage est en moyenne de $0,13 \pm 0,01$ UA, ce qui correspond à une erreur d'environ 8 % sur la mesure. Cette valeur est satisfaisante étant donné qu'elle prend en compte à la fois les variations des conditions expérimentales induites par la culture, la lyse et la mesure de l'absorbance. Aucune variation de l'absorbance n'est détectée pour les puits contenant les milieux de culture non-inoculés, ce qui prouve que d'éventuelles contaminations du milieu de culture n'auront pas de conséquence sur les résultats obtenus à l'issue du criblage.

2.3.3.2. Criblage des banques SSM-L382 et SSM-Asp470

Les banques SSM-L382 (enzymes mutées au niveau de la Leu382) et SSM-Asp470 (enzymes mutées au niveau de l'Asp470) contenant chacune 192 clones, c'est-à-dire deux microplaques n°1 et n°2 pour chaque banque, chaque plaque comportant deux puits de référence (lysate de mTK_{gst} sauvage ou « wt »), ont été criblées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et les absorbances relatives (A_{rel}) ont été mesurées (Figure 100).

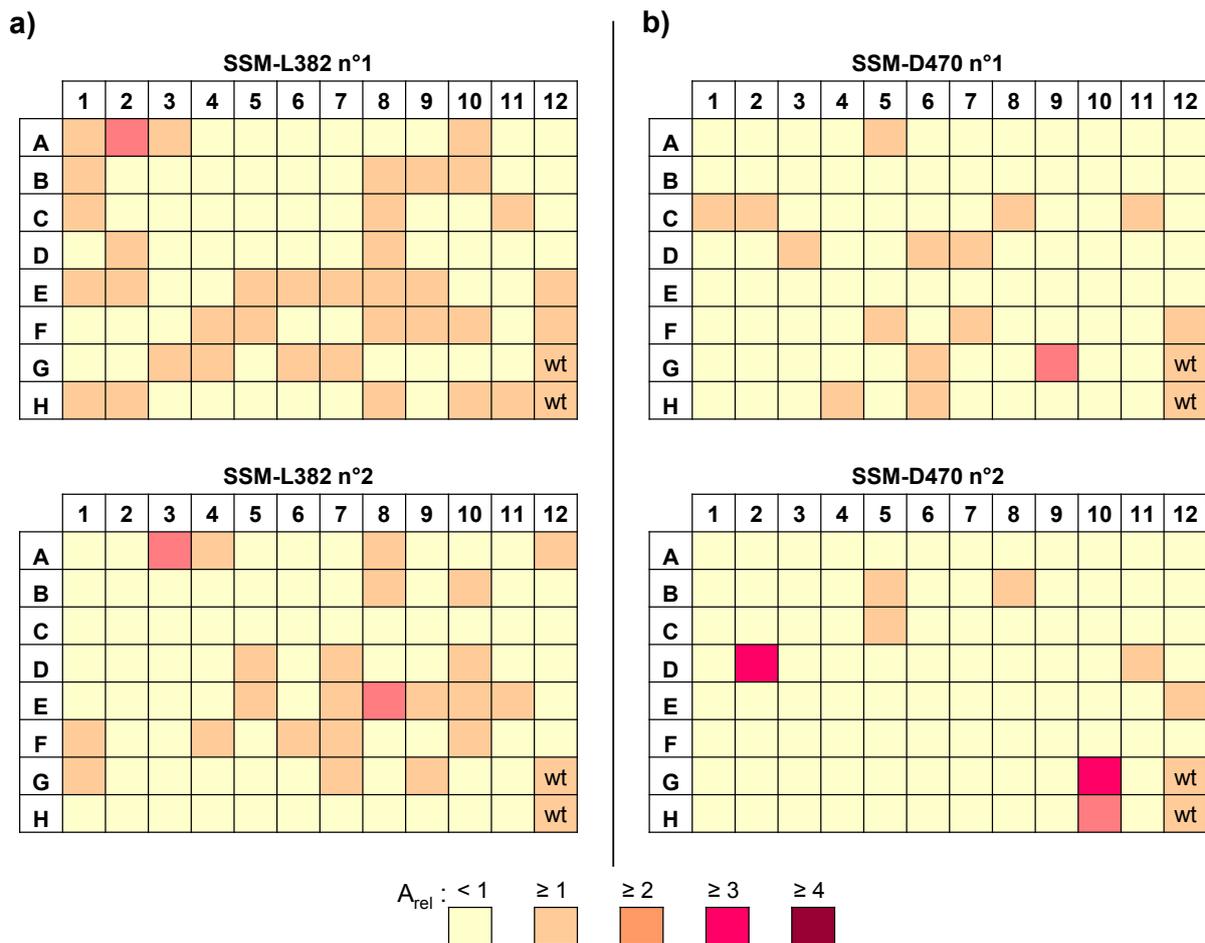


Figure 100 : Criblage des banques SSM sur une seule position
a) SSM-L382 ; b) SSM-D470

Pour chacune des deux microplaques n°1 et n°2 des banques SSM-L382 et SSM-Asp470, les absorbances A_{rel} des lysats ont été classées en cinq catégories par rapport à l'absorbance obtenue avec le lysate mTK_{gst} sauvage (Figure 100) puis réparties de façon statistique en fonction de leur nombre dans ces cinq classes (Tableau 1). Les résultats du criblage montrent que les mutations au niveau de la Leu382 n'entraînent peu de modification d'activité de la mTK_{gst} vis-à-vis du L-glycéraldéhyde : environ 60 % des mTK_{gst} mutées

présentent une absorbance proche de celle de la mTK_{gst} sauvage (A_{rel} entre 0,5 et 2) et seules trois d'entre elles montrent une absorbance plus de 2 fois supérieure (Tableau 21a). En revanche, la modification de l'Asp470 semble avoir une influence plus directe sur l'activité. En effet près de 80 % des lysats ont fortement perdu en activité (2 fois ou plus) en comparaison du lysat de mTK_{gst} sauvage. Toutefois, quatre variants présentent une A_{rel} supérieure à 2, dont deux sont supérieures à 3. (Tableau 21b).

a)			b)		
A_{rel}	nombre de variants	%	A_{rel}	nombre de variants	%
0 – 0,5	76	40	0 - 0,5	145	77
0,5 – 0,9	53	28	0,5 – 0,9	20	11
0,9 – 1,1	29	15	0,9 – 1,1	7	4
1,1 – 1,9	27	14	1,1 – 1,9	12	6
2 – 2,9	3	2	2 – 2,9	2	1
> 3	0	0	>3	2	1
Total	188	100	Total	188	100

Tableau 21 : Répartition statistique des variants issus des banques SSM sur une seule position en fonction de l'absorbance relative (A_{rel})
a) SSM-L382; b) SSM-D470

Les quatre variants les plus actifs de chacune des deux banques ont été sélectionnés pour la suite de l'étude.

2.3.3.3. Criblage de la banque SSM-L382D470

Les 3572 clones exprimant les mTK_{gst} mutées de la banque SSM-L382D470, c'est à dire 38 microplaques 96-puits comportant chacune 2 puits de référence (lysats de mTK_{gst} sauvage), ont été criblées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde. La répartition des absorbances relatives A_{rel} obtenues à l'issue du criblage des lysats est représentée sur la Figure 101. Elles sont comprises entre 0 et 7 fois celle obtenue avec la TK_{gst} sauvage, 7 étant le facteur maximal qu'il est possible de mesurer dans les conditions de ce test de criblage, d'après les expériences de calibration réalisées précédemment.

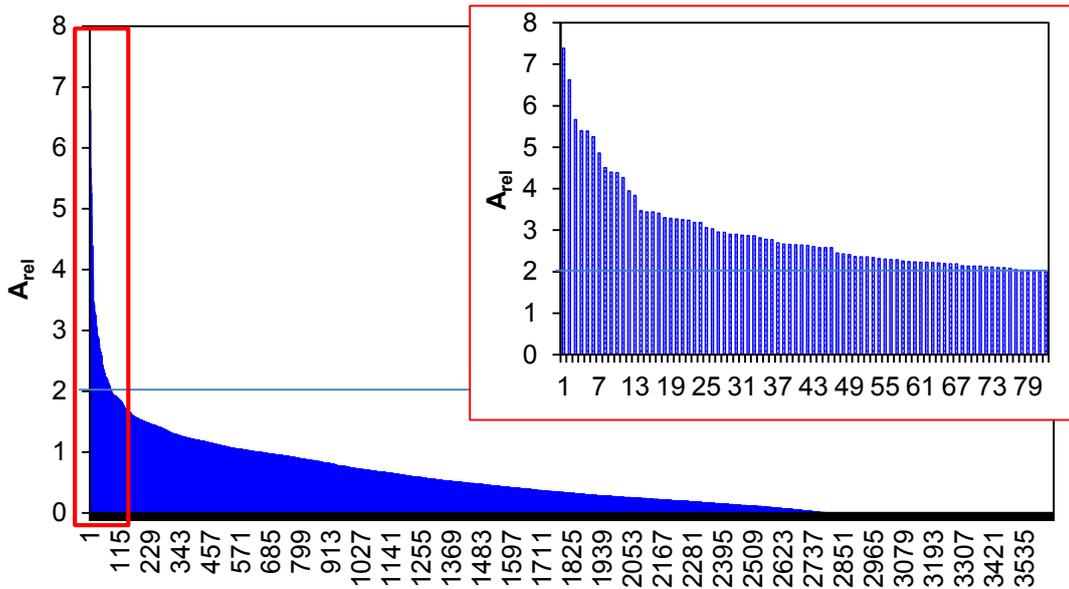


Figure 101 : Absorbance relative (A_{rel}) des mutants issus de la banque SSM-L382D470, criblés vis-à-vis du L-glycéraldéhyde

Dans l'encadré rouge : lysats présentant une A_{rel} supérieure à 2

Environ 80 % des mutants ont subi une perte d'activité notable par rapport à la mTK_{gst} sauvage (Tableau 22). Cependant, environ 2,3 % des candidats présentent une absorbance relative A_{rel} supérieure à 2 par rapport à la mTK_{gst} sauvage. Parmi eux, onze lysats présentent une A_{rel} supérieure à 4, dont six ont une A_{rel} supérieure à 5. Ainsi les mutations simultanées sur les deux positions Leu382 et Asp470 sembleraient augmenter l'activité vis-à-vis du L-glycéraldéhyde de manière plus importante que les mutations individuelles sur l'une ou l'autre des positions. En effet, dans le cas des banques SSM-L382 et D-470, le meilleur rapport des absorbances était de 3. L'effet coopératif des mutations dans ces deux positions qui était attendu suite aux études *in silico* semble être confirmé par nos résultats expérimentaux.

A_{rel}	Nombre de variants	%
0 - 0,5	2239	62,7
0,5 - 0,8	620	17,4
0,9 - 1,1	209	5,9
1,1 - 1,9	421	11,8
2 - 2,9	56	1,6
3 - 3,9	15	0,4
4 - 4,9	5	0,1
> 5	6	0,2
Total	3571	100,0

Tableau 22 : Répartition statistiques des variants de la banque SSM-L382D470 en fonction de l'absorbance relative

A partir des résultats de criblage, nous avons décidé de sélectionner les 72 mTK_{gst} mutées les plus actives, soit 2 % de la banque. Toutes ces TK présentent une absorbance au moins 2 fois supérieure à celle de la mTK_{gst} sauvage. Les souches correspondantes ont été sélectionnées pour la suite de l'étude.

Contrôle de la reproductibilité entre deux plaques, dans un même laboratoire

Afin de vérifier la reproductibilité des résultats obtenus à l'issue du criblage, une des plaques de la banque SSM-L382D470 prise au hasard a été cultivée, lysée et criblée deux fois, dans le même laboratoire (Figure 102). Malgré quelques petites variations (puits C11 et E3 par exemple), les mêmes mutants positifs, c'est-à-dire ayant une absorbance relative supérieure à 2, ont été identifiés sur les deux plaques par le test de criblage.

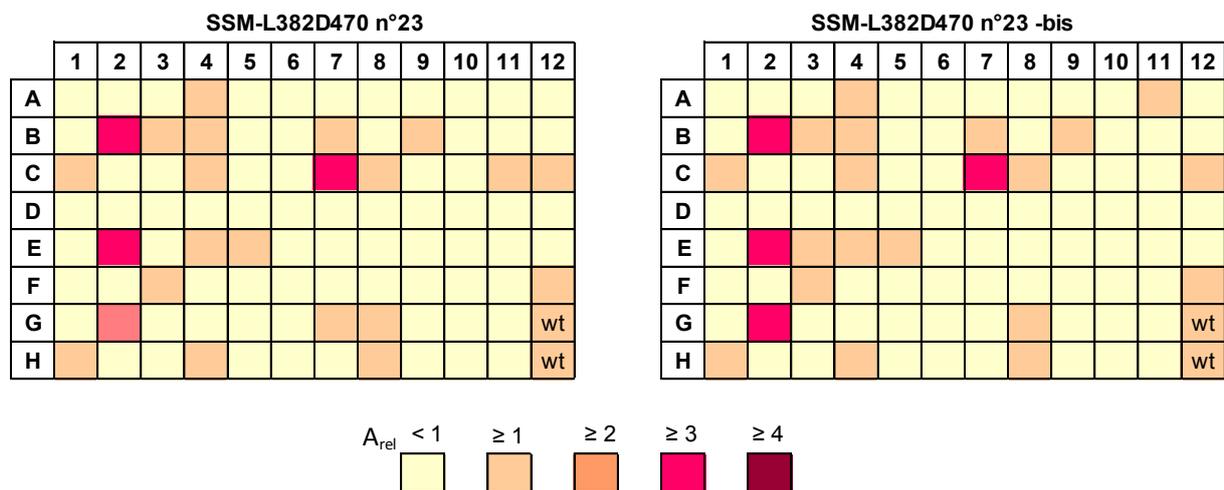


Figure 102 : Comparaison de la culture et du criblage d'une plaque de la banque SSM-L382D470 réalisés en duplicata

Contrôle de la reproductibilité entre deux plaques, dans deux laboratoires

Afin d'évaluer la fiabilité de la méthode de criblage, la banque SSM-L382D470 a été cultivée et criblée en duplicata, d'une part dans le laboratoire de Darmstadt (par le Dr. T. Devamani de l'équipe du Pr. Fessner) et d'autre part à Clermont-Ferrand. Parmi les 72 mTK_{gst} mutées sélectionnées pour leur activité accrue vis-à-vis du L-glycéraldéhyde par les deux laboratoires, 27 puits sont les mêmes.

2.3.3.4. Second cycle de criblage des 80 variants les plus actifs des banques SSM

Les souches exprimant les mTK_{gst} les plus actives de la banque SSM-L382 (4 variants), de la banque SSM-D470 (4 variants) et la banque SSM-L382D470 (72 variants) ont été remises en culture sur une même plaque 96-puits afin de pouvoir comparer les A_{rel} à partir des lysats obtenus dans des conditions strictement identiques. Les 16 puits vides restants de la microplaque sontensemencés d'une part avec la souche exprimant la mTK_{gst} sauvage de référence (8 puits) et d'autre part avec la cellule hôte, *E. coli*, non transformée (8 puits) (Figure 103a). Ces clones ont été mis en culture, lysés et criblés dans les mêmes conditions que précédemment.

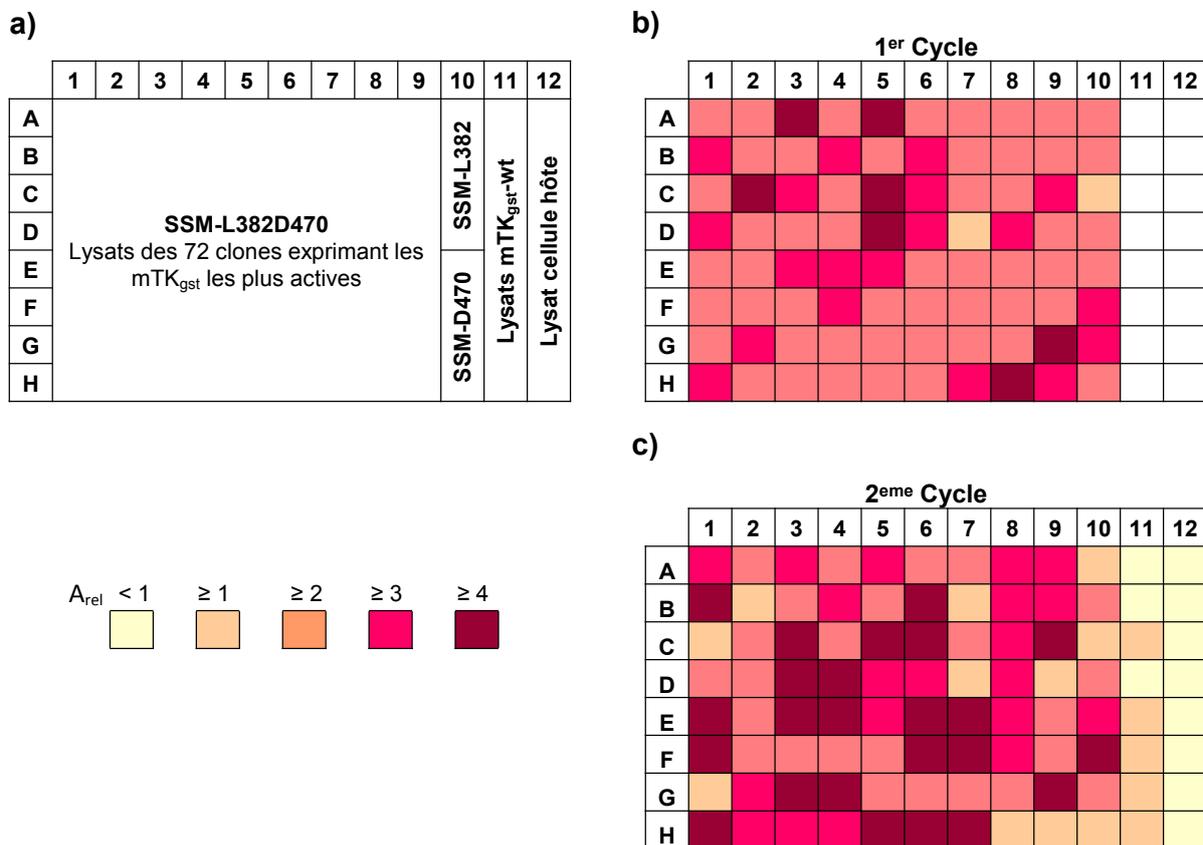


Figure 103 : Second cycle de criblage des 80 variants les plus actifs des banques SSM
a) Agencement de la plaque utilisée pour le second cycle réunissant les variants les plus actifs et les références ; **b)** Rappel des A_{rel} obtenues lors du premier cycle de criblage (culture des clones puis criblage sur 38 plaques différentes) ; **c)** Absorbances obtenues lors du second cycle de criblage (culture des clones puis criblage réalisés sur une même plaque).

Le second criblage confirme que tous les mutants sélectionnés à partir des trois banques SSM ont une activité supérieure à celle de la mTK_{gst} sauvage vis-à-vis du L-glycéraldéhyde (Figure 103c). Les valeurs des A_{rel} varient par rapport aux celles obtenues lors du premier cycle de criblage (Figure 103b), ce qui n'est pas surprenant car les variants des banques SSM ainsi que les références (wt) correspondantes avaient été cultivés et/ou criblés dans certains cas sur des plaques et des jours différents. Ceci montre que des lysats ne peuvent être comparés qu'au sein d'une même plaque avec une référence commune d'où l'intérêt du second cycle.

Estimation des activités relatives vis-à-vis du L- et du D-glycéraldéhyde

Suite au criblage « qualitatif », un criblage « quantitatif » a été réalisé avec les lysats de cette plaque contenant les 80 mutants sélectionnés et les références, vis-à-vis des deux énantiomères respectifs le L- et le D-glycéraldéhyde (Figure 104). En effet, nous souhaiterions mettre en évidence des mTK_{gst} mutées présentant d'une part une augmentation de l'activité vis-à-vis du L-glycéraldéhyde par rapport à la mTK_{gst} sauvage et si possible présentant conjointement une diminution de l'activité vis-à-vis du D-glycéraldéhyde afin de tendre vers une inversion de l'énantiosélectivité. Le test pH-métrique décrit précédemment dans le paragraphe 2.2.5.1 de ce chapitre (p156) pour la détermination quantitative des activités (en mU) a été employé.

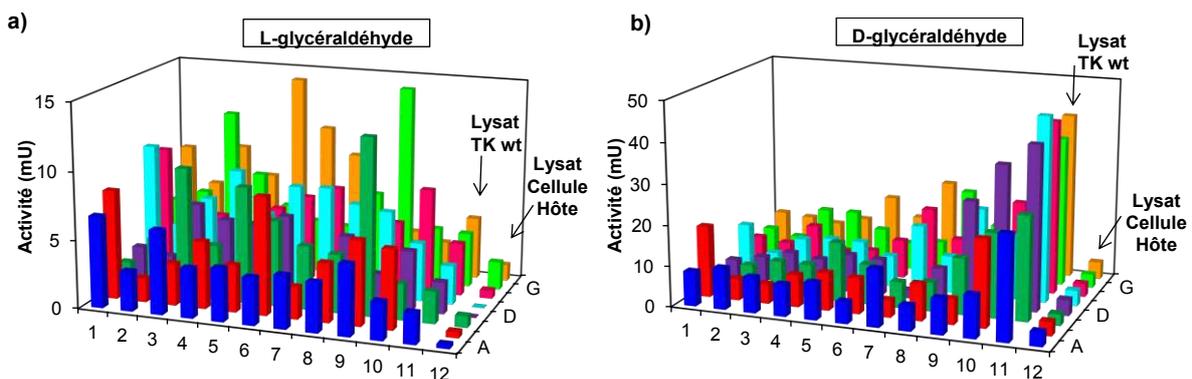


Figure 104 : Activités (en mU) des lysats des 80 clones sélectionnés dans les banques SSM

Le milieu contient 40 µL de lysat, 84 µM de rouge de phénol, 2,4 mM de ThDP, 9 mM de MgCl₂, 20 mM de glycéraldéhyde (D ou L), 50 mM de Li-HPA, 2 mM de tampon TEA pH 7,15. Volume total : 200 µL. L'absorbance à 560 nm est mesurée durant 20 min. Colonnes 11 : mTK_{gst} sauvage ; colonnes 12 : lysats de cellule hôte. **a)** Activités vis-à-vis du L-glycéraldéhyde ; **b)** Activités vis-à-vis du D-glycéraldéhyde

La grande majorité des mTK_{gst} mutées sélectionnées présentent une meilleure activité vis-à-vis du L-glycéraldéhyde que la mTK_{gst} de type sauvage (Figure 104a). Deux d'entre elles présentent une activité de 14 mU, c'est-à-dire environ 5 fois l'activité de la mTK_{gst} (3,1 mU). C'est un résultat analytique encourageant dans le but d'améliorer l'activité de la mTK_{gst} vis-à-vis du L-glycéraldéhyde.

De plus, toutes les mTK_{gst} mutées apparaissent comme étant moins actives que la mTK_{gst} sauvage vis-à-vis du D-glycéraldéhyde (Figure 104b). Cette perte d'activité est drastique pour les TK de la banque SSM-L382D470 : environ 80 % des mutants ont une activité réduite d'un facteur d'au moins 4 par rapport à la mTK_{gst} sauvage. Les mTK_{gst} mutées issues des banques SSM sur une seule position sont moins affectées (pas de perte d'activité ou activité réduite de moitié).

Ces premiers résultats iraient donc dans le sens de l'inversion de l'énantiosélectivité de la mTK_{gst} qui impliquerait une augmentation de l'activité vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et une diminution de l'activité vis-à-vis du D-glycéraldéhyde. Le rapport des activités L-glycéraldéhyde / D-glycéraldéhyde a été estimé pour chaque variant à partir des activités obtenues précédemment (Figure 105). Les valeurs les plus élevées correspondent à un rapport d'environ 1, ce qui équivaut à la perte de l'énantiosélectivité, alors que le rapport pour l'enzyme sauvage est d'environ 0,1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,8	0,3	0,7	0,5	0,4	0,6	0,3	0,6	0,6	0,3	0,1	
B	0,5	0,3	0,6	0,6	0,4	1,0	0,6	0,5	1,0	0,3	nd	
C	0,6	0,6	1,1	0,5	0,6	0,6	0,7	0,6	0,9	0,1	0,1	
D	0,5	0,3	0,8	0,7	0,6	0,7	0,6	0,6	0,1	0,1	0,1	
E	0,8	0,7	0,6	0,8	0,5	1,0	0,5	0,7	0,3	0,3	0,1	
F	1,3	0,5	0,4	0,6	0,9	0,7	0,4	0,5	0,5	0,3	0,1	
G	0,7	1,0	0,9	0,5	0,5	0,6	0,5	0,3	1,1	0,5	0,1	
H	0,9	0,6	1,1	0,7	0,9	0,9	0,4	0,5	nd	0,3	0,1	

Figure 105 : Rapports des activités L/D des lysats des 80 clones sélectionnés dans les banques SSM

Les puits présentant une valeur supérieure ou égale à 1 sont surlignés en rouge. Le milieu contient 40 µL de lysats, 84 µM de rouge de phénol, 2,4 mM de ThDP, 9 mM de MgCl₂, 20 mM de D- ou L-glycéraldéhyde, 50 mM de Li-HPA, 2 mM de tampon TEA pH 7,15. Volume total : 200 µL. L'absorbance à 560 nm est mesurée durant 20 min. Colonne 11 : lysat mTK_{gst} sauvage. ; * Le rapport L/D représente le rapport de l'activité obtenue avec le L-glycéraldéhyde sur l'activité obtenue avec le D-glycéraldéhyde

Séquençage des mTK_{gst} mutées issues des banques SSM-L382, SSM-D470 et SSM-L382D470

Les gènes correspondants aux mTK_{gst} mutées sélectionnées, c'est-à-dire les 4 issues de la banque SSM-L382, les 4 issues de la banque SSM-470 et les 72 issus de la banque SSM-L382D470, ont été séquencés (Voir *Annexe 4*). Il apparaît que les 4 mTK_{gst} mutées issues de la banque SSM-L382 correspondent à des substitutions de la Leu382 par les résidus Gly, Ser, Asp et Ala. Les mTK_{gst} mutées issues de la banque SSM-D470 correspondent à des substitutions de l'Asp470 par une Thr ou une Ser (Tableau 23). Globalement, ces deux banques SSM obtenues sur l'une ou l'autre des positions L382 ou D470, conduisent à une augmentation de l'activité vis-à-vis du L-glycéraldéhyde, notamment la mTK_{gst}-L382S et la mTK_{gst}-D470T. Cependant les rapports des activités L/D des 8 mutants sélectionnés restent faibles, signifiant que leur énantiopréférence est toujours en faveur de l'énantiomère D.

a)			b)		
Séquence	Activité	Rapport	Séquence	Activité	Rapport
L382	L-glycéraldéhyde	L /D	D470	L-glycéraldéhyde	L /D
	[mU]			[mU]	
G	2,8	0,3	T	4,3	0,3
S	5,8	0,3	T	7,7	0,3
D	2,6	0,1	S	4,2	0,5
A	4,4	0,1	S	2,5	0,4
wt	3,1	0,1	wt	3,1	0,1

Tableau 23 : Résultats de séquençage des mTK_{gst} les plus actives des banques SSM sur une position unique

a) SSM-L382 b) banque SSM-D470; * Le rapport L/D représente le rapport de l'activité obtenue avec le L-glycéraldéhyde sur celle obtenue avec le D-glycéraldéhyde

Les résultats du séquençage des 72 mTK_{gst} mutées les plus actives de la banque SSM-L382D470 sont indiqués en *Annexe 4* et les fréquences d'apparition de chaque type de mutation sur les deux positions Leu382 et Asp470 sont présentées sur la Figure 106.

Sur la position Leu 382, les mutations les plus fréquentes sont Asp (22 fois), Asn (14 fois) et Gly (11 fois). Ces résultats correspondent en partie aux mutations qui avaient été identifiées à l'issue du criblage de la banque SSM sur cette seule position puisque l'Asp et la Gly ont été identifiées dans les deux cas. En revanche, la première banque n'avait pas permis d'identifier l'Asn comme mutation favorable.

Sur la position Asp 470, les mutations les plus fréquentes sont Ser (35 fois), Thr (15 fois) et Val (9 fois). Les substitutions par Ser et Thr sont largement prédominantes devant les autres

résidus et correspondent bien aux mutations identifiées dans la banque SSM sur cette seule position. Ces résultats du séquençage soulignent donc une cohérence au niveau de la sélection des variants les plus actifs que nous avons faite à partir des banques SSM.

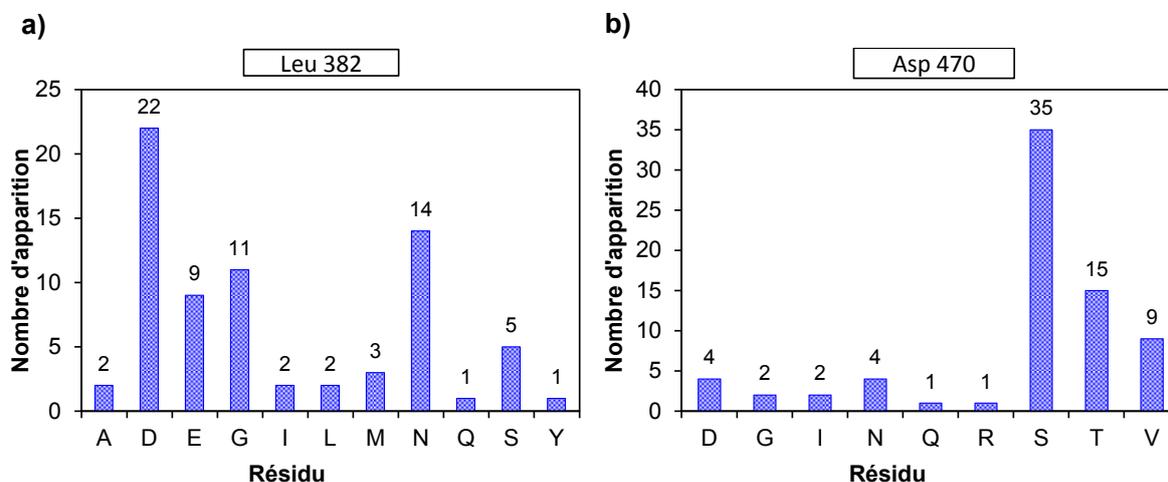


Figure 106 : Résultats du séquençage des 72 mTK_{gst} mutées les plus actives de la banque SSM-L382D470.
a) Position Leu 382 ; b) Position Asp470

De plus, il nous a semblé également important de répertorier parmi les 72 mTK_{gst} sélectionnées au sein de la banque SSM L382-D470, les couples de mutations qui sont représentés 4 fois ou plus (Tableau 24). Ce paramètre témoigne de la fiabilité de la sélection faite à l'aide du test de criblage. Les doubles mutants L382D/D470S et L382G/D470S sont les plus représentés : respectivement 9 fois et 8 fois. Ils correspondent aussi à des valeurs d'activité vis-à-vis du L-glycéraldéhyde plus élevées et des rapports d'activités L/D plus en faveur de l'énantiomère L du glycéraldéhyde.

Séquence des positions		Nombre d'apparitions	Activité L-glycéraldéhyde [mU]	Rapport L / D *
Leu382	Asp470			
D	S	9	<u>5 - 14,5</u>	0,6 - 1,1
D	T	4	<u>3 - 13</u>	0,6 - 0,9
D	V	4	3 - 8	0,5 - 0,9
E	S	4	4 - 5	0,4 - 1,1
G	S	8	<u>4 - 12</u>	0,6 - 1,5
N	S	5	<u>4 - 10</u>	0,5 - 0,8
N	T	5	2 - 6	0,6 - 0,9

Tableau 24 : Couples de mutations représentées 4 fois ou plus parmi les 72 mTK_{gst} sélectionnées dans la banque SSM-L382D470

* Le rapport L/D représente le rapport de l'activité obtenue avec le L-glycéraldéhyde sur celle obtenue avec le D-glycéraldéhyde ; ** Les valeurs soulignées correspondent aux variants sélectionnés pour la suite de l'étude.

En conclusion, les banques SSM sur une position unique ont permis d'identifier partiellement les mutations favorables pour l'augmentation de l'activité de la mTK_{gst} vis-à-vis du L-glycéraldéhyde. La banque SSM sur les deux positions a permis de mettre en évidence des activités nettement supérieures à celles obtenues dans le premier cas, montrant ainsi de façon très nette l'effet coopératif de certains couples de mutations.

Sélection des mTK_{gst} mutées les plus performantes de la banque SSM

En examinant à la fois les valeurs des activités vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et celles du rapport des activités L-glycéraldéhyde/ D-glycéraldéhyde (Tableau 24 et Figure 107) nous avons sélectionné quatre doubles mutants pour la suite de l'étude : L382D/D470T (nommé SSM1) L382N/D470S (nommé SSM2), L382G/D470S (nommé SSM3) et L382D/D470S (nommé SSM4).

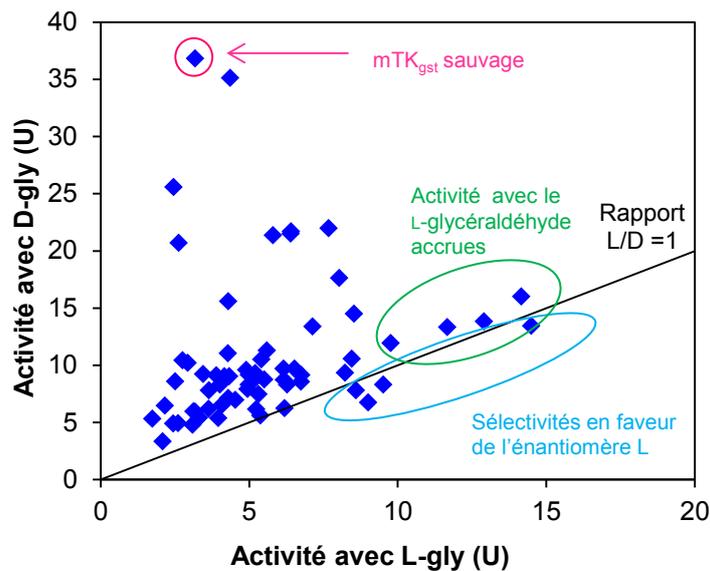


Figure 107 : Activités des 80 variants issus de la banque SSM vis-à-vis du L- et du D-glycéraldéhyde

Les mTK_{gst} mutées présentant les activités vis-à-vis du L-glycéraldéhyde les plus augmentées sont encerclées en vert, et celles présentant rapport L/D supérieur ou égal à 1 sont encerclées en bleu.

Les souches exprimant ces TK mutées seront par la suite cultivées à plus grande échelle, de manière à obtenir des quantités plus importantes de protéines, à les purifier, et étudier plus finement leur activité. De plus, l'influence de ces couples de mutations sur les interactions enzymes/substrat sera étudiée par modélisation moléculaire.

2.3.4. Criblage de la banque obtenue par mutagenèse par cassette CM

Afin de renforcer l'effet coopératif des résidus mutés en Leu382 et Asp470 avec d'autres mutations dans leur environnement proche, nous avons envisagé de construire une autre banque selon une approche « semi-rationnelle ». Deux séquences de 5 résidus contigus, respectivement Ala378 à Ser384 (ADLAS) et Glu469 à Thr473 (EDGPT) contenant chacune un des deux résidus clés (Leu382 ou Asp470) ont été identifiées (voir chapitre « *Construction des banques de mTK_{gst} mutées* ») puis des mutations aléatoires et non systématiques sont créées sur ces séquences par la technique de mutagenèse par cassettes (« CM »).

La production de la banque CM ainsi que l'obtention des lysats ont été réalisés au Genoscope. Ces derniers nous ont été envoyés congelés. Les criblages ont été réalisés dans l'équipe SEESIB à Clermont-Ferrand directement à partir des lysats décongelés selon le protocole rappelé au début de ce chapitre.

Cette technique engendre des banques de grande taille comportant dans notre cas des milliers de milliards (20^{10}) de mTK_{gst} mutées. Ne pouvant cribler l'ensemble de la banque, nous avons procédé en deux temps. Nous avons d'abord utilisé un échantillon de 3 760 clones (40 plaques 96-puits), puis dans l'espoir d'identifier des mTK_{gst} plus actives, un deuxième échantillon de 3 666 clones (39 plaques 96-puits) a été envisagé.

Ce premier cycle de criblage « qualitatif » a été réalisé vis-à-vis du L-glycéraldéhyde. Les distributions statistiques des résultats obtenus à partir de ces deux échantillons ont été comparées. Puis comme dans le cas des banques SSM, les clones de la banque CM exprimant les mTK_{gst} mutées les plus performantes ont subi un second cycle de criblage vis-à-vis du L-glycéraldéhyde, les activités vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde ont été déterminées et enfin les gènes codant pour ces mTK_{gst} mutées ont été séquencés.

2.3.4.1. Premier cycle de criblage de la banque CM

Un premier échantillon de 3 760 clones exprimant les mTK_{gst} mutées de la banque CM, c'est à dire 40 microplaques 96-puits comportant chacune 2 puits de référence (lysats de mTK_{gst} sauvage), a été criblé vis-à-vis du L-glycéraldéhyde. La répartition des absorbances relatives (A_{rel}) obtenues après deux heures de réaction est représentée sur la Figure 108. Ces absorbances sont comprises entre 0 et 5 fois celle de la mTK_{gst} sauvage.

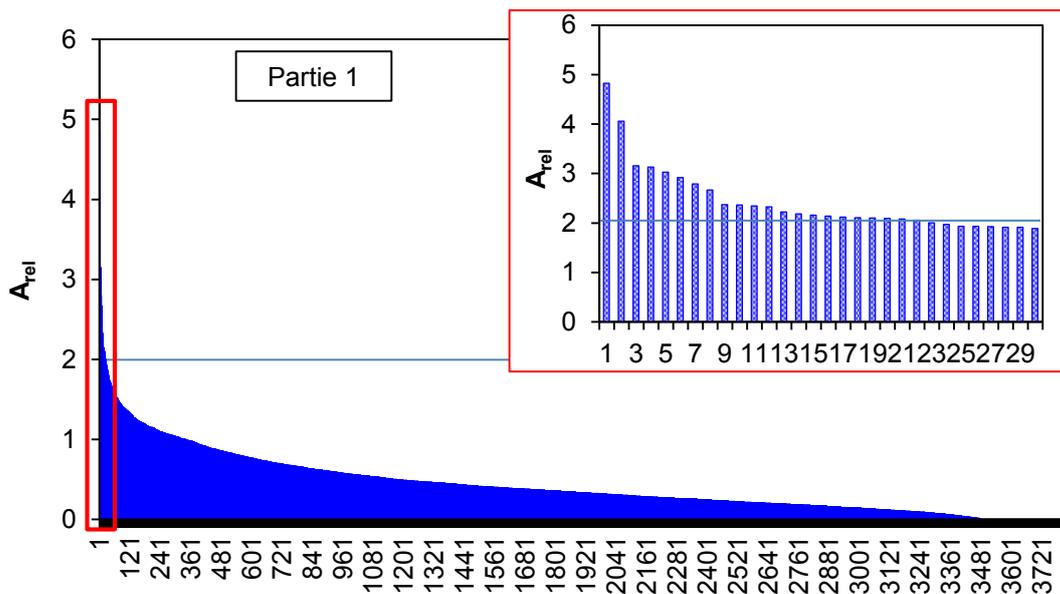


Figure 108 : Absorbance relative des lysats du premier échantillon de la banque CM criblés vis-à-vis du L-glycéraldéhyde

Dans l'encadré rouge : puits présentant une absorbance relative supérieure à 2

Les variants ont été classés dans différentes catégories en fonction de leur A_{rel} (Tableau 25) ; Environ 87 % des variants ont subi une perte d'activité par rapport à la mTK_{gst} sauvage. Seuls une vingtaine de mutants parmi les 3 760 (soit 0,7 %) indiquent une absorbance supérieure à celle de la mTK_{gst} sauvage contre environ 2,2 % dans le cas de la banque SSM-L382D470. De plus l'absorbance relative maximale observée est entre 4 et 5 alors qu'elle était de 7 dans le cas de la banque SSM-L382D470.

A_{rel}	Nombre de variants	%
0 - 0,5	2681	71,3
0,5 - 0,9	607	16,1
0,9 - 1,1	297	7,9
1,1 - 1,9	151	4,0
2 - 2,9	18	0,5
3 - 3,9	3	0,1
4 - 5	2	0,1
Total	3760	100,0

Tableau 25: Répartition statistique des variants de mTK_{gst} du premier échantillon de la banque CM en fonction de l'absorbance relative (A_{rel})

Dans l'espoir d'identifier des variants plus actifs, un second échantillon de 3 744 clones exprimant les mTK_{gst} mutées de la banque CM, c'est à dire 40 microplaques 96-puits comportant chacune 2 puits de référence (lysats de mTK_{gst} sauvage), a été criblé vis-à-vis du L-glycéraldéhyde. La répartition des absorbances relatives A_{rel} obtenues à l'issu du criblage est représentée sur la Figure 109. Comme pour le premier échantillon, l'absorbance maximale détectée est entre 4 et 5 fois celle de la mTK_{gst} sauvage.

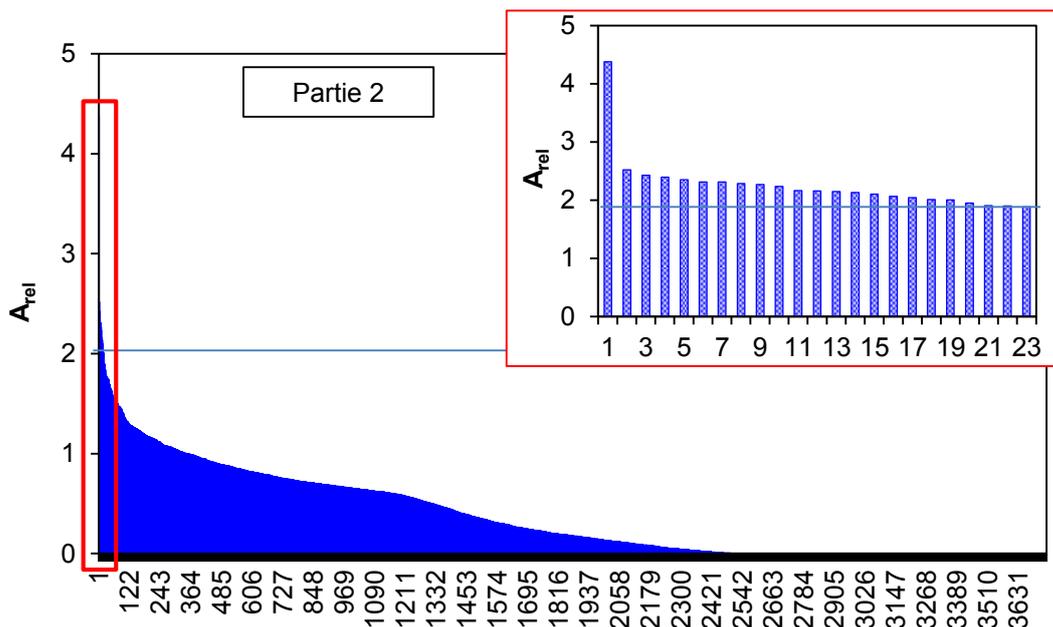


Figure 109 : Absorbance relative (A_{rel}) des lysats du second échantillon de la banque CM criblés vis-à-vis du L-glycéraldéhyde

Dans l'encadré rouge : puits présentant une absorbance relative supérieure à 2

La distribution statistique des A_{rel} de ce second échantillon est très similaire à celle du premier échantillon : environ 84 % des variants ont une activité inférieure à celle de la mTK_{gst}

sauvage et seuls environ 20 mutants présentent une absorbance relative comprise entre 2 et 5 (Tableau 26).

A_{rel}	Nombre de clones	%
0-0,5	2427	66,2
0,5-0,8	681	18,6
0,8-1,2	380	10,4
1,2-2	158	4,3
2-3	18	0,5
3-4	0	0,0
4-5	1	0,0
Total	3665	100,0

Tableau 26 : Répartition statistique variants de mTK_{gst} du second échantillon de la banque CM en fonction de l'absorbance relative (A_{rel})

La distribution statistique des A_{rel} de ces deux échantillons de la banque CM étant très proches, nous avons décidé de ne pas étendre le criblage à un troisième échantillon et avons opté pour une stratégie consistant à sélectionner et à identifier les variants les plus actifs de ce premier ensemble et soumettre dans le futur les gènes codants pour ces mTK_{gst} à un second cycle de mutagenèse, afin d'augmenter les chances d'obtenir des enzymes mutées plus performantes tout en limitant les efforts de criblage (le second cycle de mutagenèse ne sera pas réalisé dans le cadre de cette thèse).

Nous avons ainsi sélectionné les 80 mTK_{gst} mutées, soit 1 % de la banque de la banque CM (deux échantillons), présentant les activités vis-à-vis du L-glycéraldéhyde les plus importantes. Cet ensemble, inclut tous les variants (environ 40) montrant des absorbances au moins deux fois supérieures à celle de la mTK_{gst}. Ces mutants seront par la suite de nouveau mis en culture et criblés de façon quantitative afin de sélectionner les mTK_{gst} les plus actives.

Analyse des lysats de la banque CM par électrophorèse

Par ailleurs, dans le but d'expliquer la proportion importante de lysats ne présentant aucune variation d'absorbance en présence du L-glycéraldéhyde, une analyse des lysats par électrophorèse a été réalisée sur un échantillon de 96 clones de la banque CM (Figure 110). Les électrophorèses indiquent que la majorité des lysats présentent une protéine de poids moléculaire correspondant à la mTK_{gst} (environ 72 kDa). Par ailleurs, certains lysats ne

contiennent pas de protéine tandis que d'autres présentent une bande correspondant à une protéine de poids moléculaire inférieur à celui de la TK, ce qui laisse supposer qu'il s'agit d'une protéine tronquée. En effet, l'analyse de la séquence nucléotidique des positions mutées de mTK_{gst} montre que le résidu Glu469 appartenant à la séquence EDGPT autour de l'Asp470 est codé ici par le codon GAA, qui ne diffère que d'un nucléotide par rapport au codon stop TAA. La présence de ce codon stop dans la séquence nucléotidique conduit donc à la formation d'une mTK_{gst} tronquée. Ainsi, l'absence de TK ou la présence d'une protéine tronquée dans certains clones, explique pourquoi de nombreux lysats ne présentent pas d'activité, en addition des mTK_{gst} mutées qui peuvent être inactives en présence du L-glycéraldéhyde.

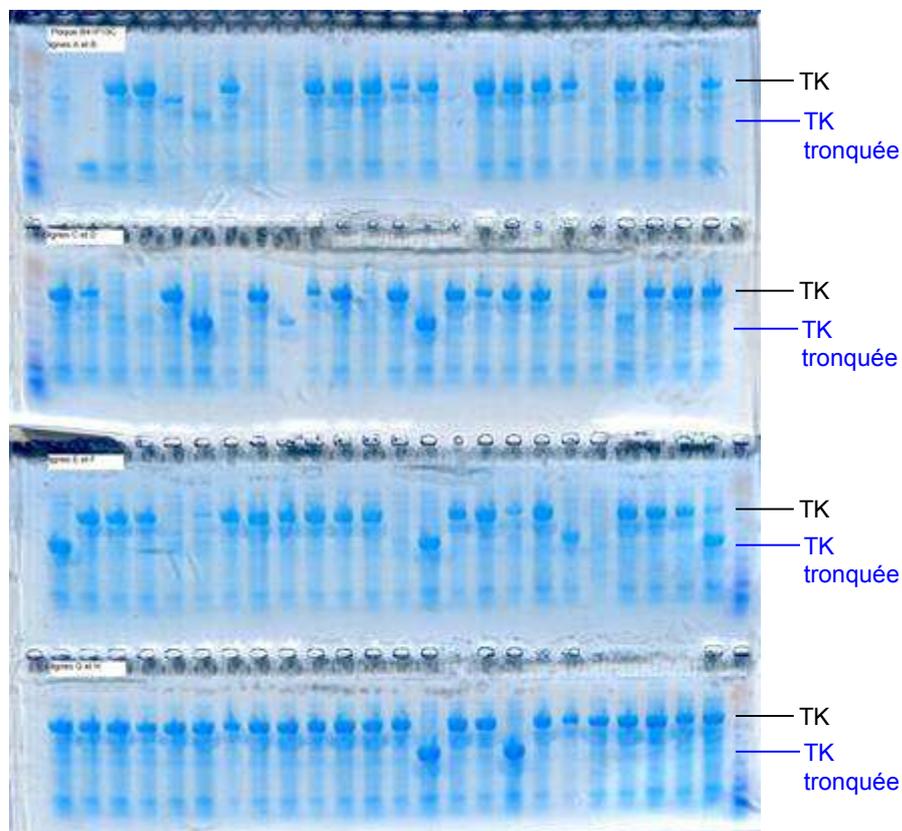


Figure 110 : Electrophorèse des lysats d'un échantillon de 96 clones de la banque CM

2.3.4.2. Second cycle de criblage des 80 variants les plus actifs de la banque CM

Les souches exprimant les 80 mTK_{gst} mutées les plus actives ont été remises en culture sur une même plaque 96-puits afin de pouvoir comparer les lysats obtenus dans de mêmes conditions. Les puits restants sontensemencés par la souche exprimant la mTK_{gst} sauvage de référence (8 puits, colonne 11) et par la souche d'*E. coli* non transformée, c'est-à-dire la cellule hôte (8 puits, colonne 12) (Figure 111a). Les clones de cette nouvelle plaque ont été cultivés, lysés puis criblés dans les mêmes conditions que précédemment.

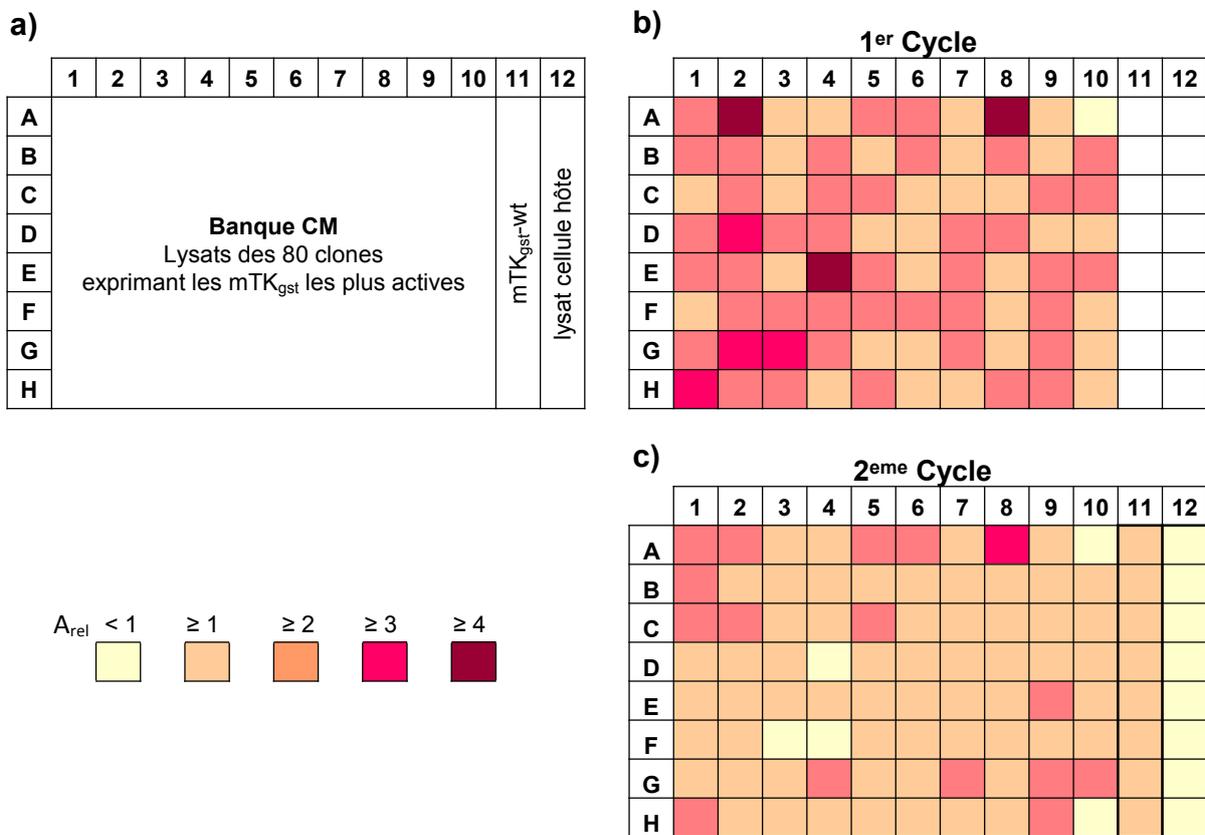


Figure 111 : Second cycle de criblage des 80 variants les plus actifs de la banque CM

a) Agencement de la plaque utilisée pour le second cycle réunissant les variants les plus actifs et les références; **b)** Rappel des A_{rel} obtenues lors du premier cycle de criblage (culture des clones puis criblage sur 79 plaques différentes) ; **c)** Absorbances obtenues lors du second cycle de criblage (culture des clones puis criblage réalisés sur une même plaque)

Le second cycle de criblage confirme que tous les variants sélectionnés (à quelques exceptions près) ont une activité supérieure ou égale à celle de la mTK_{gst} sauvage (Figure 111c). Leurs absorbances relatives A_{rel} paraissent néanmoins plus faibles qu'au premier cycle de criblage (Figure 111b). La plus grande variabilité entre le premier et le second

criblage par rapport au criblage des banques SSM peut sans doute être attribuée aux étapes additionnelles de congélation/ décongélation des lysats de la banque CM.

Estimation des activités relatives vis-à-vis du L- et du D-glycéraldéhyde

Un criblage « quantitatif » a été réalisé avec les lysats de cette nouvelle plaque vis-à-vis des deux énantiomères respectifs le L- et le D-glycéraldéhyde (Figure 104). En effet, comme dans le cas des banques SSM, nous souhaiterions mettre en évidence des mTK_{gst} mutées présentant d'une part une augmentation de l'activité vis-à-vis du L-glycéraldéhyde par rapport à la mTK_{gst} sauvage et d'autre part une diminution de l'activité vis-à-vis du D-glycéraldéhyde afin de tendre vers une inversion de l'énantiosélectivité. Le test pH-métrique décrit précédemment dans le paragraphe 2.2.5.1 page 156 pour la détermination quantitative des activités a été employé.

Les activités en mU ont été calculées mais leurs valeurs sont pour la plupart très faibles et inférieures à la limite de détection du test (LOD) qui est de 1,6 mU. Nous avons donc choisi d'examiner uniquement les données correspondant aux 8 mTK_{gst} mutées présentant les A_{rel} les plus importantes lors du second cycle de criblage (Figure 112). Dans le cas du L-glycéraldéhyde, les résultats montrent que les activités des 8 mutants sont toutes nettement supérieures à celle de la mTK_{gst} sauvage (Figure 112a). En revanche, dans le cas du D-glycéraldéhyde, tous les variants montrent une activité nettement réduite (d'un facteur entre 2 et 10) par rapport à celle de la mTK_{gst} de type sauvage.

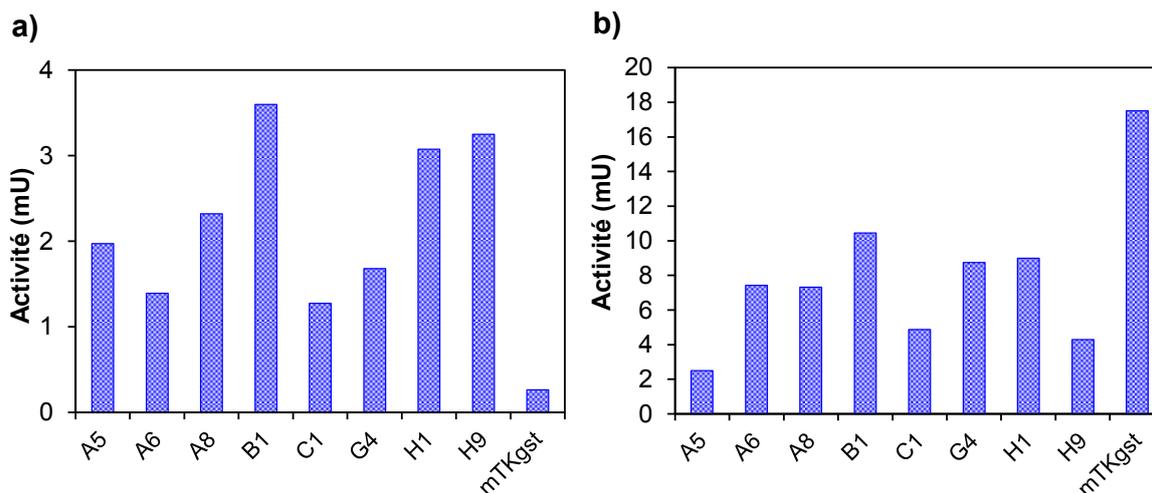


Figure 112 : Estimation des activités des 8 variants de mTK_{gst} les plus actifs obtenus lors du second cycle de criblage

a) Activités vis-à-vis du L-glycéraldéhyde ; **b)** Activités vis-à-vis du D-glycéraldéhyde.

Le milieu contient 10 μ L de lysat, 84 μ M de rouge de phénol, 2,4 mM de ThDP, 9 mM de MgCl₂, 20 mM de glycéraldéhyde (D ou L), 50 mM de Li-HPA, 2 mM de tampon TEA pH 7,15. Volume total : 200 μ L. Les pentes initiales de l'absorbance à 560 nm sont mesurées. Colonne 11 : mTK_{gst} sauvage ; colonne 12 : lysats de cellule hôte.

Ces résultats vont donc tout à fait dans le sens de l'inversion de l'énantiosélectivité. Le rapport de l'activité vis-à-vis du L-glycéraldéhyde sur celle vis-à-vis du D-glycéraldéhyde a été estimé pour chacune de ces 8 mTK_{gst} mutées à partir des activités précédentes (Figure 113). Dans tous les cas ce rapport est inférieur à 1 ce qui signifie que l'énantiopréférence de ces mTK_{gst} mutées reste en faveur du D-glycéraldéhyde. Néanmoins, deux des TK mutées, A5 et H9 montrent un rapport d'environ 0,8, valeur proche de 1 qui correspondrait à la perte de l'énantiosélectivité.

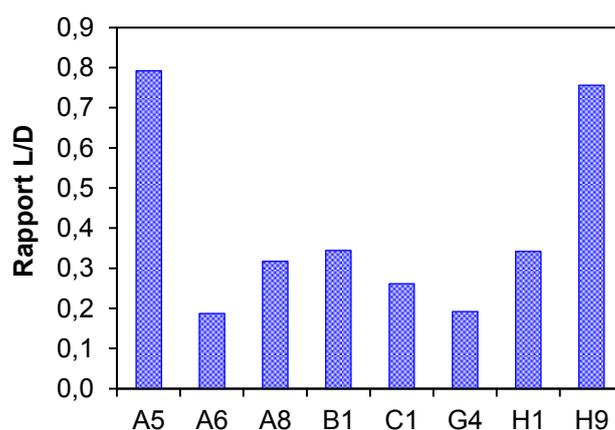


Figure 113 : Rapports des activités L / D-glycéraldéhyde des 8 variants de mTK_{gst} les plus actifs du second cycle de criblage

Séquençage des mTK_{gst} mutées

Les gènes codant pour les 80 mTK_{gst} issues de la banque SSM-L382D470 ont été séquencés (Voir Annexe 5). Le taux de présence des acides aminés sur chacune des positions des deux séquences mutées Ala378 à Ser384 (ADLAS) et Glu469 à Thr473 (EDGPT) a été calculé (Tableau 27). Les résultats montrent que deux des acides aminés Asp381 et Thr473 sont très conservés. Or, nous avons vu précédemment que le taux de mutation au niveau de ces positions au sein de la banque CM était élevé (Tableau 15 p133). Cela signifie donc que ces résidus jouent probablement un rôle important dans le mécanisme catalytique et/ou la reconnaissance des substrats de la mTK_{gst}. Sur les autres positions, les taux de mutation des mTK_{gst} sélectionnées sont légèrement plus faibles que ceux obtenus pour la banque CM, mis à part pour les positions Leu382 (32 % pour les mTK_{gst} sélectionnées contre 23 % dans la banque CM), Asp470 (62 % contre 41 %) et Pro472 (28% contre 23 %). Ce résultat confirme l'importance des mutations sur les positions 382 et 470 pour l'augmentation de l'activité de la mTK_{gst} vis-à-vis du L-glycéraldéhyde.

Résidu Position	A 380	D 381	L 382	A 383	S 384	E 460	D 470	G 471	P 472	T 473
A	0,67	0,00	0,00	0,63	0,00	0,03	0,01	0,20	0,06	0,03
R	0,00	0,00	0,00	0,03	0,09	0,00	0,03	0,06	0,05	0,00
N	0,00	0,01	0,00	0,00	0,03	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00
D	0,00	0,94	0,00	0,01	0,00	0,06	0,38	0,00	0,00	0,00
C	0,01	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Q	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,08	0,00	0,05	0,04	0,00
E	0,03	0,01	0,00	0,04	0,00	0,65	0,04	0,04	0,00	0,00
G	0,05	0,00	0,01	0,01	0,05	0,00	0,00	0,47	0,00	0,00
H	0,00	0,01	0,00	0,00	0,03	0,03	0,06	0,00	0,00	0,00
I	0,00	0,00	0,03	0,00	0,08	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00
L	0,00	0,00	0,68	0,03	0,00	0,00	0,00	0,05	0,06	0,00
K	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,04	0,06	0,00	0,00	0,01
M	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,03
F	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P	0,05	0,00	0,01	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,72	0,04
S	0,10	0,00	0,06	0,08	0,48	0,00	0,04	0,01	0,01	0,04
T	0,04	0,00	0,00	0,08	0,10	0,01	0,03	0,01	0,05	0,86
W	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Y	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00
V	0,04	0,01	0,08	0,08	0,01	0,06	0,11	0,09	0,00	0,00
STOP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Taux de mutation	0,33	0,06	0,32	0,37	0,52	0,35	0,62	0,53	0,28	0,14

Tableau 27 : Taux de présence des acides aminés dans chacune des 5 positions des deux séquences mutées Ala378 à Ser384 (ADLAS) et Glu469 à Thr473 (EDGPT) pour les 80 mTK_{gst} mutées sélectionnées

Le résidu Leu382 est majoritairement substitué par une Met ou une Val. Ces résidus sont obtenus par la mutation d'un seul des trois nucléotides du codon CTG codant pour la Leucine. Par ailleurs, nous avons vu lors du criblage de la banque SSM que la mutation L382D était favorable. L'absence de cette mutation ici est certainement due au fait qu'elle nécessite la mutation simultanée des trois nucléotides du codon CTG codant pour la Leu pour obtenir l'un des codons GAT ou GAC codant pour l'Asp. La position Asp470 est la plus fortement mutée, ce résultat est en accord avec la perte d'activité vis-à-vis du D-glycéraldéhyde. Cependant, de même que pour la position Leu382, le résidu Asp470 est majoritairement substitué par des acides aminés qui ne nécessitent la mutation que d'un nucléotide du codon GAC.

Sélection des mTK_{gst} les plus performantes

Au final, quatre mutants ont été sélectionnés dans la banque CM, en se basant sur les A_{rel} après deux heures de réaction en présence du L-glycéraldéhyde et les rapports des activités vis-à-vis du L-glycéraldéhyde sur celle vis-à-vis du D-glycéraldéhyde (Tableau 28).

Mutant	Séquence										A _{rel} L-gly	Rapport L/D*	
	position	380	381	382	383	384	469	470	471	472			473
Séquence sauvage	A	D	L	A	S	E	D	G	P	T			
CM1	A8	A	D	L	A	T	E	H	Q	P	T	3,2	0,3
CM2	C1	A	D	L	E	T	E	T	G	T	T	2,7	0,3
CM3	A5	S	D	L	A	C	E	N	L	P	T	2,4	0,8
CM4	H9	A	D	L	A	S	E	T	G	P	T	2,4	0,8

Tableau 28 : mTK_{gst} mutées sélectionnées à l'issue du second cycle de criblage de la banque CM

* Le rapport L/D représente le rapport des activités L-glycéraldéhyde/D-glycéraldéhyde

Les clones exprimant ces 4 mTK_{gst} mutées seront par la suite mis en culture à plus grande échelle, de manière à obtenir de plus grandes quantités de protéines et à purifier les mTK_{gst} mutées correspondantes pour étudier plus finement leur activité.

2.3.5. Conclusion

Notre objectif était de trouver des mTK_{gst} mutées ayant des activités accrues vis-à-vis d'aldéhydes α -hydroxylés de configuration (2S) tel que le L-glycéraldéhyde. Dans cette optique, 11 186 variants au total ont été criblés vis-à-vis du L-glycéraldéhyde en employant le test pH-métrique. 160 de ces clones, dont les lysats présentent une absorbance supérieure ou égale à 2 fois celle du lysat de la mTK_{gst} sauvage (référence), ont été soumis à un nouveau cycle de culture, de lyse et de criblage afin de confirmer les résultats obtenus lors du premier criblage. Puis, les activités de ces lysats vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde ont été estimées afin de détecter l'énantiopréférence de ces mTK_{gst} mutées.

Les banques obtenues par saturation de site (SSM) sur une position unique, SSM-L382 et SSM-D470, ont conduit à des améliorations très modérées de l'activité vis-à-vis du L-glycéraldéhyde (d'un facteur 2 environ) mais ont permis de mettre en évidence certaines mutations favorables sur chacune des positions. En revanche, la banque SSSM-L382D470 sur les deux positions a conduit à des augmentations significatives de l'activité (jusqu'à 5 fois celle de la mTK_{gst} sauvage), grâce à l'effet coopératif des mutations sur les deux positions. Il est intéressant de constater que certaines des mutations favorables coïncident avec celles identifiées dans les banques SSM sur une position unique, comme les substitutions L382D, L382G, D470S, D470T. De plus, la banque SSM sur les deux positions a permis de mettre en évidence de nouvelles mutations favorables telles que L382N. Les résultats obtenus à partir des banques SSM montrent que les mutations sur les deux positions Leu382 et Asp470 choisies ont une influence notable sur l'amélioration de l'activité de la mTK_{gst} vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et conduisent aussi à une diminution de l'activité vis-à-vis de l'énantiomère D ce qui va dans le sens de l'inversion de l'énantiosélectivité.

La banque obtenue par mutagenèse par cassette (CM) sur deux séquences de 5 acides aminés contigus incluant la Leu382 et l'Asp470 a conduit à une augmentation de l'activité plus modérée vis-à-vis du L-glycéraldéhyde (jusqu'à 3 fois l'absorbance de la mTK_{gst} sauvage lors du deuxième cycle). En effet, avec cette méthode il est rare de modifier significativement une propriété enzymatique dès le premier cycle de mutagenèse, car, étant donné le faible taux de mutation à chaque position, cette méthode nécessite ou bien le criblage d'échantillons très larges, ou bien la succession de plusieurs cycles de mutagenèse à partir des mutations favorables identifiées à chaque cycle. De plus les mutations favorables mises en évidence avec les banques SSM n'étaient pas présentes au sein de l'échantillon criblé.

Au final, quatre variants ont été sélectionnés au sein de chaque banque, SSM-L382D470 et CM, à partir de deux critères, leurs activités accrues vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et diminuée par rapport au D-glycéraldéhyde en présence de lysats. Dans le chapitre suivant, les clones exprimant ces mTK_{gst} sélectionnés seront cultivés à plus grande échelle, dans le but de purifier ces mTK_{gst} mutées et d'étudier plus finement leur activité. Enfin, l'influence des mutations sur les interactions enzyme /substrat sera étudiée par modélisation moléculaire.

2.4. Etude des mTK_{gst} mutées les plus performantes

2.4.1. Introduction

A l'issue du criblage des banques de mTK_{gst} mutées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde, quatre mutants de la banque obtenue par saturation de site sur les deux positions (banque SSM-L382D470) et quatre mutants de la banque obtenue par mutagenèse par cassette (banque CM) ont été sélectionnés. Leurs activités vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde avaient été estimées à partir des lysats non purifiés.

Dans cette partie, les huit clones seront cultivés à plus grande échelle de manière à purifier les mTK_{gst} mutées correspondantes. Leurs activités spécifiques vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde seront déterminées par le test pH-métrique.

A l'issue de ces mesures la mTK_{gst} la plus performante sera sélectionnée et plus finement étudiée. La thermostabilité de ce mutant sera vérifiée. Puis son activité vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde sera étudiée en fonction de la température par dosage indirect du Li-HPA au cours du temps. Une synthèse à l'échelle préparative sera effectuée afin d'isoler et de caractériser le produit formé. Enfin, la structure de la mTK_{gst} mutée la plus performante sera modélisée afin d'étudier les interactions entre les résidus mutés et les substrats accepteurs.

Cette étude a été réalisée avec l'aide de M. Lorillière au cours de son stage de Master 2.

2.4.2. Obtention des mTK_{gst} mutées purifiées

Les quatre double-mutants issus de la banque SSM-L382D470, notés SSM1, SSM2, SSM3 et SSM4 et les quatre mutants issus de la banque CM, notés CM1, CM2, CM3 et CM4 sont présentés dans le tableau suivant :

mTK _{gst} mutées	Positions									
	380	381	382	383	384	469	470	471	472	473
séquence sauvage	A	D	L	A	S	E	D	G	P	T
CM1	A	D	L	A	T	E	H	Q	P	T
CM2	A	D	L	E	T	E	T	G	T	T
CM3	S	D	L	A	C	E	N	L	P	T
CM4	A	D	L	A	S	E	T	G	P	T
SSM1			D				T			
SSM2			N				S			
SSM3			G				S			
SSM4			D				S			

Tableau 29 : Huit mTK_{gst} mutées sélectionnées à l'issue du criblage des banques SSM et CM

La souche d'expression BL21(DE3) d'*E. coli* a été transformée par les plasmides issus des huit clones sélectionnés afin de nous assurer que la variation d'activité observée est bien due au gène muté. Puis des cultures de 400 mL ont été réalisées et les mTK_{gst} mutées ont été purifiées par chromatographie d'affinité d'ions métalliques (IMAC) sur une résine Ni-NTA (Tableau 30).

TK	Volume de culture	Masse de cellules	Protéines purifiées
	[mL]	[g]	[mg]
mTK _{gst} sauvage	1000	3,8	160
CM1	400	1,1	38,0
CM2	400	1,17	14,8
CM3	400	1,15	40,6
CM4	400	1,24	55,6
SSM1	400	1,52	77,8
SSM2	400	1,44	76,0
SSM3	400	1,23	74,4
SSM4	400	1,47	70,0

Tableau 30 : Purification des mTK_{gst} mutées par IMAC

2.4.3. Détermination des activités spécifiques vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde

Les activités spécifiques des mTK_{gst} mutées purifiées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde ont été déterminées grâce au test d'activité pH-métrique décrit page 156, en présence de 84 μ M de rouge de phénol (Figure 114). Les résultats montrent que l'augmentation de l'activité vis-à-vis du L-glycéraldéhyde est modérée pour les mTK_{gst} issues de la banque CM (environ 2 fois celle de la mTK_{gst} sauvage) et plus importante pour les mTK_{gst} mutées issues de la banque SSM, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment avec les lysats.

En particulier, les doubles mutants SSM1 (L382D/D470T) et SSM4 (L382D/D470S) présentent les activités les plus élevées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde c'est-à-dire environ 0,5 U/mg, soit 5 fois l'activité de la mTK_{gst} sauvage.

Par ailleurs, les activités vis-à-vis du D-glycéraldéhyde de toutes les mTK_{gst} mutées sont significativement réduites (d'un facteur 6 ou plus) par rapport à celle de l'enzyme sauvage.

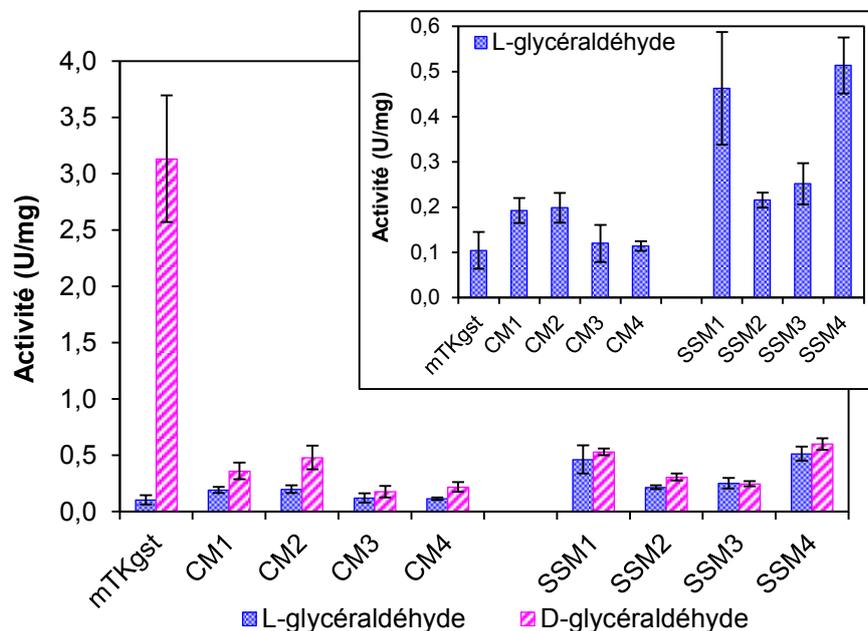


Figure 114 : Activités spécifiques des mTK_{gst} mutées purifiées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde

La figure encadrée est un agrandissement des activités obtenues en présence du L-glycéraldéhyde. Le milieu contient 84 μ M de rouge de phénol, 2,4 mM de ThDP, 9 mM de MgCl₂, 20 mM de D- ou de L-glycéraldéhyde, 50 mM de Li-HPA, 2 mM de tampon TEA pH 7,5 et mTK_{gst} mutées purifiées : 20 - 50 μ g ou mTK_{gst} sauvage purifiée : 4 μ g avec D-glycéraldéhyde ou 90 μ g avec L-glycéraldéhyde). Volume total : 200 μ L. L'absorbance est mesurée à 560 nm, à 28 °C.

Détermination du facteur d'énantiosélectivité E

Le paramètre permettant d'évaluer l'énantiosélectivité d'une enzyme est le facteur d'énantiosélectivité E . Nous avons vu précédemment qu'il était possible de calculer ce paramètre à partir des constantes cinétiques K_M et V_{max} de l'enzyme sauvage pour chacun des substrats (équation (6)). Pour la mTK_{gst} de type sauvage, un E_R de 90 avait été calculé en faveur de l'énantiomère D- ou (2R) du glycéraldéhyde. Il est toutefois possible de calculer un E estimé à partir des vitesses initiales des réactions pour l'un et l'autre des énantiomères (équation (7)). [152] Ce E estimé se rapproche d'autant plus du E réel que les concentrations en substrats sont inférieures à leurs K_M . [152] Le facteur E de la mTK_{gst} vis-à-vis du L-glycéraldéhyde (noté E_S), calculé à partir des K_M et V_{max} est de 0,01. Le E_S estimé calculé à partir des vitesses initiales mesurées ici est alors de 0,03. Bien que le E_S et le E_S estimé diffèrent légèrement, ils sont du même ordre de grandeur, ce qui signifie que le E_S estimé peut être raisonnablement utilisé afin de comparer l'énantiosélectivité des mTK_{gst}.

$$E = \frac{(V_{max}/K_M)_{\text{énantiomère 1}}}{(V_{max}/K_M)_{\text{énantiomère 2}}} \quad (6)$$

$$E \text{ estimé} = \frac{(v_{initiale})_{\text{énantiomère 1}}}{(v_{initiale})_{\text{énantiomère 2}}} \quad (7)$$

Ainsi les E_S estimés ont été calculées pour les huit mTK_{gst} mutées à partir des vitesses initiales mesurées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde (Figure 115). Les résultats montrent que toutes les mTK_{gst} mutées présentent un E_S nettement supérieur à celui de la mTK_{gst} sauvage. Il atteint la valeur de 1 au maximum soit aucune sélectivité entre les deux énantiomères. Néanmoins il a été augmenté d'un facteur 100 par rapport au E_S de l'enzyme sauvage.

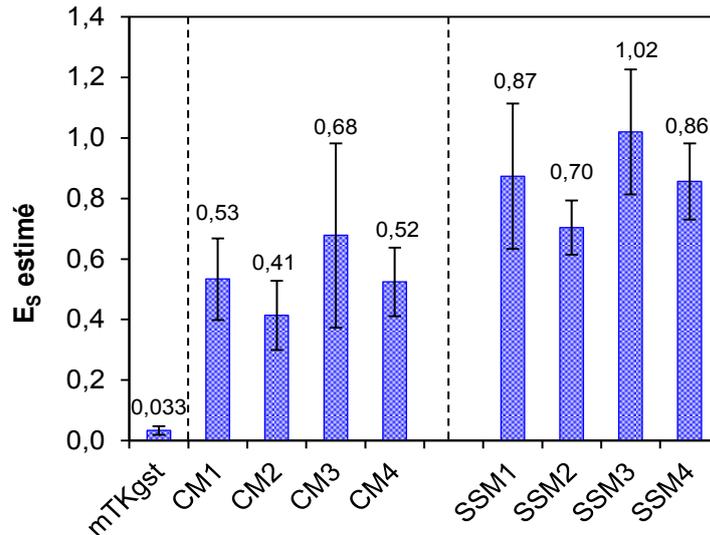


Figure 115 : Facteur d'énantiosélectivité E_s estimé, pour les huit mTK_{gst} et la mTK_{gst} sauvage

Le milieu contient 84 μ M de rouge de phénol, 2,4 mM de ThDP, 9 mM de MgCl₂, 20 mM de D- ou de L-glycéraldéhyde, 50 mM de Li-HPA, 2 mM de tampon TEA pH 7,5 et mTK_{gst} mutées purifiées : 20 - 50 μ g ou mTK_{gst} sauvage purifiée : 4 μ g (D-glycéraldéhyde) ou 90 μ g (L-glycéraldéhyde). Volume total : 200 μ L. L'absorbance est mesurée à 560 nm, à 28 °C.

Choix de la mTK_{gst} la plus performante

Afin de sélectionner le variant le plus performant parmi les huit mTK_{gst} mutées, nous avons décidé de considérer les deux paramètres suivants : activité vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et facteur E_s . La Figure 116, représentant l'activité spécifique vis-à-vis du D-glycéraldéhyde en fonction de l'activité spécifique vis-à-vis du L-glycéraldéhyde, permet de visualiser ces deux paramètres simultanément sur un même graphique. Ainsi, il apparaît alors que le double mutant L382D/D470S (SSM4) présente à la fois la plus forte activité vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et un E_s parmi les plus élevés.

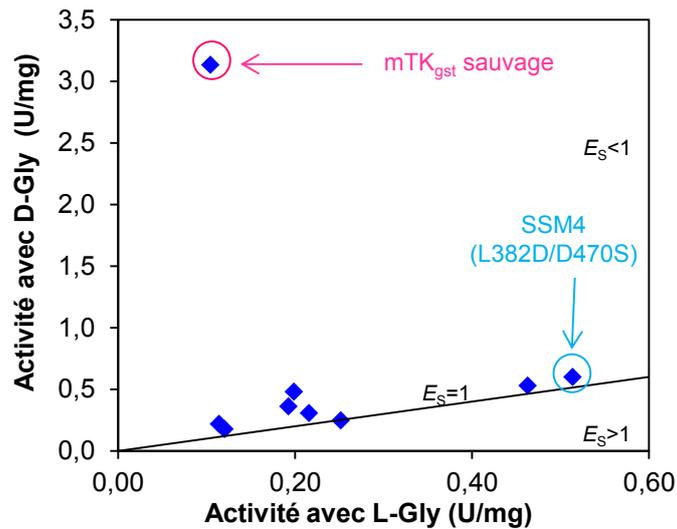


Figure 116 : Activité spécifique vis-à-vis du D-glycéraldéhyde en fonction de l'activité spécifique vis-à-vis du L-glycéraldéhyde, pour les huit mutants et la mTK_{gst} sauvage

Le milieu contient 84 μM de rouge de phénol, 2,4 mM de ThDP, 9 mM de MgCl_2 , 20 mM de D-glycéraldéhyde (D-Gly) ou de L-glycéraldéhyde (L-Gly), 50 mM de Li-HPA, 2 mM de tampon TEA pH 7,5 et mTK_{gst} mutées purifiées : 20 - 50 μg ou mTK_{gst} sauvage purifiée : 4 μg (D-glycéraldéhyde) ou 90 μg (L-glycéraldéhyde). Volume total : 200 μL . L'absorbance est mesurée à 560 nm, à 28 °C.

Les activités spécifiques obtenues avec les 8 mTK_{gst} mutées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde peuvent être mises en regard des mutations identifiées après séquençage (Tableau 29).

L'analyse des séquences des 4 mutants les plus actifs de la banque CM montre, que l'une des deux positions clés, Leu382, n'a subi aucune mutation. Cette absence de mutation est en réalité inhérente à la construction de la banque CM, comme cela avait déjà été remarqué suite au séquençage d'un échantillon de cette banque (chapitre « *Construction des banques de mTK_{gst} mutées* »). En effet, le fait que la Leu puisse être codée par six codons différents du fait de la redondance du code génétique, combiné au taux de dégénérescence employé (30%) rendent sa probabilité de mutation faible. Sur l'autre position clé D470, les mutants sélectionnés dans la banque CM comportent deux fois une Thr, une His ou une Asn. Il est à souligner que dans le cas des mutants les plus performants de la banque SSM, la position 470 est occupée aussi par un acide aminé polaire (Thr ou Ser) soulignant l'importance de ce type de résidu dans cette position. La perte de l'énantiosélectivité serait donc liée en partie à cette mutation. Nous analyserons plus finement le rôle d'un tel résidu au niveau du site actif dans la dernière partie de ce chapitre, sur la base du modèle de la mTK_{gst} qui a été construit.

Toujours dans le cas de la banque CM, bien que les mutations sur les positions contiguës aux deux résidus clés Leu382 et Asp470 n'aient pas entraîné d'augmentation très

significative de l'activité vis-à-vis du L-glycéraldéhyde, les résultats obtenus avec les mutants de cette banque ont néanmoins permis de mettre en évidence des positions très conservées (381, 469 , 473). Afin d'améliorer les résultats, une perspective serait de « fixer » les positions 382 et 470 (en remplaçant Leu382 et Asp470 par les résidus les plus favorables identifiés par la SSM) ainsi que les résidus hautement conservés et réaliser ensuite sur les autres acides aminés des deux séquences (notamment 384 et 471) des mutations aléatoires.

L'analyse des séquences des 4 mutants les plus actifs de la banque SSM montre un réel effet coopératif des mutations sur les deux positions. Les deux mutants (SSM1, L382D/D470T et SSM4, L382D/D470S) conduisant aux meilleures activités vis-à-vis du L-glycéraldéhyde sont obtenues lorsque Leu est remplacé par un Asp. Ce résultat vient conforter l'hypothèse selon laquelle, un résidu chargé dans cette position pourrait établir une interaction avec l'hydroxyle du C2(S) du L-glycéraldéhyde conduisant à une amélioration de l'activité vis-vis de ce substrat. La mutation de l'Asp470 par une Thr ou une Ser, comme nous l'avons vu pour la banque CM, est également bénéfique pour l'activité vis-à-vis de ce substrat. Le rôle de ces doubles mutations sur l'augmentation des activités vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et sur la diminution de l'activité vis-à-vis de l'autre énantiomère sera interprété dans le dernier paragraphe de ce chapitre.

2.4.4. Etude du mutant mTK_{gst}-L382D/D470S

2.4.4.1. Etude de la thermostabilité

Afin de vérifier la thermostabilité du variant L382D/D470S, l'enzyme purifiée a été incubée durant une heure à 65°C, température optimale de la mTK_{gst} sauvage, et son activité a été mesurée avant et après incubation (Figure 117). Pour cela, le test d'activité en présence de NADH (test_{NADH}) a été employé. S'agissant des substrats de référence de la mTK_{gst} sauvage (le L-érythrose et le D-ribose), nous avons au préalable vérifié que la mTK_{gst} mutée acceptait ces substrats. L'activité est environ 10 fois inférieure à celle de la mTK_{gst} mais elle est suffisante pour réaliser le test. Les résultats montrent qu'après une incubation d'une heure à 65 °C, l'activité du mutant L382D/D470S reste inchangée, confirmant ainsi sa stabilité thermique à 65°C de même que l'enzyme parent.

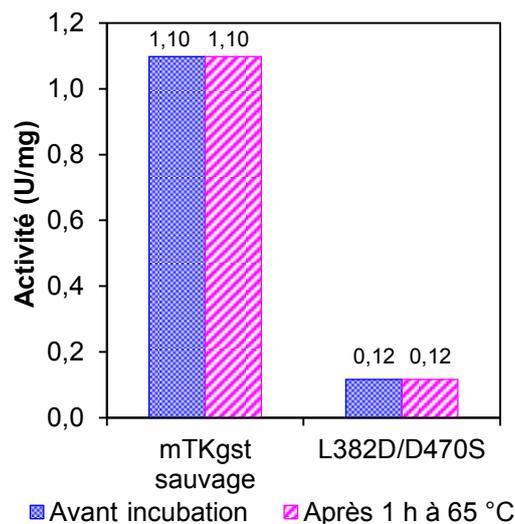


Figure 117 : Thermostabilité de mTK_{gst} sauvage et du mutant L382D/D470S à 65°C durant une heure

Les activités ont été mesurées avec le test_{NADH} à 20°C

2.4.4.2. Etude des vitesses relatives à 20°C et 50°C

Pour toutes les mesures réalisées précédemment, les activités des mTK_{gst} mutées vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde obtenues avec le test d'activité pH-métrique ont été déterminées arbitrairement à 28°C car le lecteur de microplaques utilisé ne peut être thermostaté à 65°C, température optimale de la mTK_{gst}. Les conditions du test pH-métrique ont donc été optimisées avec cet appareil et à cette température. Pour déterminer ces

activités à plus haute température, une autre méthode a été utilisée : le dosage indirect du Li-HPA au cours du temps. Cette méthode, précédemment employée pour étudier la spécificité de substrat de la mTK_{gst} de type sauvage, consiste à réaliser les réactions dans un volume de 1 mL et prélever des échantillons au cours du temps afin de doser le HPA restant par un test enzymatique en présence de la LDH et de NADH. Du fait de l'instabilité du Li-HPA précédemment montrée, la température maximale étudiée est 50°C. Les activités de la mTK_{gst} sauvage et de la mTK_{gst} -L382D/D470S vis-à-vis du L- et du D-glycéraldéhyde ont ainsi été déterminées à 20 °C et à 50 °C (Figure 118).

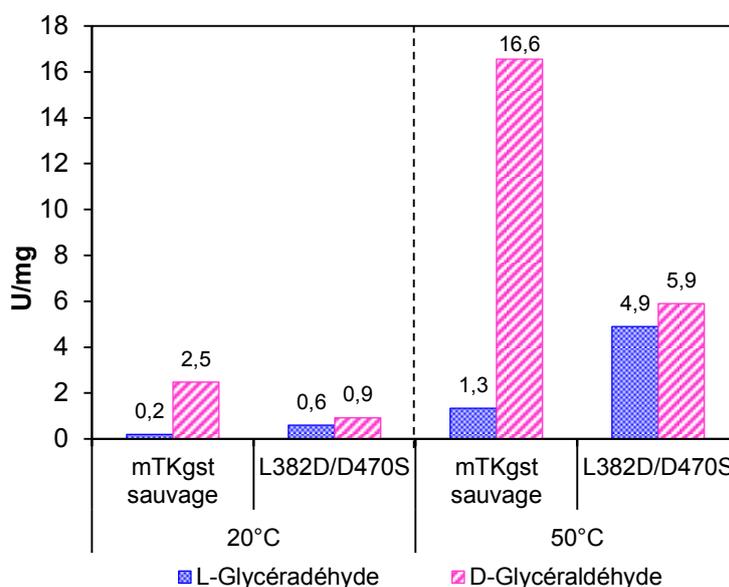


Figure 118 : Activité de la mTK_{gst} sauvage et de la mTK_{gst} -L382D/D470S vis-à-vis du L- et du D-glycéraldéhyde en fonction de la température

Le milieu contient 50 mM de Li-HPA, 50 mM de D- ou de L-glycéraldéhyde 2,4 mM de ThDP, 9 mM de $MgCl_2$, 50 mM de tampon Gly-gly à pH 7,5 et 500 μ g de mTK_{gst} mutée purifiée ou μ g de mTK_{gst} sauvage purifiée. Volume total : 1 mL. Le Li-HPA non-consommé est dosé au cours du temps durant 30 minutes en présence de LDH et NADH.

Les résultats montrent que comme attendu, les activités sont nettement améliorées à 50 °C par rapport à la température ambiante (20°C) pour la mTK_{gst} -L382D/D470S comme pour la mTK_{gst} sauvage. En particulier, l'activité de la mTK_{gst} -L382D/D470S vis-à-vis du L-glycéraldéhyde passe de 0,6 U/mg à 20°C à 4,9 U/mg à 50°C soit une amélioration d'un facteur 8 environ. Toutefois, même à 50°C, l'énantiosélectivité de ce mutant reste en légère faveur de l'énantiomère de configuration (2R) (D-glycéraldéhyde).

2.4.4.3. Synthèse et caractérisation du produit formé

L'activité du mutant mTK_{gst} -L382D/D470S vis-à-vis du L-glycéraldéhyde a été jusqu'ici observée grâce au changement de pH de la réaction ou à la disparition du substrat. Afin de confirmer que ces activités sont réellement dues à une activité transcétolase, une synthèse à plus grande échelle a été réalisée afin d'isoler et de caractériser le produit formé. Le Li-HPA est mis en réaction avec le L-glycéraldéhyde en présence de mTK_{gst} -L382D/D470S à 50 °C (Figure 119).

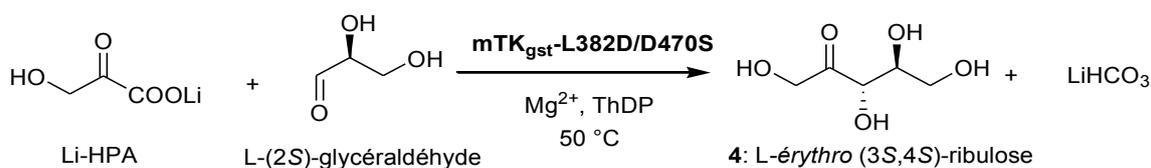


Figure 119 : Synthèse du l-ribulose catalysée par la mTK_{gst} -L382D/D470S

Le suivi de la réaction par dosage du Li-HPA au cours du temps montre que celui-ci a été presque intégralement consommé au bout de 6 h (contre environ 24 h avec la mTK_{gst} sauvage). Après purification sur gel de silice, un produit a été obtenu avec un rendement de 90 %. Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C confirment qu'il s'agit bien du L-ribulose.

2.4.4.4. Construction d'un modèle moléculaire du mutant mTK_{gst} -L382D/D470S

Dans le but d'interpréter l'activité accrue du mutant mTK_{gst} -L382D/D470S vis-à-vis du L-glycéraldéhyde par rapport à la mTK_{gst} sauvage, mais également son activité quasiment indifférenciée pour les deux énantiomères L- et D-glycéraldéhyde, nous nous sommes intéressés aux interactions entre ces substrats et les résidus du site actif de la mTK_{gst} mutée. Pour cela, un modèle du mutant mTK_{gst} -L382D/D470S a été construit à partir du modèle précédemment obtenu pour la mTK_{gst} sauvage. Dans ce nouveau modèle, le cofacteur est représenté sous sa forme DHE-ThDP (dihydroxyéthyle-ThDP), dans laquelle le C2 du cycle thiazolium est lié de façon covalente au groupe carbonyle du groupement « cétole » du substrat donneur. Le complexe DHE-ThDP sous forme carbanion est alors prêt à réagir avec le substrat accepteur (Figure 120).

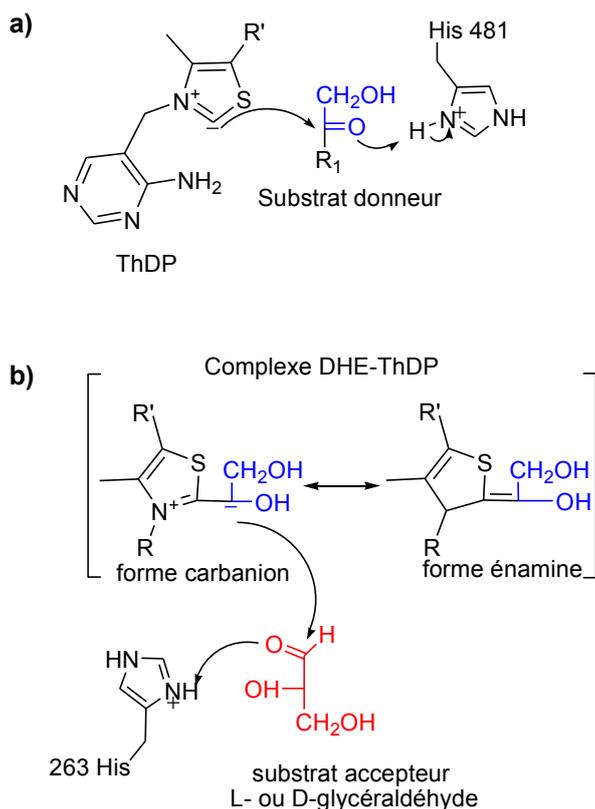


Figure 120 : Formation du complexe DHE-ThDP

a) Réaction entre le substrat donneur et le ThDP ; b) Complexe DHE-ThDP

Ensuite, les deux substrats L- et D-glycéraldéhyde ont été respectivement ajoutés à la structure et placés de manière à ce que leur position soit favorable à la réaction de transfert du groupement céto sur le carbone électrophile de l'aldéhyde (C1) du substrat, c'est-à-dire dans une position telle que l'oxygène de la fonction aldéhyde soit stabilisé par les His263 et His28. Les deux nouvelles structures obtenues, d'une part avec le L-glycéraldéhyde et d'autre part avec le D-glycéraldéhyde, ont ensuite été traitées à l'aide du logiciel Sybyl 2.1 afin de réaliser une minimisation d'énergie. Les résultats montrent que les deux mutations (L382D et D470S) apportées à mTK_{gst} n'entraîneraient pas de modification de la structure tertiaire du site actif (Figure 121).

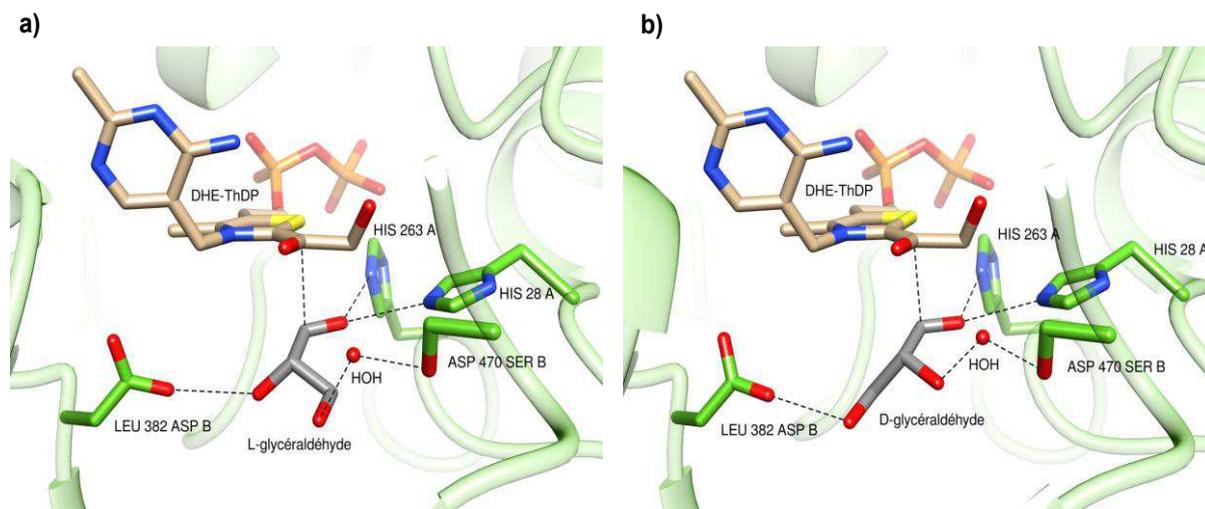


Figure 121 : Modèle du site actif de la mTK_{gst}-L382D/D470S en présence des substrats accepteurs

a) En présence du L-glycéraldéhyde ; b) en présence du D-glycéraldéhyde

Dans la structure de la mTK_{gst} sauvage, la présence du résidu hydrophobe Leu382 aurait pour rôle de « repousser » les substrats porteurs de fonction hydroxyles (hydrophiles) vers la partie du site actif occupée par l'Asp470. Comme nous l'avons vu précédemment, seuls les aldéhydes α -hydroxylés de configuration (2*R*) peuvent alors établir une interaction directe avec l'Asp470 et ainsi être positionnés de façon favorable à la réaction de transfert du groupement « céto » sur la face *re* de la fonction aldéhyde. Ceci explique l'énantiosélectivité des TK de type sauvage en faveur des aldéhydes α -hydroxylés de configuration de (2*R*).

Dans le cas de la mTK_{gst} mutée étudiée présentant les mutations L382D et D470S, une interaction directe serait possible entre l'hydroxyle en C2 de configuration (*S*) du substrat L-glycéraldéhyde et l'Asp en position 382, tout en autorisant une position favorable de cet aldéhyde pour la réaction de transfert du « céto » (Figure 121a). De plus, l'hydroxyle en C3 du substrat est stabilisé grâce à une interaction possible avec la Ser en position 470 *via* une molécule d'eau. Ces considérations permettraient donc d'interpréter l'activité de la mTK_{gst}-L382D/D470S vis-à-vis du L-glycéraldéhyde plus importante que celle obtenue avec l'enzyme sauvage.

Par ailleurs, les interactions entre le site actif de cette mTK_{gst} mutée et le D-glycéraldéhyde ont également été étudiées à l'aide de ce modèle. Dans ce cas, la Ser en position 470 est beaucoup moins favorable par rapport à l'Asp pour établir une interaction hydrogène directe avec le groupement hydroxyle du C2(*R*). Cependant une interaction indirecte *via* une molécule d'eau serait envisageable entre ce groupement hydroxyle et la Ser470. Cette observation permettrait donc d'expliquer la plus faible activité du mutant par rapport à

l'enzyme sauvage vis-à-vis de l'énantiomère D. Une autre interaction paraît envisageable entre le groupement hydroxyle en C3 du D-glycéraldéhyde et l'Asp en position 382. Ces deux mutations n'entraînent pas de changement quant au positionnement du C1 de la fonction aldéhyde de l'accepteur par rapport au DHE-ThDP et ainsi la réaction de transfert serait toujours stériquement possible, mais avec une moindre efficacité par rapport à l'enzyme sauvage, comme le montrent les résultats expérimentaux (Figure 121b).

Ainsi, ce modèle permet de formuler des hypothèses expliquant l'activité quasiment indifférenciée de la mTK_{gst} -L382D/D470S vis-à-vis des deux énantiomères du glycéraldéhyde, puisque le même nombre et le même type d'interactions sont observées entre l'enzyme et les deux substrats.

Remarque : des interprétations similaires peuvent être formulées avec une Thr en position 470 à la place de la Ser. En effet, ces deux résidus portent une fonction hydroxyle dont la position par rapport au substrat est similaire. Ceci expliquerait que le mutant mTK_{gst} -L382D/D470T (SSM1) présente des activités vis-à-vis du L- et D-glycéraldéhyde comparables à celles de la mTK_{gst} -L382D/D470S.

2.4.5. Conclusion

L'étude des mTK_{gst} mutées purifiées ont permis de confirmer les résultats précédemment obtenus à partir des lysats. Les doubles mutants de la banque SSM présentent des activités plus élevées que les mutants sélectionnés à partir de la banque CM. La mTK_{gst} la plus performante porte les mutations L382D/D470S. Elle présente environ 5 fois plus d'activité vis-à-vis du L-glycéraldéhyde que la mTK_{gst} et une diminution d'un facteur 6 par rapport au D-glycéraldéhyde. Ceci se traduit par une augmentation du facteur d'énantiosélectivité E_S d'environ 100 (E_S d'environ 1 pour le mutant contre environ 0,01 pour l'enzyme sauvage). Cependant, l'énantiosélectivité n'a pas été inversée (E de 1). La thermostabilité à 65°C de ce mutant a été confirmée. Puis l'étude des activités en fonction de la température a montré que celles-ci sont nettement améliorées à 20 °C par rapport à 50°C. Une activité de 4,9 U/mg vis-à-vis du L-glycéraldéhyde à 50°C a été obtenue avec la mTK_{gst} -L382D/D470S contre 1,3 U/mg avec la mTK_{gst} à la même température. Une synthèse à échelle préparative en présence de Li-HPA, de L-glycéraldéhyde et de ce mutant a permis de confirmer par RMN que le L-ribulose était effectivement formé.

Enfin, un modèle de la structure tridimensionnelle du site actif de la mTK_{gst}-L382D/D470S a été construit afin d'expliquer l'amélioration de l'activité du L-glycéraldéhyde par rapport à l'enzyme sauvage et la diminution de celle-ci avec l'énantiomère D. L'hydroxyle en C2 (S) du L-glycéraldéhyde accepteur pourrait établir une liaison hydrogène directe avec l'Asp en position 382 de la mTK_{gst} mutée, de façon similaire à celle existante entre l'hydroxyle en C2 (R) de l'accepteur et l'Asp 470 chez la mTK_{gst} sauvage. La Ser en position 470 permettrait quant à elle de stabiliser l'hydroxyle en C3 de l'accepteur. Par ailleurs, les plus faibles activités obtenues avec l'énantiomère D pourraient s'expliquer par l'interaction indirecte de l'hydroxyle du C2 (R) avec la ser380 via une molécule d'eau. Ces mutations maintiendraient le D-glycéraldéhyde dans une position qui reste favorable au transfert du groupement « cétole » sur la fonction aldéhyde mais avec une moindre efficacité que l'enzyme sauvage.

En conclusion, ces travaux ont permis de faire émerger dès le premier cycle de mutagenèse une mTK_{gst} mutée qui présente une amélioration de l'activité vis-à-vis d'un aldéhyde α -hydroxylé de configuration (2S). Ce mutant présente conjointement une diminution de l'activité vis-à-vis de la configuration (2R) ce qui constitue une première étape significative vers l'inversion de l'énantiosélectivité de l'enzyme. La banque SSM nous a permis de comprendre l'influence des mutations identifiées comme les plus favorables sur l'énantiosélectivité. Les travaux décrits dans la littérature concernant l'inversion de l'énantiosélectivité d'enzymes [162, 179] montrent que plusieurs cycles de mutagenèse/criblage sont nécessaires afin d'obtenir une enzyme optimisée. Cette stratégie sera envisagée pour la suite de nos travaux, à partir des mTK_{gst} les plus performantes obtenues à ce stade. L'effet coopératif de nouvelles mutations sur d'autres positions pourrait être envisagées selon une approche dirigée ou encore semi-aléatoire sur des séquences plus larges en utilisant la technique de mutagenèse par cassette mais cette fois « en fixant » les résidus identifiés comme étant les plus favorables c'est-à-dire D382 et S ou T470.

Conclusion et Perspectives

Les travaux de thèse qui viennent d'être présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans le cadre d'un projet visant à obtenir une nouvelle transcétolase (TK) thermostable et à inverser l'énantiosélectivité de cette enzyme. Rappelons que toutes les TK décrites jusqu'ici acceptent exclusivement les substrats α -hydroxylés de configuration (2R) conduisant ainsi à la formation de cétooses D-*thréo* (3S, 4R). Ainsi, l'objectif final de notre projet est d'accéder aux composés cétooses L-*érythro* (3S, 4S) *via* la TK, à partir de substrats α -hydroxylés de configuration (2S). Ce projet collaboratif et pluridisciplinaire a été développé conjointement avec notre partenaire le Pr. W.D. Fessner de l'Université Technique de Darmstadt en Allemagne et en collaboration avec le Genoscope d'Evry.

La majorité des objectifs que nous nous étions fixés ont été atteints. Les principales étapes qui ont été franchies sont les suivantes :

✓ Une transcétolase thermostable, jamais décrite jusqu'alors, a été identifiée, produite et caractérisée. Elle est issue d'un microorganisme thermophile, *Geobacillus stearothermophilus*. Le gène codant pour la TK dans ce micro-organisme a été identifié par homologie de séquence avec le gène homologue de *Bacillus anthracis*, synthétisé et cloné par nos partenaires du Genoscope d'Evry. Cette nouvelle TK, notée mTK_{gst}, a été comparée aux TK connues de *S. cerevisiae* (TK_{sce}) et d'*E. coli* (TK_{eco}). Sa thermostabilité est accrue par rapport à ces deux TK : elle est active jusqu'à 70 °C (contre environ 40°C pour la TK_{sce} et 55°C pour la TK_{eco}) et stable durant plus d'une semaine à 50 °C et sur 3 jours à 65 °C. Ceci permet par ailleurs de faciliter grandement sa purification par rapport aux autres TK, grâce à la technique du traitement thermique. De plus, cette stabilité thermique va de pair avec une bonne tolérance aux co-solvants : la mTK_{gst} conserve une activité non-négligeable après 24 h d'incubation dans 50 % de cosolvants tels que le DMSO, le DMF, le butanal ou encore l'acétonitrile. Notre premier objectif, celui de disposer d'une TK robuste en vue des expériences de mutagenèse, a donc été atteint.

✓ La spécificité de substrat, la stéréospécificité et l'énantiosélectivité de cette nouvelle TK ont été examinées. La spécificité de substrat de mTK_{gst} est tout à fait comparable à celle des autres TK étudiées, avec une activité préférentielle vis-à-vis des substrats hydroxylés par rapport aux substrats hydrophobes. Toutefois, les cinétiques observées avec mTK_{gst} à plus haute température sont nettement améliorées par rapport à celles des autres TK en présence de substrats accepteurs de référence. Par exemple, la vitesse de réaction de la mTK_{gst} vis-à-vis du glycolaldéhyde à 50°C est 4,7 fois plus importante que celle de la TK_{eco}

dans les mêmes conditions. La stéréospécificité a été étudiée par la caractérisation des produits formés à partir du glycolaldéhyde et du butanal et a montré, que comme pour les autres TK, le C3 formé est de configuration (S) ($ee > 95\%$ pour le glycolaldéhyde et $ee 85\%$ pour le butanal). En revanche, l'énantiosélectivité de mTK_{gst} diffère légèrement des autres TK : bien qu'elle accepte très préférentiellement les substrats (2R)-hydroxyaldéhydes, une réaction a lieu avec un (2S)-hydroxyaldéhyde. En effet, le L-ribulose a pu être isolé à partir du L-glycéraldéhyde. Une telle activité, bien que faible, n'avait jamais été observée jusqu'ici avec les autres TK. Un facteur d'énantiosélectivité E de 0,01 a été obtenu vis-à-vis du L-glycéraldéhyde (soit un E de 90 en faveur de l'énantiomère D).

✓ Un modèle structural de mTK_{gst} a été construit par homologie de séquence avec la TK de *Bacillus anthracis*. Ce modèle a permis d'identifier deux positions clés au sein du site actif pouvant avoir un rôle dans la modification de l'énantiosélectivité de l'enzyme. L'Asp470 a été choisi car son groupement carboxylate interagit avec l'hydroxyle en C2 des aldéhydes α -hydroxylés de configuration (2R) ce qui lui confère un rôle crucial dans l'énantiosélectivité. De plus, nous avons identifié un autre résidu, la Leu382, située à l'opposé de cet Asp par rapport au substrat accepteur, qui pourrait donc potentiellement, une fois remplacée par un autre acide aminé, établir une interaction avec les substrats de configuration (2S).

✓ Plusieurs banques de mTK_{gst} mutées ont été construites selon deux stratégies différentes. La première est une stratégie rationnelle qui consiste à muter individuellement puis simultanément les positions identifiées précédemment par mutagenèse de saturation de site (SSM). Cette technique a été optimisée puis mis en œuvre par nos partenaires de l'équipe du Pr. Fessner de l'Université Technique de Darmstadt, Allemagne. Elle a conduit à l'obtention de deux banques par SSM sur une seule position (192 clones chacune) et d'une banque SSM sur les deux positions (3 456 clones). Une seconde stratégie, semi-rationnelle, a été employée en s'appuyant sur des exemples décrits dans la littérature par le Pr. M. Reetz dans lesquels certains résidus intervenant dans la modification de l'énantiosélectivité de lipases n'étaient pas directement impliqués dans la reconnaissance du substrat. Ainsi, des séquences de cinq acides aminés autour des positions Leu382 et Asp470 identifiées précédemment ont été définies. Une nouvelle technique, basée sur la mutagenèse par cassette (CM) a été développée puis en mise en œuvre afin de muter ces positions avec un taux de dégénérescence de 30 %. Ce travail a été réalisé au Genoscope d'Evry et a permis l'obtention d'une banque de 7 680 clones. Ainsi, notre second objectif d'obtenir des banques de mTK_{gst} mutées pour la modification de l'énantiosélectivité a été atteint.

✓ Un nouveau test d'activité de la TK a été mis au point. Ce test basé sur le suivi pH-métrique de la réaction en présence d'un indicateur coloré, le rouge de phénol. Ce test a été optimisé et calibré pour la détermination quantitative de l'activité et sa fiabilité a été vérifiée en présence de quelques substrats par la comparaison des K_M connus dans la littérature avec ceux obtenus par le test. Ce test présente de nombreux avantages par rapport à ceux décrits jusqu'alors car il est direct, rapide, facile à mettre en œuvre, peu coûteux et convient à tout type de substrat accepteurs. Néanmoins sa gamme de linéarité est limitée (5 à 26 mU) et il est moins sensible que les tests en présence de NADH. Cependant nous avons montré que ce test pH-métrique peut être adapté au criblage à haut-débit des mTK_{gst} mutées sous forme de lysats en présence de L-glycéraldéhyde. Sa sensibilité a notamment été améliorée par l'augmentation de la concentration en indicateur pH-métrique et du temps de mesure et par la diminution du pH initial. Au final, un test de criblage haut-débit, miniaturisé en plaque 96-puits, automatisable, facile à mettre en œuvre, peu coûteux et à la fois compatible avec des TK sous forme de lysats et avec nos substrats d'intérêt a été développé. Cette étape était indispensable à notre projet, aucun des tests existants jusqu'alors ne respectaient l'ensemble des prérequis. Notre troisième objectif a donc été atteint.

✓ Le criblage des banques de mTK_{gst} mutées a été mis en œuvre. Au total, 11 616 mutants sous forme de lysats ont été criblés vis-à-vis du L-glycéraldéhyde. Les 160 mTK_{gst} mutées présentant une absorbance entre 2 et 7 fois celle de la mTK_{gst} sauvage, ont été sélectionnées, de nouveau criblées et séquencées. Puis, leurs activités vis-à-vis du D-glycéraldéhyde et du L-glycéraldéhyde ont été estimées à partir des lysats. Enfin, les 4 mTK_{gst} mutées les plus performantes de chaque banque (SSM et CM) ont été choisies sur deux critères : leur activité vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et le rapport de leurs activités vis-à-vis du L-glycéraldéhyde / D-glycéraldéhyde. A l'issue de ce premier cycle de mutagenèse et de criblage, la stratégie rationnelle (SSM) s'est avérée la plus fructueuse : elle a permis d'améliorer l'activité de la mTK_{gst} vis-à-vis du L-glycéraldéhyde d'un facteur 5, contre un facteur 2 avec la stratégie semi-rationnelle (CM). En effet, dans ce dernier cas, le nombre de clones criblés ne représentait qu'un petit échantillon de la banque CM. Compte tenu du taux de dégénérescence appliqué et du biais de la méthode, certaines mutations attendues n'ont pas été obtenues.

✓ Enfin, les huit mTK_{gst} identifiées comme les plus performantes ont été purifiées conduisant à des résultats similaires à ceux obtenus en présence des lysats. La mTK_{gst} L382D/D470S est 5 fois plus active vis-à-vis du L-glycéraldéhyde que l'enzyme sauvage et montre aussi une nette diminution de l'activité vis-à-vis du D-glycéraldéhyde. Les positions 382 et 470 choisies d'après la structure du site actif, induisent ainsi une amélioration de

l'énantiosélectivité E_S d'un facteur 100 (de 0,01 pour l'enzyme sauvage à 1 pour le L382D/D470S). Cependant, ce premier cycle de mutagenèse n'a pas encore permis d'inverser l'énantiosélectivité puisque cette mTK_{gst} mutée accepte avec des activités similaires les deux énantiomères (2S) et (2R) du glycéraldéhyde. Un modèle structural de ce double-mutant a permis de montrer que le groupement carboxylate de l'Asp382 permettrait une interaction directe avec l'hydroxyle du C2 de l'énantiomère L du glycéraldéhyde. La Ser470 établirait quant à elle une interaction indirecte *via* une molécule d'eau avec l'hydroxyle du C2 de l'énantiomère D alors que l'Asp470 dans l'enzyme sauvage interagit directement avec cet hydroxyle, cette observation expliquerait la plus faible activité obtenue expérimentalement. Ces mutations maintiendraient les substrats dans une position qui reste favorable au transfert du groupement « céto » sur la fonction aldéhyde du substrat accepteur mais avec une moindre efficacité comme l'indiquent les résultats expérimentaux.

L'ensemble de ces travaux offre de nombreuses perspectives :

☞ Cette TK thermostable, mTK_{gst}, ouvre la voie vers de nouvelles applications en biocatalyse. Cette enzyme, sous forme libre ou immobilisée, fait l'objet d'investigations actuelles au laboratoire, dans le cadre d'un projet ANR « Nanocausys », dont le but est de développer des procédés à plus haute température, en présence de solvants non-conventionnels afin d'augmenter l'activité de mTK_{gst} vis-à-vis d'aldéhyde hydrophobes ou polyhydroxylés plus longues chaînes (C5 ou C6).

☞ L'étude de la mTK_{gst}-L382D/470S sera poursuivie tout d'abord avec le D- et le L-glycéraldéhyde afin de déterminer les paramètres cinétiques vis-à-vis de ces deux énantiomères. Nous envisagerons également d'augmenter encore l'activité vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et de dépasser la simple perte d'énantiosélectivité jusqu'à l'inversion de celle-ci, en effectuant d'autres cycles de mutagenèse et de criblage. Notamment, de nouvelles banques CM pourront être construites à partir des résultats précédents, par exemple en « fixant » les résidus Asp382 et Ser470 identifiés comme importants pour la modification de l'énantiosélectivité. Les résidus qui les entourent pourront être modifiés en utilisant un taux de dégénérescence plus élevé et/ou en modulant la définition des séquences.

☞ L'étude des mTK_{gst} mutées ainsi optimisées pourra être étendue à de nouveaux aldéhydes α -hydroxylés de configuration (2S) présentant une chaîne hydroxylée plus longue, tel que le D-thréose (C4) qui permettrait d'accéder au D-tagatose.

☞ A plus long terme, les mTK_{gst} modifiées optimisées seront employées comme biocatalyseurs afin d'accéder aux composés L-érythro (3S, 4S), tels que le L-ribulose à partir du L-glycéraldéhyde ou le D-tagatose à partir du D-thréose. Ces composés pourront être utilisés soit en tant que tels soit en tant que synthons pour l'élaboration de molécules plus complexes ayant un intérêt biologique.

En conclusion, ces travaux ont permis de mettre en place toutes les étapes indispensables à l'évolution *in vitro* de la TK depuis les techniques de biologie moléculaire pour l'obtention des banques jusqu'au criblage à haut-débit des TK afin, ici, de modifier l'énantiosélectivité de la mTK_{gst}. Cette méthodologie est à présent pleinement opérationnelle pour l'amélioration et la modification de nouvelles propriétés de la transcétolase, envisagées dans le cadre d'un projet ANR « thermo TK » qui fait suite à celui-ci.

Partie Expérimentale

1. Matériel

Microbiologie

Les cultures cellulaires de volumes supérieurs à 100 mL sont incubées dans un agitateur orbitalaire thermostaté *Infors AG AJ118*, lysées par un sonicateur *Sonopuls* de Bandelin, et centrifugées par un appareil *Aventi® J-26 XP Centrifuge* de Beckman Coulter. Les enzymes sont lyophilisées par un lyophilisateur de la marque Triad.

Les cultures cellulaires réalisées en plaques 96-puits sont incubées dans un agitateur de microplaques de la marque Heidolph, modèle Titramax 1000, muni d'un incubateur, modèle Inkubator 1000 de la même marque et centrifugées par un appareil Labofuge 400R de la marque Heraeus.

Les antibiotiques (ampicilline et kanamycine) et l'IPTG sont commercialisés par la société Sigma-Aldrich. La solution Bugbuster x10, le lysozyme et l'endonucléase benzonase sont acquis auprès de la société Merck. Les TK sont purifiées sur la résine Ni-NTA commercialisée par la société Qiagen. Enfin, la solution de Bradford a été achetée à la société Bio-rad.

Réactifs et enzymes

Les substrats (L-érythrose, D-ribose-5-phosphate, le glycolaldéhyde, le D-glycéraldéhyde, le D,L-glycéraldéhyde et les aldéhydes hydrophobes), ainsi que les cofacteurs (le ThDP et le $MgCl_2$), les tampons (TEA, Gly-gly, Tris, Phosphate et HEPES) et le NADH (sous forme de sel disodique) sont commercialisés par la société Sigma-Aldrich®. Le L-glycéraldéhyde est commercialisé par la société Molekula. Le Li-HPA a été synthétisé au laboratoire selon une méthode adaptée à celle décrite dans la littérature.[48]

Les enzymes, exceptées les transcétolases, sont commercialisées par la société Sigma-Aldrich®. L'alcool déshydrogénase de levure de boulanger (ADH, EC 1.1.1.1, 547 U.mg⁻¹) est vendue sous forme lyophilisée. La L-lactate déshydrogénase de muscle de lapin (LDH,

EC 1.1.1.27, 1000 U.mg⁻¹) est vendue sous forme de suspension dans le sulfate d'ammonium.

Les mesures d'absorbance UV-visible en macrocuve (1 mL, en polystyrène) sont effectuées sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer, modèle Lambda 25. La température des cuves est contrôlée au moyen d'un thermostat à effet Peltier. Les mesures d'absorbance UV-vis réalisées en microplaques 96-puits sont réalisées sur un spectrophotomètre de la marque TECAN, modèle SAFIRE II-Basic (« lecteur de plaques »). Ce spectrophotomètre est couplé à un automate pipetteur de la même marque, muni d'une tête à quatre aiguilles, qui sera utilisé pour le criblage des TK mutées.

Synthèses

Le pH-stat utilisé lors des réactions de synthèse en présence de la transcétolase est le modèle Titroline alpha de la marque Schott. L'avancement des réactions est suivi par analyse chromatographique sur couche mince (CCM) en utilisant des plaques d'aluminium recouverte de silice (Merck® DC Gel de silice 60F254). Les produits sont généralement purifiés par colonne chromatographique en utilisant un gel de silice (Merck® Gel de silice 40-63 µm). Les purifications en présence de résine acide et basiques sont réalisées avec la résine acide DOWEX HCR-W2, H form (DOWEX 50W) 1,8 éq/mL 16-40 Mesh et la résine basique DOWEX Marathon 11 commercialisées par la marque Sigma-Aldrich.

Analyses

Les pouvoirs rotatoires sont déterminés avec un polarimètre Jasco DIP 370 à 25°C pour la raie D du sodium ($\lambda = 589$ nm). La concentration *c* (en %) est exprimée en gramme pour 100 mL. Les spectres de RMN sont enregistrés sur l'appareil Bruker AC 400 (400 MHz en ¹H et ¹³C). Les spectres de masse ont été réalisés sur un appareil de type Micromass Q-TOF micro-équipé d'une source d'ionisation electrospray (ESI) positive.

2. Méthodes

2.1. Production et purification des TK

2.1.1. Généralités

Milieu de culture Luria-Bertani (LB) :

Tryptone	10 g
Extrait de levure	10 g
NaCl	5 g
H ₂ O osmosée	qsp 1 L

Le milieu est stérilisé en autoclave avant utilisation.

Tampon de Lavage-Equilibration-Lyse (LEL)

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM

Le pH ajusté à 8.0 à l'aide d'une solution de NaOH 1 N.

2.1.2. Production des TK

2.1.2.1. Production de TK_{eco}

La souche d'*E. coli* BL21DE3 exprimant le gène de la TK_{eco} cloné dans le plasmide d'expression pET21 nous a été donnée par le Pr. W.-D. Fessner (Université de Darmstadt, Allemagne). Ce vecteur d'expression apporte à la souche la résistance à un antibiotique (ampicilline), un promoteur inductible T7 permettant la surexpression de l'enzyme et permet l'expression de celle-ci avec une étiquette 6-His permettant sa purification par IMAC.

La souche est cultivée à 37°C dans 1 L de milieu LB en présence d'ampicilline (100 µg/mL) à partir de 100 mL de préculture, jusqu'à ce que l'absorbance du milieu à 600 nm atteigne environ 0,5. Une solution d'IPTG (0,5 mM) est alors ajoutée au milieu et le mélange est agité pendant une nuit à 30°C. Les cultures sont ensuite centrifugées (8000 rpm, 15 min, 4 °C), le surnageant est éliminé et les cellules sont lavées deux fois avec du tampon LEL. Le culot de

cellule obtenu est congelé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le rendement de la culture est d'environ 5 g de cellules (poids humide) par litre de culture.

2.1.2.2. Production des TK_{gth} , TK_{gst} , mTK_{gst}

Les souches ont été construites au Genoscope (CEA, Evry, France). Le vecteur pGEN717 a été utilisé pour les TK sauvages (TK_{gth} et TK_{gst}), tandis que le vecteur pGEN768 a été utilisé pour le gène synthétique mTK_{gst} . Ce vecteur d'expression apporte à la souche la résistance à un antibiotique (kanamycine), un promoteur T7 permettant la surexpression de l'enzyme et permet l'expression de celle-ci avec une étiquette 6-His permettant sa purification par IMAC. Les plasmides ont été transformés dans la souche d'expression *E.coli* BL21DE3 Gold rendue compétente par électroporation.

Les souches sont cultivées séparément à 37°C dans 1 L de milieu LB en présence de kanamycine ($30\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) à partir de 100 mL de préculture, jusqu'à ce que l'absorbance du milieu à 600 nm atteigne environ 0,7-0,8. Une solution d'IPTG ($0,5\text{ mM}$) est alors ajoutée au milieu et le mélange est agité pendant une nuit à 30°C . Les cultures sont ensuite centrifugées (8000 rpm, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), le surnageant est éliminé et les cellules sont lavées deux fois avec du tampon LEL. Le culot de cellule obtenu est congelé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le rendement de la culture est d'environ 3,8 g de cellules (poids humide) par litre de culture.

2.1.2.3. mTK_{gst} mutées

Les 8 clones sélectionnés (4 clones de la banque SSM-L382D47 et 4 clones de la banque CM) sont cultivés séparément à 37°C dans 400 mL de milieu LB en présence de kanamycine ($30\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) à partir de 100 mL de préculture, jusqu'à ce que l'absorbance du milieu à 600 nm atteigne environ 0,7-0,8. Une solution d'IPTG ($0,5\text{ mM}$) est alors ajoutée au milieu et le mélange est agité pendant une nuit à 30°C . Les cultures sont ensuite centrifugées (8000 rpm, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), le surnageant est éliminé et les cellules sont lavées deux fois avec du tampon LEL. Le culot de cellules obtenu est congelé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le rendement de la culture est d'environ 1,1 à 1,5 g de cellules (poids humide) par 400 mL de culture

2.1.3. Purification des TK

Le culot congelé est mis en suspension dans 7 mL de tampon LEL (Lyse-Equilibration-Lavage) par gramme de cellules. Les cellules sont lysées par sonication pendant 20 minutes, avec des intervalles de 10 secondes de pulsations suivies de 15 secondes de repos, avec 50 % d'amplitude. La suspension est ensuite centrifugée pendant 20 minutes à 10 000 rpm, à 4°C. Le surnageant ainsi récupéré constitue l'extrait cellulaire brut noté aussi lysat.

2.1.3.1. Purification par IMAC

L'extrait cellulaire brut ou lysat contenant la TK recombinante d'intérêt exprimée avec une étiquette 6-His, est introduit dans une colonne contenant la résine NTA chargée en Nickel préalablement équilibrée à l'aide du tampon LEL. La résine et l'extrait cellulaire brut sont mélangés doucement de manière à obtenir une suspension, puis la première fraction est éluée. La résine est lavée avec du tampon LEL jusqu'à l'absence de protéine en sortie de colonne (vérification par le test de Bradford). La TK est ensuite décrochée de la résine avec un tampon d'éluion (tampon LEL + 500 mM d'imidazole), jusqu'à l'absence de protéine en sortie de colonne. Les fractions contenant la TK sont rassemblées. La TK purifiée est alors dans le tampon d'éluion contenant l'imidazole. Celui-ci est ensuite remplacé par le tampon souhaité par dialyse. Une solution de 20 mL de TK est introduite dans un « sac à dialyse » qui est mis sous agitation durant une nuit à 4°C dans environ 4 L du nouveau tampon (pH 7,5). A l'issue de cette première étape de dialyse, la nouvelle solution de TK contient encore 2,5 mM d'imidazole. Il est à noter que la TK est instable dans l'imidazole qui peut provoquer la précipitation de celle-ci. C'est pourquoi une deuxième étape de dialyse est réalisée durant environ 8 h, à 4°C.

A partir d'un litre de culture, environ 425 mg de TK_{eco}, 60 mg de TK_{sce}, 180 mg de mTK_{gth}, 160 mg de TK_{gst} et 160 mg de mTK_{gst} sont obtenus. Pour les mTK_{gst} mutées, les quantités de protéines purifiées obtenues à partir de 400 mL de culture sont les suivantes :

mTK _{gst}	CM1	CM2	CM3	CM4	SSM1	SSM2	SSM3	SSM4
[mg]	38	14,8	40,6	55,6	77,8	76	74,4	70

2.1.3.2. Purification par choc thermique

Cette méthode a été employée pour la purification de mTK_{gst}. Le culot cellulaire est dissous dans le tampon souhaité (ex : Gly-gly 50 mM, pH 7,5). L'extrait cellulaire brut est chauffé au bain marie pendant 45 minutes à 65°C. Après centrifugation à 10 000 rpm pendant 20 minutes, le surnageant est récupéré et contient l'enzyme purifiée. Environ 130 mg de mTK_{gst} purifiée sont obtenus à partir de 1 L de culture.

2.1.4. Stockage des TK

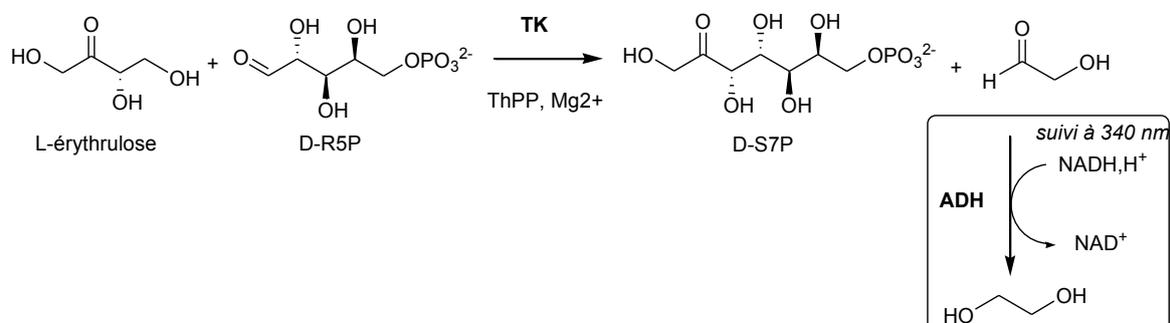
Les TK_{eco}, TK_{gth}, TK_{gst} et mTK_{gst} peuvent être conservées durant deux semaines en solution à 4°C, et pendant plusieurs semaines à – 4°C sans perte d'activité. La mTK_{gst} peut être lyophilisée et conservée à 4°C durant plusieurs mois sans perte d'activité.

2.1.5. Dosage des protéines par le test de Bradford

La concentration en protéines est déterminée par le test de Bradford.[143] Le bleu de Coomassie G250 contenu dans la solution de Bradford (Bio-rad) prend une teinte bleue quand il est interagit avec les protéines et l'absorbance est lue à 595 nm. Une droite de calibration est effectuée pour différentes concentrations de protéine (0,1 à 1 mg/mL) en prenant la BSA (l'albumine de sérum bovin) comme protéine de référence. Dans une cuve spectrophotométrique (1 mL), 1 mL de solution de Bradford est mis en présence de 20 µL de solution à doser. L'absorbance est mesurée à 595 nm après 10 minutes d'incubation.

2.2. Dosages enzymatiques

2.2.1. Test d'activité de la transcétolase (« test_{NADH} »)



2.2.1.1. Test en macrocuvette

Dans une cuve spectrophotométrique ($V_{\text{cuve}} = 1 \text{ mL}$), sont introduits :

- 800 μL de tampon Gly-gly 0,1 M pH 7,5
- 20 μL de NADH (sel disodique, 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),
- 5 μL de ThDP (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),
- 10 μL de MgCl_2 (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),
- 100 μL de L-érythrose (120 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),
- 50 μL de D-ribose-5-phosphate (50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),
- 25 U d'ADH,
- 10 μL de TK (V_{TK})

L'enzyme est incubée à la température souhaitée pendant 5 minutes, en présence de tous les substrats hormis le D-ribose-5-phosphate. La réaction est initiée par l'ajout de D-ribose-5-phosphate. La diminution de l'absorbance (A) est mesurée à 340 nm pendant 10 minutes. La pente $\Delta A/\Delta t$ mesurée correspond à la quantité de NADH consommée lors de la réduction du glycolaldéhyde par l'ADH. L'activité de la TK est calculée en utilisant l'équation suivante issue de la loi de Beer-Lambert :

$$\text{Activité} = \frac{\Delta A/\Delta t}{\varepsilon_{\text{NADH}} \times \ell} \times \frac{V_{\text{cuve}}}{V_{\text{échantillon}}} \times 10^3$$

Avec l'activité exprimée en $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$), Δt en minutes, V_{cuve} et V_{TK} en mL, la largeur de la cuve $\ell = 1 \text{ cm}$ et le coefficient d'extinction molaire $\varepsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

L'activité spécifique de la TK est définie de la façon suivante :

$$\text{Activité spécifique} = \frac{\text{Activité}}{\text{Concentration en protéines}}$$

Avec l'activité spécifique exprimée en U.mg⁻¹ de protéines, l'activité en U.mL⁻¹ et la concentration de protéines totales en mg.mL⁻¹.

2.2.1.2. Test en microplaque 96 puits

Dans un puits de volume ($V_{\text{puits}} = 250 \mu\text{L}$), sont introduits :

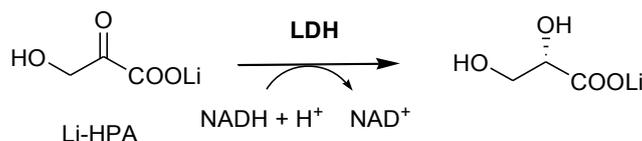
- 10 μL de TK
- 110 μL de tampon glycyl-glycine 0,1 M pH 7,5
- 10 μL de NADH (10 mg/mL)
- 10 μL de ThDP (27,6 mg/mL),
- 5 μL de MgCl_2 (91,4 mg/mL),
- 50 μL de L-erythrose (51 mg/mL)
- 5 μL d'ADH (5000 U/mL)
- 50 μL de D-Ribose-5-phosphate (12,2 mg/mL)

L'enzyme est incubée à la température souhaitée pendant 5 minutes, en présence de tous les substrats hormis le D-ribose-5-phosphate. La réaction est initiée par l'ajout de D-ribose-5-phosphate. La diminution de l'absorbance (A) est mesurée à 340 nm pendant 10 minutes. L'activité de la TK est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Activité} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{1}{\epsilon_{\text{NADH}} \times \ell} \times \frac{V_{\text{puits}}}{V_{\text{échantillon}}} \times 10^3$$

Avec l'activité exprimée en U.mL⁻¹ ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$), Δt en minutes, V_{cuve} et V_{TK} en mL, et le coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Dans ce cas l'absorbance est mesurée de haut en bas du puits. Pour un volume de 250 μL , la hauteur du puits vaut $\ell = 0,676 \text{ cm}$.

2.2.2. Dosage du Li-HPA



2.2.2.1. Test en macrocuve

Dans une cuve spectrophotométrique ($V_{\text{cuve}} = 1 \text{ mL}$), sont introduits :

- 960 μL de tampon TEA 0,1 M, pH 7,5
- 10 μL de NADH ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- 10 μL de LDH ($500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- 20 μL d'échantillon à doser

L'absorbance initiale est déterminée à 340 nm avant l'ajout de l'échantillon à doser. La solution de Li-HPA à doser diluée ou non diluée ($V_{\text{échantillon}}$) est ensuite introduite. Après stabilisation, l'absorbance finale est mesurée. La concentration en Li-HPA est donnée par l'équation suivante :

$$[\text{LiHPA}] = \frac{(A_{\text{finale}} - A_{\text{initiale}}) \times V_{\text{cuve}}}{V_{\text{échantillon}} \times \varepsilon_{\text{NADH}} \times \ell} \times 10^3$$

Avec $[\text{Li-HPA}]$ exprimée en mM, V_{cuve} et $V_{\text{échantillon}}$ en mL, le coefficient d'extinction molaire $\varepsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ et la largeur de cuve $\ell = 1 \text{ cm}$

Pour doser la pureté d'un lot de Li-HPA, une solution de 0,5 mg/mL en Li-HPA est préparée à l'aide d'une fiole jaugée et 20 μL de cette solution sont dosés selon le protocole ci-dessus et sa concentration en mM est déterminée. Une pureté de 100 % de la solution correspond à une concentration théorique de 4,54 mM (pour une $\Delta A = 0,565$). La pureté de l'échantillon est calculée en faisant le rapport entre la concentration mesurée sur la concentration théorique.

2.2.2.2. Test en microplaque 96 puits

Dans un puits ($V_{\text{puits}} = 250 \mu\text{L}$) d'une microplaque 96-puits, sont introduits :

- 200 μL de tampon TEA 0,1 M, pH 7,5
- 10 μL de NADH ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- 20 μL de LDH ($500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- 20 μL d'échantillon à doser

L'absorbance initiale est effectuée à 340 nm avant l'ajout de l'échantillon à doser. La solution de Li-HPA à doser diluée ou non diluée ($V_{\text{échantillon}}$) est ensuite introduite. Après stabilisation, l'absorbance finale est mesurée. La concentration en Li-HPA est donnée par l'équation suivante :

$$[\text{HPA}] = \frac{(A_{\text{finale}} - A_{\text{initiale}}) \times V_{\text{puits}}}{V_{\text{échantillon}} \times \epsilon_{\text{NADH}} \times \ell} \times 10^3$$

Avec [HPA] en mM, les volumes V_{puits} et $V_{\text{échantillon}}$ en μL et le coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Dans ce cas l'absorbance est mesurée de haut en bas du puits. Pour un volume de 250 μL , la hauteur du puits vaut $\ell = 0,676 \text{ cm}$.

Pour doser la pureté d'un lot de Li-HPA, une solution de 0,5 mg/mL en Li-HPA est préparée à l'aide d'une fiole jaugée et 20 μL de cette solution sont dosés selon le protocole ci-dessus et sa concentration en mM est déterminée. Une pureté de 100 % de la solution correspondrait à une concentration théorique de 4,54 mM (pour une $\Delta A = 1,53$). La pureté est déterminée en faisant le rapport entre la concentration mesurée sur la concentration théorique.

2.3. Caractérisation de $m\text{TK}_{\text{gst}}$

2.3.1. Détermination du pH et de la température optimaux

Pour la détermination du pH optimal, le test_{NADH} en macrocuve décrit dans le paragraphe 2.2.1.1 est utilisé en remplaçant le tampon du test par le tampon MES (50 mM) pour les pH 5,0 à 6,5, le tampon HEPES (50 mM) pour les pH 6,5 à 7,5 et le tampon Gly-gly (50 mM) pour les pH 7,0 à 9,0.

Pour la détermination de la température optimale, ce même test est employé. Dans ce cas, la température dans la cuve est fixée par un thermostat à effet Peltier. L'extrait enzymatique est d'abord incubé à la température choisie durant 5 min en présence de tous les réactifs du test hormis le D-R5P et l'ADH. Puis la réaction de dosage est initiée par l'ajout d'une solution de D-R5P et d'ADH. Pour les températures supérieures à 50°C, un plus large excès de l'enzyme auxiliaire ADH (100 U.mL⁻¹) est utilisé pour pallier à son inactivation. Le tampon choisi ici est le tampon Gly-gly car le L-érythrose n'est pas stable à haute température en présence de tampon Tris ou HEPES.

2.3.2. Stabilité des TK au cours du temps en fonction de la température et des co-solvants.

La thermostabilité est étudiée sur une plage de 0 °C à 70 °C pour les TK_{eco}, TK_{sce}, TK_{gth} et TK_{gst} et sur une plage de 0 °C à 85 °C pour la mTK_{gst}. L'extrait purifié de TK (environ 4,5 mg.mL⁻¹) en solution dans le tampon Gly-gly (50 mM, pH 7,5) est incubé dans un microtube placé dans un bain de sable à la température choisie jusqu'à 150 h ou jusqu'à l'inactivation totale de l'enzyme. Des échantillons de 10 µL sont prélevés au cours du temps et dosés par le test_{NADH} en macrocuve décrit dans le paragraphe 2.2.1.1, à 20 °C.

La stabilité de la mTK_{gst} est étudiée en présence de différents solvants organiques (DMSO, DMF, tBuOH et ACN) et de liquides ioniques hydrophiles ([BMIM]Cl, [BMIM]OAc, [BMIM]BF₄ et [C10MIM]Cl). L'extrait purifié de mTK_{gst} est incubé le co-solvant choisi, en mélange dans différentes concentrations (de 0 à 50% v/v) dans une solution aqueuse de tampon Gly-gly (50 mM, pH 7,5), à température ambiante ou dans un bain de sable à 50°C. Des échantillons de 10 µL sont prélevés au cours du temps et dosés par le test_{NADH} en macrocuve décrit page 217, à 20 °C.

La solubilité du Li-HPA dans les co-solvants en fonction de leur concentration dans le tampon a été appréciée de manière visuelle.

2.3.3. Stabilité du Li-HPA en fonction de la température et du tampon

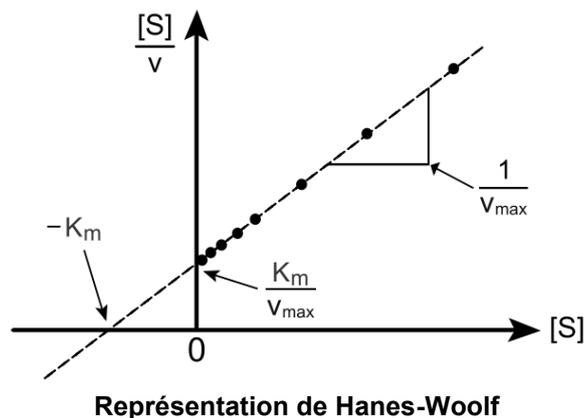
La stabilité du Li-HPA (50mM) dans l'eau et dans différents tampons (Tris, Gly-gly, HEPES et KH₂PO₄, 50 mM, pH 7,5) est étudiée à différentes températures (20°C, 50°C et 65°C) durant une heure. Les solutions de Li-HPA dans les différents tampons sont incubées dans un bain de sable à la température choisie. Des prélèvements de 20 µL sont effectués au

cours du temps, puis dilués dans 180 μL d'eau (dilution par 10) et la solution diluée de Li-HPA est dosée par le test enzymatique en microplaque 96-puits décrit page 219.

2.3.4. Détermination des constantes cinétiques

2.3.4.1. Généralités

Les constantes cinétiques K_M et V_{\max} de la TK vis-à-vis d'un substrat donné sont déterminées en faisant varier la concentration $[S]$ de ce substrat et en mesurant la vitesse de réaction V correspondante, le second substrat étant à une concentration fixe. La méthode de Hanes-Woolf a ensuite été utilisée pour le calcul des constantes cinétiques. Elle consiste à tracer la courbe $[S]/V$ et fonction de $[S]$. Si la cinétique est du type Michaelis-Menten, cette courbe est alors une droite d'équation $y = ax + b$:



Les constantes sont alors calculées ainsi :

$$K_M = -b/a \quad \text{et} \quad V_{\max} = 1/a$$

2.3.4.2. Constantes cinétiques du L-érythrose et du D-ribose-5-phosphate

Les valeurs de K_M (en mM) et de V_{\max} (en $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) de mTK_{gst} pour le L-érythrose et le D-R5P sont déterminées au moyen du test $_{\text{NADH}}$ en macrocuve décrit dans le paragraphe 2.2.1.1, à 25 °C ou à 50 °C. Les constantes cinétiques de mTK_{gst} et de TK_{eco} vis-à-vis du donneur L-érythrose sont obtenues en fixant la concentration de l'accepteur D-R5P à 50 mM. Les constantes cinétiques du D-R5P sont déterminées en fixant la concentration du L-érythrose

à 90 mM. Toutes les mesures sont réalisées en triplicata. Les K_M et V_{max} sont déterminés selon la méthode décrite dans le paragraphe 2.3.4.1.

2.3.4.3. Constantes cinétiques du Li-HPA

Les paramètres cinétiques de la mTK_{gst} vis-à-vis du Li-HPA sont déterminés à 25 °C, en présence de l'accepteur glycolaldéhyde (concentration fixée à 50 mM) et par dosage indirect du Li-HPA au cours du temps.

Dans un microtube de 1,5 mL, sont introduits :

Composant	Volume Introduit [μ L]	Concentration finale
TK purifiée <i>via</i> IMAC	300	-
ThDP	10	2,4 mM
MgCl ₂	10	9 mM
Glycolaldéhyde	200	50 mM
Tampon Gly-gly 50 mM	280	2 mM
Li-HPA	200	1 – 25 mM
Volume Total	1000	-

Le ThDP, le MgCl₂, le glycolaldéhyde et le Li-HPA sont mis en solution dans le tampon Gly-gly 50 mM à pH 7,5 et introduits dans le microtube. Puis 300 μ L d'une solution de mTK_{gst} purifiée *via* IMAC (différentes quantités (μ g) en fonction de la concentration en Li-HPA (mM) : 0,37 μ g pour 0,5 mM, 15 μ g pour 1,5 mM, 2,0 mM, 3,5 mM et 5 mM et 37 μ g pour 25 mM de Li-HPA) sont ajoutés pour initier la réaction. Le mélange est agité à 25 °C. Des prélèvements de 20 μ L de milieu réactionnel sont effectués toutes les minutes durant 15 min, dilués dans l'eau glacée tel que la solution fille soit d'environ 4 mM de Li-HPA, puis 20 μ L de cette solution sont dosés par le test enzymatique du Li-HPA en microplaque 96-puits décrit dans le paragraphe 2.2.2.1.

La diminution de la concentration en Li-HPA en fonction du temps conduit à des pentes qui sont déterminées pour chaque concentration en aldéhyde et rapportées à la quantité de mTK_{gst} . Ce test étant indirect et long à mettre en œuvre, les mesures ne sont pas réalisées en triplicata. Enfin les K_M et V_{max} sont déterminés selon la méthode décrite dans le paragraphe 2.3.4.1.

2.3.4.4. Constantes cinétiques du glycolaldéhyde, du D-glycéraldéhyde et du L-glycéraldéhyde

Les constantes cinétiques de mTK_{gst} vis-à-vis des accepteurs glycolaldéhyde, D-glycéraldéhyde et L-glycéraldéhyde sont déterminées en présence du donneur Li-HPA dont la concentration est fixée à 50 mM et au moyen du test d'activité pH-métrique en microplaque 96-puits décrit dans le paragraphe 2.5.3, à 28 °C. Les quantités de mTK_{gst} sont ajustées de manière à ce que les pentes mesurées soient bien dans l'intervalle de quantification (0,09 à 0,45 UA.min⁻¹): elles sont de 14 µg par puits dans le cas du glycolaldéhyde et du D-glycéraldéhyde et de 55 µg/puits dans le cas du L-glycéraldéhyde. Les mesures sont réalisées en triplicata. Les K_M et V_{max} sont déterminés selon la méthode décrite dans le paragraphe 2.3.4.1.

2.3.5. Etude de la spécificité de substrat de mTK_{gst}

La spécificité de substrat de mTK_{gst} est étudiée vis-à-vis de différents aldéhydes accepteurs en présence de Li-HPA. Chaque réaction est réalisée dans un volume réactionnel final de 1 mL. Dans un microtube de 1,5 mL, sont introduits :

Composant	Volume Introduit [µL]	Concentration finale
TK purifiée <i>via</i> IMAC	300	-
ThDP	10	2,4 mM
MgCl ₂	10	9 mM
Aldéhyde	200	50 -200 mM
Tampon Gly-gly 50 mM	280	2 mM
Li-HPA	200	1 – 25 mM
Volume Total	1000	-

Le ThDP, le MgCl₂, et un aldéhyde donné (50 mM de glycolaldéhyde, le D-glycéraldéhyde ou le L-glycéraldéhyde, 100 mM de D,L-glycéraldéhyde ou de D-ribose, 200 mM de D-glucose, d'isobutanol, de pentanal ou d'isopentanal) sont mis en solution dans le tampon Gly-gly 50 mM à pH 7,5 et introduits dans le microtube. Le pentanal et l'isopentanal sont solubilisés en présence de DMSO (20% de concentration finale). Ensuite, 300 µL d'une solution de mTK_{gst} purifiée *via* IMAC (0,16 mg, pour le glycolaldéhyde, 0,32 mg pour le D-glycéraldéhyde et le D,L-glycéraldéhyde, 1,55 mg pour le L-glycéraldéhyde, le D-ribose, le D-glucose, l'isobutanol, le pentanal et l'isopentanal) et le mélange est agité pendant 5 minutes à la température choisie (20°C ou 50°C). Puis la réaction est initiée par l'ajout du Li-HPA. Des prélèvements

de 20 μL sont effectués dans le milieu réactionnel toutes les 5 minutes durant 15 min à 30 min, dilués dans 180 μL d'eau glacée pour stopper la réaction, puis 20 μL de la solution ainsi obtenue contenant le Li-HPA est dosée par le test enzymatique en microplaque 96-puits décrit dans le paragraphe 2.2.2.1. Une expérience de contrôle (blanc) est réalisée pour chaque aldéhyde dans laquelle tous les réactifs sont mis en présence hormis la TK.

La variation de la concentration en Li-HPA en fonction du temps conduit à des pentes qui sont déterminées pour chaque aldéhyde. Pour chaque aldéhyde, la pente est corrigée par celle obtenue dans l'expérience de contrôle « blanc ». Puis les pentes résultantes sont rapportées à la quantité de mTK_{gst} en mg pour la comparaison des activités relatives.

2.4. Synthèses chimiques et enzymatiques

2.4.1. Généralités

Les pouvoirs rotatoires sont déterminés à 25°C pour la raie D du sodium ($\lambda = 589 \text{ nm}$). La concentration c (en %) est exprimée en gramme pour 100 mL.

Pour les spectres de RMN, les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au solvant deutéré dans lequel le spectre a été réalisé. La numérotation des carbones et des protons des molécules ne correspond pas toujours à la nomenclature et est attribuée de façon arbitraire. Les abréviations utilisées pour décrire les signaux sont :

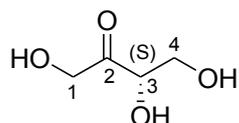
- s : singulet
- d : doublet
- dd : doublet dédoublé
- t : triplet
- q : quadruplet
- m : multiplet
- br : pic large (« broad »)

2.4.2. Méthodes

2.4.2.1. Synthèse de l'hydroxypyruvate de lithium (Li-HPA)

La synthèse est réalisée selon un protocole décrit dans la littérature.[48] De l'eau distillée (100 mL) est ajoutée à l'acide bromopyruvique (10 g, 0,06 mol). Le pH est maintenu à 9 par ajout d'une solution de LiOH 1 N au moyen d'un pH-stat. Quand la réaction est terminée (plus d'ajout de LiOH), le pH est ajusté à 5 par ajout d'acide acétique pur, puis le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite. Le solide résiduel est repris avec un minimum d'eau glacée et filtré sur verre fritté. Après une nuit dans un dessiccateur sous vide poussé, le Li-HPA (2,5 à 3,5 g environ) est obtenu sous la forme d'un solide blanc. La pureté du Li-HPA (généralement comprise entre 60 et 80%) est déterminée par le dosage enzymatique décrit dans le paragraphe 0.

2.4.2.2. Synthèse du L-érythrulose (1) catalysée par la mTK_{gst}



Formule brute : C₄H₈O₄

Masse moléculaire : 120,04

La synthèse a été réalisée selon le protocole décrit dans la littérature.[127] Dans un ballon, le ThDP (66 mg, 140 μmol) et le MgCl₂·6H₂O (117 mg, 580 μmol) sont dissous dans l'eau (29 mL) et le pH est ajusté à 7,5 avec une solution de NaOH (0,1 M). A cette solution, la mTK_{gst} est ajoutée (1 mL, 9mg) et le mélange est agité durant 20 min. à 50 °C (Solution A). Dans un erlenmeyer, le Li-HPA (330 mg, 3 mmol) et le glycolaldéhyde (180 mg, 3 mmol) sont dissous dans l'eau (30 mL) et le pH est ajusté à 7,5 avec une solution de NaOH (0,1 M) (Solution B). Après 20 min. de préincubation de l'enzyme en présence de ses cofacteurs, la solution B est ajoutée à la solution A et le mélange est agité à 50 °C. Le pH est maintenu à 7,5 par ajout d'une solution d'HCl (0,1 M) par pH-stat. L'avancement de la réaction est suivi par dosage du Li-HPA à 340 nm en présence de L-lactate déshydrogénase (3 U.mL⁻¹) et de NADH (0,4 mg.mL⁻¹).

La quasi-intégralité du Li-HPA (>90%) est consommée au bout de 20min. La réaction est arrêtée après 1 h. De la silice est ajoutée au mélange et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu solide est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (acétate d'éthyle/méthanol : 9/1). Le L-érythrose **1** (160 mg) est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 44 %.

CCM : R_f (acétate d'éthyle/méthanol : 9/1) = 0,38 (Révélateur : Vanilline).

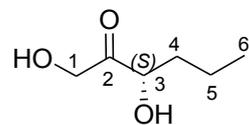
$[\alpha]_D^{25} = +6,3$ (c 1,48, H₂O) ; littérature : $[\alpha]_D^{25} = +6,3$ (c 1,1, H₂O)[69] et $[\alpha]_D^{25} = +6,7$ (c 1,48, H₂O)[127]

Les spectres de RMN sont identiques à ceux décrits dans la littérature.[69]

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) $\delta = 4,52$ (d, $J = 19,3$ Hz, 1H, 1-H_A), 4,45 (d, $J = 19,3$ Hz, 1H, 1-H_B), 4,26 (t, $J = 4,2$ Hz, 1H, 3-H), 3,80 (dd, $J = 11,6, 4,5$ Hz, 1H, 4-H), 3,76 (dd, $J = 11,6, 4,0$ Hz, 1H, 4-H)

RMN ¹³C (101 MHz, MeOD) $\delta = 212,98$ (C-2), 77,82 (C-3), 67,75 (C-1), 64,86 (C-4)

2.4.2.3. Synthèse de la 1,3-dihydroxybutan-2-one (**2**) catalysée par la mTK_{gst}



Formule brute : C₆H₁₂O₃

Masse moléculaire : 132,08

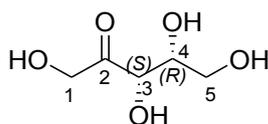
La synthèse a été réalisée selon le protocole décrit dans la littérature.[126] Le ThDP (28 mg, 2,4 mM) et le MgCl₂.6H₂O (48 mg, 9,4 mM) sont dissous dans l'eau (25 mL) et le pH est ajusté à 7,5 avec une solution de NaOH (0,1 M). Le butanal (90 mg, 50 mM) est ajouté à cette solution sous agitation et le pH est de nouveau ajusté à 7,5. La mTK_{gst} (15 mg) et le Li-HPA (138 mg, 50 mM) sont ajoutés et le mélange est agité à 40°C durant 24 h. Le pH est maintenu à 7,5 par ajout d'une solution d'HCl (0,1 M) par pH-stat. La réaction est suivie CCM et après 24 h le mélange est concentré sous vide. Le résidu est purifié sur gel de silice (hexane / acétate d'éthyle : 1/1) pour donner le composé **2** (72mg) sous forme de poudre blanche avec un rendement de 43 %.

Les spectres de RMN sont identiques à ceux décrits dans la littérature.[126]

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 4,48 (d, J = 20,1 Hz, 1H, 1- H_A), 4,42 (d, J = 20,1 Hz, 1H, 1- H_B), 4,32 (dd, J = 8,0, 3,9 Hz, 1H, 3-H), 2,73 (br, 2H, OH), 1,75 (m, 1H, 4-H), 1,61 (m, 1H, 4-H) 1,47 (m, 2H, 5-H), 0,95 (t, J = 7,3 Hz, 3H, 6-H)

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ = 211,7 (C-2), 74,6 (C-3), 65,4 (C-1), 36,2 (C-4), 18,0 (C-5), 13,7 (C-6).

2.4.2.4. Synthèse du D-Xylulose (**3**) catalysée par la mTK_{gst}



Formule brute : $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$

Masse moléculaire : 150,05

La synthèse a été réalisée selon le protocole décrit dans la littérature.[127] Le ThDP (44 mg, 100 μmol) et le $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (78 mg, 380 μmol) sont dissous dans l'eau (19 mL) et le pH est ajusté à 7,5 avec une solution de NaOH (0,1 M). A cette solution, la mTK_{gst} est ajoutée (1 mL, 9mg) et le mélange est agité durant 20 min. à 50 °C (Solution A). Dans un autre récipient, le Li-HPA (220 mg, 2 mmol) et le D-glycéraldéhyde (188 mg, 2 mmol) sont dissous dans l'eau (20 mL) et le pH est ajusté à 7,5 avec une solution de NaOH (0,1 M) (Solution B). Après 20 min. de préincubation de l'enzyme en présence de ses cofacteurs, la solution B est ajoutée à la solution A et le mélange est agité à 50 °C. Le pH est maintenu à 7,5 par ajout d'une solution d'HCl (0,1 M) par pH-stat. La réaction est suivie par dosage du Li-HPA à 340 nm en présence de L-lactate déshydrogénase (3 U.mL⁻¹) et de NADH (0,4 mg.mL⁻¹).

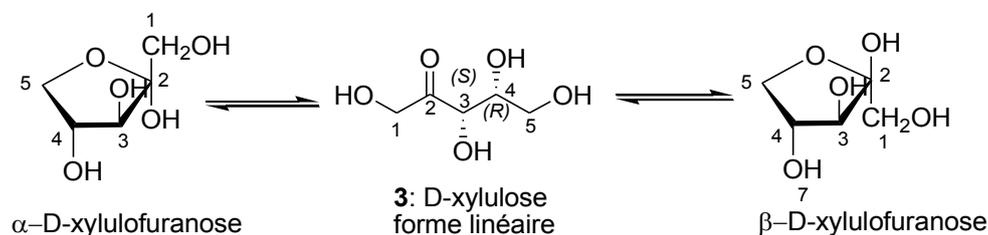
La quasi-intégralité du Li-HPA (>95 %) est consommée au bout d'1 h. La réaction est arrêtée après 3 h. L'enzyme est précipitée par ajout de trois volumes d'éthanol et éliminée par centrifugation. De la silice est ajoutée au surnageant et la suspension est concentrée sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol : 9/1). Les fractions contenant le produit sont rassemblées, concentrées sous vide. Le produit obtenu est sous forme d'huile avec la présence des grains solides attribués des sels. Le résidu est donc dissous dans l'eau (20 mL) et purifié par chromatographie sur résine échangeuse de cations (Dowex-50W). Les fractions contenant le produit sont rassemblées et leur pH est ajusté à 7 par ajout de résine échange d'anion (Dowex marathon 11) sous agitation. La solution est filtrée puis concentrée sous vide pour donner le composé **3** (115 mg) sous forme d'huile incolore avec un rendement de 38 %.

CCM : R_f (Dichlorométhane / méthanol : 8/2) = 0,43 (Révélateur Vanilline).

$[\alpha]_D^{25} = -30,9$ (c 2,0, H₂O) ; littérature : $[\alpha]_D^{26} = -30,0$ (c 2,4, H₂O)[180]

Les spectres de RMN sont identiques à ceux décrits dans la littérature.[21, 153, 181]

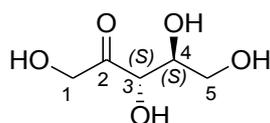
L'anomère β est prépondérant devant l'anomère α et la forme linéaire.



RMN ¹H (400 MHz, D₂O) forme linéaire : $\delta = 4,55$ (d, $J = 19,4$ Hz, 1H, 1-H_A), 4,43 (d, $J = 19,4$ Hz, 1H, 1-H_B), 3,98 (m, 1H, 4-H), 3,98 (m, 1H, 3-H), 3,58 (m, 2H, 5-H); anomère α : $\delta = 4,36$ (m, 1H, 4-H), 4,21 – 4,16 (m, 1H, 3-H), 4,14 (m, $J = 9,4$ Hz, 1H, 5-H_A), 3,79 (dd, $J = 9,5, 4,1$ Hz, 1H, 5-H_B), 3,59 (m, 2H, 1-H₂); anomère β : $\delta = 4,28$ (dd, $J = 11,8, 5,6$ Hz, 1H, 4-H), 4,09 (dd, $J = 9,5, 6,5$ Hz, 1H, 5-H_A), 3,95 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H, 3-H), 3,55 (m, 1H, 5-H_B), 3,49 (q, $J = 12,1$ Hz, 2H, 1-H₂)

RMN ¹³C (101 MHz, D₂O) forme linéaire $\delta = 215,70$ (C-2), 83,25 (C-3), 74,71 (C-4), 68,79 (C-1), 64,65 (C-5); anomère α : $\delta = 108,49$ (C-2), 78,60 (C-3), 78,06 (C-4), 74,71 (C-5), 65,18 (C-1); anomère β : $\delta = 105,70$ (C-2), 78,99 (C-3), 77,65 (C-4), 72,60 (C-5), 65,78 (C-1);

2.4.2.5. Synthèse du L-Ribulose (4) catalysée par la mTK_{gst}



Formule brute : C₅H₁₀O₅

Masse moléculaire : 150,05

Le ThDP (22 mg, 48 μ mol) et le MgCl₂.6H₂O (36,5 mg, 180 μ mol) sont dissous dans l'eau (10 mL) et le pH est ajusté à 7,5 avec une solution de NaOH (0,1 M). A cette solution, la mTK_{gst} est ajoutée (0,5 mL, 6 mg) et le mélange est agité durant 20 min. à 50 °C (Solution A). Dans un autre récipient, le Li-HPA (220 mg, 2 mmol) et le L-glycéraldéhyde (90,1 mg, 1 mmol) sont dissous dans l'eau (10 mL) et le pH est ajusté à 7,5 avec une solution de NaOH (0,1 M) (Solution B). Après 20 min. de préincubation de l'enzyme en présence de ses cofacteurs, la solution B est ajoutée à la solution A et le mélange est agité à 50 °C. Le pH est

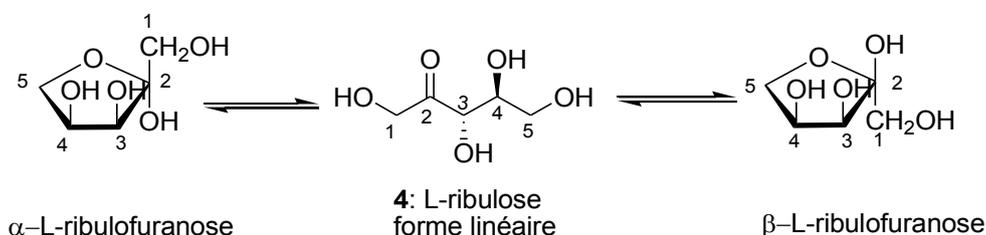
maintenu à 7,5 par ajout d'une solution d'HCl (0,1 M) par pH-stat. L'avancement de la réaction est suivi par dosage du Li-HPA à 340 nm en présence de L-lactate déshydrogénase (3 U.mL⁻¹) et de NADH (0,4 mg.mL⁻¹).

Après 24 h de réaction, de la silice est ajoutée au milieu et la suspension est concentrée sous pression réduite. Le résidu sec est purifié par chromatographie sur gel de silice (acétate d'éthyle / méthanol : 9/1). Les fractions contenant le produit ont été rassemblées et concentrées sous vide. Le produit obtenu est sous forme d'huile avec la présence des grains solides attribués à des sels. Le résidu est donc dissous dans l'eau (20 mL) et purifié par chromatographie sur résine échangeuse de cations (Dowex-50W). Les fractions contenant le produit sont rassemblées et leur pH est ajusté à 7 par ajout de résine échangeuse d'anions (Dowex marathon 11) sous agitation. La solution est filtrée puis concentrée sous vide pour donner le composé **4** (67,5 mg) sous forme d'huile jaune avec un rendement de 45 %.

CCM : R_f (Dichlorométhane / méthanol : 8/2) = 0,43 (Révélateur : vanilline).

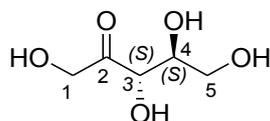
$[\alpha]_D^{25} = + 3,4$ (c 2,0, H₂O) ; littérature : $[\alpha]_D^{26} = +16,5$ (c , H₂O)[2]

Le spectre de RMN ¹³C montre un produit majoritaire correspondant au spectre du ribulose **4** décrit dans la littérature.[153] L'anomère α est prépondérant devant l'anomère β et la forme linéaire. Des pics parasites indiquent la présence d'une impureté à l'état de traces.



RMN ¹³C (101 MHz, D₂O) Forme linéaire : $\delta = 213,90$ (C-2), 76,79 (C-3), 73,94, (C-4), 67,86 (C-1), 62,71 (C-5); anomère α : $\delta = 103,95$ (C-2), 72,95 (C-5), 71,87 (C-3), 71,58 (C-4), 64,21 (C-1); anomère β : $\delta = 107,02$ (C-2), 77,21, (C-3), 72,17 (C-5), 71,99 (C-4), 63,96 (C-1)

2.4.2.6. Synthèse du L-Ribulose (**4**) catalysée par la mTK_{gst}-L382D/D470S



Formule brute : C₅H₁₀O₅

Masse moléculaire : 150,05

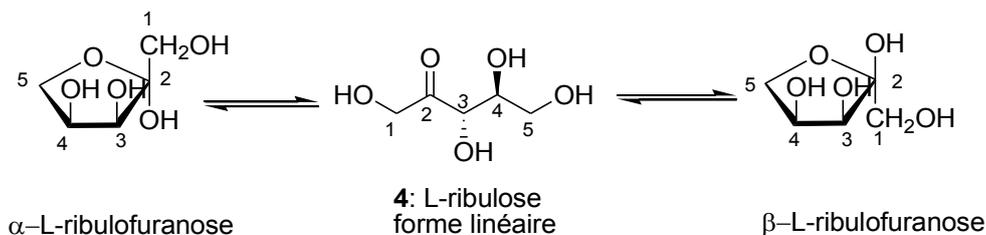
Le ThDP (22 mg, 48 μmol) et le MgCl₂.6H₂O (36,5 mg, 180 μmol) sont dissous dans l'eau (10 mL) et le pH est ajusté à 7,5 avec une solution de NaOH (0,1 M). A cette solution, la mTK_{gst} est ajoutée (0,5 mL, 6 mg) et le mélange est agité durant 20 min. à 50 °C (Solution A). Dans un autre récipient, le Li-HPA (220 mg, 2 mmol) et le L-glycéraldéhyde (90,1 mg, 1 mmol) sont dissous dans l'eau (10 mL) et le pH est ajusté à 7,5 avec une solution de NaOH (0,1 M) (Solution B). Après 20 min. de préincubation de l'enzyme en présence de ses cofacteurs, la solution B est ajoutée à la solution A et le mélange est agité à 50 °C. Le pH est maintenu à 7,5 par ajout d'une solution d'HCl (0,1 M) par pH-stat. L'avancement de la réaction est suivi par dosage du Li-HPA à 340 nm en présence de L-lactate déshydrogénase (3 U.mL⁻¹) et de NADH (0,4 mg.mL⁻¹). Le Li-HPA est consommé à 90 % après 6 heures de réaction puis le mélange est laissé sous agitation à 50°C durant une nuit.

A la fin de la réaction, 80 mL d'éthanol à 4 °C sont ajoutés au milieu puis l'enzyme précipitée est éliminée par centrifugation. Le surnageant est ensuite concentré sous pression réduite. Le résidu sec est purifié par chromatographie sur gel de silice (acétate d'éthyle / méthanol : 9/1). Les fractions contenant le produit ont été rassemblées et concentrées sous vide. Le produit **4** (135 mg) est obtenu sous forme d'huile jaune avec un rendement de 90 %.

CCM : R_f (Dichlorométhane / méthanol : 8/2) = 0,43 (Révélateur : vanilline).

[α]_D²⁵ = + 3,4 (c 2,0, H₂O) ; littérature : **[α]_D²⁶** = +16,5 (c , H₂O)[2]

Le spectre de RMN ¹³C montre un produit majoritaire correspondant au spectre du ribulose **4** décrit dans la littérature.[153] L'anomère α est prépondérant devant l'anomère β et la forme linéaire. Des pics parasites indiquent la présence d'une impureté à l'état de traces.



RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) Forme linéaire : $\delta = 213,90$ (C-2), 76,79 (C-3), 73,94, (C-4), 67,86 (C-1), 62,71 (C-5); anomère α : $\delta = 103,95$ (C-2), 72,95 (C-5), 71,87 (C-3), 71,58 (C-4), 64,21 (C-1); anomère β : $\delta = 107,02$ (C-2), 77,21, (C-3), 72,17 (C-5), 71,99 (C-4), 63,96 (C-1)

2.5. Mise au point du test pH-métrique

2.5.1. Généralités

2.5.1.1. Calcul des limites de détection et de quantification

A partir d'une courbe de calibration donnée, la régression linéaire est effectuée conduit à une équation de la forme $y = ax + b$. La limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) sont calculées par les formules :

$$LOD = 3,3 \times \frac{\sigma_b}{a} \quad \text{et} \quad LOQ = 3 \times LOD$$

avec σ_b : l'écart-type sur b

2.5.1.2. Calcul de l'activité

L'activité de la TK est calculée à partir de l'absorbance à 560 nm au cours du temps et de la courbe de calibration « standard » (en présence des ions bicarbonate) qui est de la forme $y = ax + b$. L'activité est obtenue par l'équation suivante : une unité (U) correspond à la formation d' 1 μmol d'ions HCO_3^- par minute dans un puits, dans les conditions du test.

$$\text{Activité} = \frac{\Delta A_{560}}{dt} \times \frac{1}{a} \times V_{\text{puits}} \times 10^{-3}$$

Avec l'activité en U ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$), l'absorbance A_{560} en UA, le temps t en min, la pente a en $\text{UA} \cdot \text{mM}^{-1}$, le volume du puits : $200 \cdot 10^{-6}$ L.

2.5.2. Conditions du test d'activité en présence de 28 μL de rouge de phénol

Dans un puits ($V_{\text{puits}} = 200 \mu\text{L}$) d'une microplaque 96-puits, sont introduits :

Composant	Volume Introduit [μL]	Solution mère [mg.mL^{-1}]	Concentration finale
TK purifiée	40	variable	-
ThDP	20	11,05	2,4 mM
Rouge de phénol	2	1,0	28 μM
MgCl_2	2	182,7	9 mM
Aldéhyde	40	variable	variable
Tampon TEA	76	-	2 mM
Li-HPA	20	55	50 mM
Volume Total	200	-	-

En pratique, une solution mère contenant tous les substrats sauf la TK et le Li-HPA est préparée et son pH est ajusté à 7,5. 140 μL de cette solution sont ajoutés à 40 μL de TK purifiée dans le puits. La réaction est ensuite initiée par l'ajout du Li-HPA (20 μL) et le tout est agité pendant 10 s. Puis l'absorbance à 560 nm est mesurée au cours du temps par le lecteur de microplaques à 28°C (température de fonctionnement de l'appareil).

2.5.2.1. Calibration du test d'activité en présence de 28 μL de rouge de phénol, en fonction de la concentration en NaHCO_3 (« Courbe de calibration standard »)

La courbe de calibration standard est obtenue en mesurant l'absorbance du milieu en fonction de la concentration en NaHCO_3 (0 à 0,8 mM). Dans une microplaque 96-puits, 40 μL de solution mère de 0 à 4 mM de NaHCO_3 dans le tampon TEA 2mM, pH 7,5 sont introduits. Puis 160 μL d'une solution contenant les réactifs du test sauf l'aldéhyde est ajoutée, telle que les concentrations finales soient de 50 mM de LiHPA, 2,4 mM de ThDP, 9 mM de MgCl_2 , 40 μL TK_{gst} (10 μg), 28 μM de rouge de phénol and 2 mM TEA (pH 7,5). L'absorbance à 560 nm en fonction de la concentration en HCO_3^- est mesurée par le lecteur de microplaques. L'expérience est réalisée en triplicata. La régression linéaire de la courbe obtenue donne une équation de la forme $y = ax + b$. Les LOD et LOQ sont calculées à partir des formules décrites dans le paragraphe 2.5.1.1.

2.5.2.2. Calibration du test d'activité en présence de 28 μL de rouge de phénol, en fonction de la quantité de TK

La $m\text{TK}_{\text{gst}}$ et le D,L-glycéraldéhyde sont utilisés comme références pour réaliser cette droite de calibration. 40 μL de solution mère de 0 à 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de $m\text{TK}_{\text{gst}}$ purifiée *via* IMAC dans le tampon TEA 2mM pH 7,5 sont introduites dans les puits d'une microplaque 96-puits. Les activités sont déterminées en présence de 50 mM de D,L-glycéraldéhyde selon le protocole décrit précédemment dans le paragraphe 2.5.2. L'expérience est réalisée en triplicata. La variation de l'absorbance est mesurée durant les cinq premières minutes de la réaction et les pentes (UA/min) sont déterminées. La régression linéaire est effectuée sur la courbe des pentes (UA/min) en fonction de la quantité de $m\text{TK}_{\text{gst}}$ pour obtenir une équation de type $y = ax + b$. Les LOD et LOQ sont calculées à partir des formules décrites dans le paragraphe 2.5.1.1.

2.5.3. Conditions du test d'activité en présence de 84 μL de rouge de phénol

Dans un puits ($V_{\text{puits}} = 200 \mu\text{L}$) d'une microplaque 96-puits, sont introduits :

Composant	Volume Introduit [μL]	Solution mère [$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$]	Concentration finale
TK purifiée	40	variable	-
ThDP	20	11,05	2,4 mM
Rouge de phénol	6	1,0	84 μM
MgCl_2	2	182,7	9 mM
Aldéhyde	40	variable	variable
Tampon TEA	72	-	2 mM
Li-HPA	20	55	50 mM
Volume Total	200	-	-

En pratique, une solution mère contenant tous les substrats sauf la TK et le Li-HPA est préparée et son pH est ajusté à 7,5. 140 μL de cette solution sont ajoutés à 40 μL de TK purifiée dans le puits. La réaction est ensuite initiée par l'ajout du Li-HPA (20 μL) et le tout est agité pendant 10 s. Puis l'absorbance à 560 nm est mesurée au cours du temps par le lecteur de microplaques à 28°C (température de fonctionnement de l'appareil).

2.5.3.1. Calibration du test d'activité en présence de 84 μL de rouge de phénol, en fonction de la concentration en NaHCO_3 (« Courbe de calibration standard »)

La courbe de calibration standard de ce test est déterminée selon protocole décrit dans le paragraphe 2.5.2.1 est appliqué avec 84 μL de rouge de phénol. La régression linéaire de la courbe obtenue donne une équation de la forme $y = ax + b$. Les LOD et LOQ sont calculées à partir des formules décrites dans le paragraphe 2.5.1.1.

2.5.3.2. Calibration du test d'activité en présence de 28 μL de rouge de phénol, en fonction de la quantité de TK

La mTK_{gst} et le D-glycéraldéhyde sont utilisés comme références pour réaliser cette droite de calibration. 40 μL de solution mère de 0 à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mTK_{gst} purifiée *via* IMAC dans le tampon TEA 2mM pH 7,5 sont introduites dans les puits d'une microplaque 96-puits. Les activités sont déterminées en présence de 50 mM de D,L-glycéraldéhyde selon le protocole décrit précédemment dans le paragraphe 2.5.3. L'expérience est réalisée en triplicata. La variation de l'absorbance est mesurée durant les cinq premières minutes de la réaction et les pentes (UA/min) sont déterminées. La régression linéaire est effectuée sur la courbe des pentes (UA/min) en fonction de la quantité de mTK_{gst} pour obtenir une équation de type $y = ax + b$. Les LOD et LOQ sont calculées à partir des formules décrites dans le paragraphe 2.5.1.1.

2.5.4. Optimisation du test de criblage

2.5.4.1. Généralités

Tous les tests sont réalisés dans des plaques 96-puits dans un volume final de 200 μL . L'absorbance est mesurée à 560 nm par le lecteur de plaques.

2.5.4.2. Mesure du rapport Signal/Bruit en fonction du temps

Dans chaque puits, 40 μL de lysat mTK_{gst} ou de lysat CH (c'est-à-dire la cellule hôte, *E. coli*, non transformée par le plasmide) sont introduits. Puis 140 μL d'une solution mère contenant 28 μM de rouge de phénol, 2,4 mM de ThDP, 9 mM de MgCl_2 et 20 mM de L-glycéraldéhyde

en solution dans le tampon TEA 2 mM, pH 7,5 est introduite. La réaction est initiée par l'ajout de 20 μL de Li-HPA (50 mM, concentration finale). La plaque est agitée pendant 10 s puis l'absorbance initiale est mesurée. Puis la plaque est laissée à incuber à température ambiante et les absorbances sont mesurées à différents temps (20 min, 1h, 2h, 4 h et 24 h).

2.5.4.3. Influence du volume de lysat utilisé

Dans chaque puits, 0 à 40 μL de lysat mTK_{gst} ou de lysat CH sont introduits. Le volume est complété à 40 μL par une solution de tampon TEA 2 mM à pH 7,5. Puis 140 μL d'une solution mère contenant 28 μM de rouge de phénol, 2,4 mM de ThDP, 9 mM de MgCl_2 et 20 mM de L-ou D-glycéraldéhyde, dans le de tampon TEA 2 mM, à pH 7,5 est introduite. La réaction est initiée par l'ajout de 20 μL de Li-HPA (50 mM, concentration finale). La plaque est agitée pendant 10 s puis l'absorbance initiale est mesurée. Puis la plaque est laissée à incuber à température ambiante et l'absorbance finale est mesurée après 2h.

2.5.4.4. Influence de la concentration en rouge de phénol

Un volume de 2 à 10 μL d'une solution de rouge de phénol à 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ est introduit dans chaque puits, puis complété avec une solution de tampon TEA 2 mM, pH 7,0 pour un volume final de 200 μL . L'absorbance à 560 nm est mesurée. Puis 20 μL d'une solution de NaOH (1 N) sont ajoutés. La plaque est agitée et l'absorbance finale est de nouveau mesurée. La dilution de l'échantillon (lors de l'ajout de NaOH) n'a pas d'incidence sur la mesure de l'absorbance car celle-ci est mesurée de haut en bas du puits.

2.5.4.5. Absorbance en fonction du pH

25 mL d'une solution contenant 84 μM de rouge de phénol dans du tampon TEA 2 mM est préparée. Cette solution est ensuite divisée en 8 échantillons d'environ 3 mL. Le pH de chacune de ces solutions est ajusté respectivement à 6,5, 7,0, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8, 8,0 et 8,5. Puis 200 μL de chacune de ces solutions sont introduits dans les puits d'une plaque 96-puits et l'absorbance à 560 nm est mesurée.

2.5.4.6. Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en rouge de phénol et du volume de lysat

Dans chaque puits, 10 ou 40 μL de lysat mTK_{gst} ou de lysat CH sont introduits. Le volume est complété à 40 μL par une solution de tampon TEA 2 mM à pH 7,5. Puis 140 μL d'une solution mère contenant 28 μM ou 84 μM de rouge de phénol, 2,4 mM de ThDP, 9 mM de MgCl_2 , en solution dans le tampon TEA, 2 mM, pH 7,5 est introduite. Ensuite, 40 μL de solution de 20 mM de L-ou D-glycéraldéhyde (20 mM, concentration finale) sont introduits. La réaction est initiée par l'ajout de 20 μL de Li-HPA (50 mM, concentration finale). La plaque est agitée pendant 10 s puis l'absorbance initiale est mesurée. Puis la plaque est laissée à incuber à température ambiante et l'absorbance finale est mesurée après 2h.

2.6. Criblage des mTK_{gst} mutées

2.6.1. Premier cycle de criblage

2.6.1.1. Culture et criblage des clones des banques SSM

Les banques SSM-L382, SSM-D470 et SSM-L382D470 ont été cultivées et lysées au laboratoire de Clermont-Ferrand. 2 μL de chaque clone des banques sont transférés dans des puits individuels de microplaques 96-puits à fond rond contenant 150 μL / puits de milieu de culture LB comprenant 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamycine. Les plaques sont scellées à l'aide d'un film en plastique pour éviter l'évaporation puis celui-ci est percé au niveau de chaque puits. Les plaques sont mises à incuber à 30°C et agitées à 900 rpm pendant une nuit dans l'incubateur à microplaque. En parallèle à cela, une préculture de 10 mL est réalisée à partir de la souche exprimant le gène de mTK_{gst} sauvage et est agitée à 30°C durant une nuit. Puis 5 μL de chacune de ces précultures sont transférés vers les puits de plaques deepwell 96-puits d'une contenance de 1,2 mL contenant 400 μL /puits de milieu de culture LB-kanamycine et 0,1 mM d'IPTG. Les puits G12 et H12 sont inoculés à partir de 5 μL de la préculture réalisée avec la souche exprimant la mTK_{gst} sauvage. Ces plaques sont scellées à l'aide de films perméables et incubées à 37°C, 900 rpm pendant une nuit. Les cellules sont ensuite récoltées par centrifugation des plaques à 3000 rpm durant 30 minutes. Le milieu de culture est retiré par aspiration sous vide et les culots cellulaires sont conservés à -80°C.

Les culots cellulaires sont décongelés et remis en suspension dans 150 µL de tampon de lyse (1/10 de solution de BugBuster® (Merck), 0,5 mg de lysozyme et 4 U/ml d'endonucléase benzonase (Merck) puis les plaques sont agitées à température ambiante durant 1 heure à 900 rpm. Les lysats cellulaires sont ensuite centrifugés à 3000 rpm durant 20 minutes. 40 µL de surnageant sont ensuite manuellement transférés dans une microplaque 96-puits à fond plat à l'aide d'une pipette 12-canaux. 140 µL d'une solution contenant les réactifs du test (2 mM TEA (pH7,5), 9 mM MgCl₂, 2,4 mM ThDP, 8,46 mM de rouge de phénol et 20 mM de L-glyceraldéhyde) sont ajoutés dans chaque puits à l'aide de l'automate de pipetage. L'absorbance initiale du mélange est mesurée à 560 nm par un lecteur de plaque. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 50 mM de Li-HPA (20µL) par le robot. Le volume total par puits est de 200 µL. Les plaques sont incubées à température ambiante durant 2 heures et l'absorbance finale est mesurée à 560 nm.

2.6.1.2. Culture et criblage des clones de la banque CM

La culture des clones de la banque CM et l'obtention des lysats sont réalisés au Génoscope, Evry. Les cultures sont réalisées dans des plaques deepwell 96-puits contenant 1,6 mL/puits de milieu de culture LB-kanamycine, 0,1 mM d'IPTG et inoculées à partir de 50 µL de préculture. Les puits G12 et H12 sont inoculés par la souche contenant le gène de la mTK_{gst} sauvage. Ces plaques sont scellées à l'aide de films perméables et incubées à 30°C, 900 rpm pendant une nuit. Les cellules sont ensuite recueillies par centrifugation des plaques à 4000 rpm durant 20 minutes. Le milieu de culture est retiré par aspiration sous vide et les culots cellulaires sont conservés à -80°C. Les culots cellulaires sont décongelés et mis en suspension dans 300 µL de tampon de lyse (1/10 de solution de BugBuster (Novagen), 0,5 mg de lysozyme, 4 U/ml de Benzonase endonuclease (Novagen), glycérol 10%, 0,5 mM ThDP, 2 mM MgCl₂) puis les plaques sont agitées à température ambiante durant 1 heure à 900 rpm. Après centrifugation, 300 µL d'extrait enzymatique brut sont récupérés et 3 x 100 µL sont distribués dans 3 plaques 96 puits à l'aide d'un robot de pipetage Hydra96 de marque Robbins. Les extraits sont congelés à -80°C avant envoi.

Les lysats sont décongelés et 10 µL sont transférés dans une microplaque 96-puits à fond plat. 170 µL d'une solution de substrats (2 mM TEA (pH7,5), 9 mM MgCl₂, 2,4 mM ThDP, 8,46 mM de phenol red et 20 mM de L-glyceraldéhyde) sont ajoutés dans chaque puits à l'aide de l'automate de pipetage. L'absorbance initiale du mélange est mesurée à 560 nm par un lecteur de plaque. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 50 mM de Li-HPA (20µL)

par le robot. Le volume total par puits est de 200 μL . Les plaques sont incubées à température ambiante durant 2 heures et l'absorbance finale est mesurée à 560 nm.

2.6.1.3. Traitement des données

Les absorbances seront rapportées à celle de la référence interne à la plaque, c'est-à-dire les deux puits contenant les lysats issus des souches exprimant la mTK_{gst} sauvage. Ainsi l'absorbance relative (notée A_{rel}) indiquée par la suite est obtenue selon l'équation suivante :

$$A_{rel} = \frac{\Delta A_{560} (\text{mTK}_{gst} \text{ mutée})}{\Delta A_{560} (\text{mTK}_{gst} \text{ sauvage})}$$

2.6.2. Second cycle de criblage

2.6.2.1. Second cycle de criblage pour la banque SSM

Culture et criblage vis-à-vis du L-glycéraldéhyde

Les souches correspondant aux 4 mTK_{gst} mutées les plus actives de la banque SSM-L382, 4 mTK_{gst} mutées les plus actives de la banque SSM-D470 et aux 72 mTK_{gst} mutées les plus actives de la banque SSM-L382D470 sont mises en culture sur une même plaque 96-puits et le protocole décrit précédemment dans le paragraphe 2.6.1.1 est appliqué. Les puits de la colonne G sont inoculés avec la souche exprimant la mTK_{gst} sauvage. Les puits de la colonne H sont inoculés avec la cellule hôte BL21(DE3) d'*E.coli* non transformée. Dans cette dernière colonne H, le milieu de culture LB ne contient donc pas d'antibiotique.

Détermination des activités vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde

Les activités ont été déterminées par le test pH-métrique en présence de 84 μL de rouge de phénol décrit dans le paragraphe 2.5.3, à 28°C. Les concentrations finales en L-glycéraldéhyde et en D-glycéraldéhyde sont de 20 mM respectivement. 40 μL de lysats sont utilisés. Les pentes mesurées sont bien dans l'intervalle de quantification (0,09 – 0,045 UA/min).

2.6.2.2. Second cycle de criblage pour la banque CM

Culture et criblage vis-à-vis du L-glycéraldéhyde

Les souches exprimant les 80 mTK_{gst} mutées les plus actives de la banque CM sont repiquées sur une même plaque 96-puits et le protocole décrit précédemment dans le paragraphe 2.6.1.1 est appliqué. Les puits de la colonne G sont inoculés avec la souche exprimant la mTK_{gst} sauvage. Les puits de la colonne H sont inoculés avec la cellule hôte BL21(DE3) d'*E.coli* non transformée. Dans cette dernière colonne H, le milieu de culture LB ne contient donc pas d'antibiotique.

Détermination des activités vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde

Les activités ont été déterminées par le test pH-métrique en présence de 84 µL de rouge de phénol décrit dans le paragraphe 2.5.3, à 28°C. Les concentrations finales en L-glycéraldéhyde et en D-glycéraldéhyde sont de 20 mM respectivement. 10 µL de lysats sont utilisés. Seules les mTK_{gst} mutées pour lesquelles les pentes de l'absorbance en fonction du temps au-dessus de la limite inférieure de quantification (0,09 UA/min) sont considérées.

2.7. Caractérisation des mTK_{gst} mutées les plus performantes

2.7.1. Détermination des activités spécifiques vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde des 8 mTK_{gst} mutées

Les activités ont été déterminées par le test pH-métrique en présence de 84 µL de rouge de phénol décrit dans le paragraphe 2.5.3, à 28°C. Les concentrations finales en L-glycéraldéhyde et en D-glycéraldéhyde sont de 20 mM respectivement. Les quantités de mTK_{gst} sont ajustées de manière à ce que les pentes mesurées de l'absorbance en fonction du temps soient bien dans l'intervalle de quantification (0,09 – 0,045 UA/min). Les quantités de TK en µg dans chaque puits sont de :

TK (μg)	mTK _{gst} sauvage	CM1	CM2	CM3	CM4	SSM1	SSM2	SSM3	SSM4
avec le L-glycéraldéhyde	90	61	67	80	131	21	54	54	33
avec le D-glycéraldéhyde	4	61	24	80	65	21	54	54	33

2.7.2. Etude de la thermostabilité du mutant L382D/D470S

La mTK_{gst} sauvage et le variant mTK_{gst}-L382D/D470S en solution sont mis à incuber durant une heure à 65°C dans un bain marie. L'activité enzymatique est déterminée avant et après incubation par le test_{NADH} décrit dans le paragraphe 2.2.1.1, à 20°C.

2.7.3. Détermination des activités spécifiques du mutant L382D/D470S vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde en fonction de la température

L'activité de la mTK_{gst}-L382D/D470S est étudiée vis-à-vis du L-glycéraldéhyde et du D-glycéraldéhyde en présence de Li-HPA à 20°C et à 50°C. Dans un microtube de 1,5 mL, sont introduits :

Composant	Volume Introduit [μL]	Concentration finale
mTK _{gst} -L382D/D470S purifiée	300	-
ThDP	10	2,4 mM
MgCl ₂	10	9 mM
Glycéraldéhyde	200	50 mM
Tampon Gly-gly 50 mM	280	2 mM
Li-HPA	200	1 – 25 mM
Volume Total	1000	-

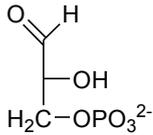
Le ThDP, le MgCl₂, et le D- ou L-glycéraldéhyde sont mis en solution dans le tampon Gly-gly 50 mM à pH 7,5 et introduits dans le microtube. Ensuite, 300 μL de mTK_{gst} purifiée par IMAC (soit 0,5 mg) sont introduits et le mélange est agité pendant 5 minutes à la température choisie (20°C ou 50°C). Puis la réaction est initiée par l'ajout du Li-HPA. Des prélèvements de 20 μL sont effectués dans le milieu réactionnel toutes les 5 minutes durant 15 min à 30 min, dilués dans 180 μL d'eau glacée pour arrêter la réaction, puis 20 μL de la solution ainsi obtenue contenant le Li-HPA est dosée par le test enzymatique en microplaque 96-puits décrit dans le paragraphe 2.2.2.1.

La variation de la concentration en Li-HPA en fonction du temps conduit à des pentes qui permettent de déterminer la consommation du Li-HPA en μmol par min et par mg de protéines soit des activités spécifiques en U/mg.

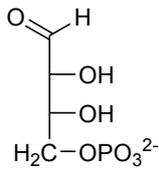
Annexes

Annexe 1 : Sucres phosphorylés

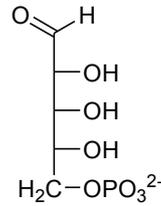
Aldoses phosphates



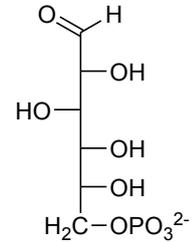
D-Glycéraldéhyde-3-phosphate
D-G3P



D-Erythrose-4-phosphate
D-E4P

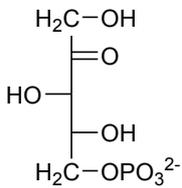


D-ribose-5-phosphate
D-R5P

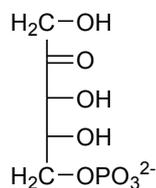


D-Glucose-6-phosphate
D-G6P

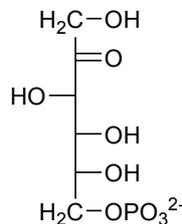
Cétooses phosphates



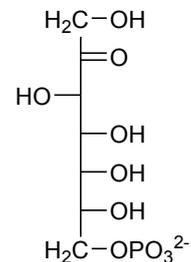
D-Xylulose-5-phosphate
D-X5P



D-ribulose-5-phosphate
D-R5P



D-Fructose-6-phosphate
D-F6P



D-sédheptulose-7-phosphate
D-S7P

Annexe 2 : Code génétique

		Deuxième nucléotide									
		U		C		A		G			
		Premier nucléotide	U	UUU	Phénylalanine (Phe, F)	UCU	Sérine (Ser, S)	UAU	Tyrosine (Tyr, Y)		
UUC				UCC		UAC			UGC	C	
UUA	Leucine (Leu, L)			UCA		UAA		Codons stop	UGA	Codon stop	A
UUG				UCG		UAG				UGG	Tryptophane (Trp, W)
C	CUU		Leucine (Leu, L)	CCU	Proline (Pro, P)	CAU	Histidine (Hist, H)	CGU	Arginine (Arg, R)	U	
	CUC			CCC		CAC		CGC		C	
	CUA			CCA		CAA	Glutamine (Gln, Q)	CGA		A	
	CUG			CCG		CAG		CGG		G	
A	AUU		Isoleucine (Ile, I)	ACU	Thréonine (Thr, T)	AAU	Asparagine (Asn, N)	AGU	Sérine(Ser, S)	U	
	AUC			ACC		AAC		AGC		C	
	AUA			ACA		AAA	Lysine (Lys, K)	AGA	Arginine (Arg, R)	A	
	AUG		Méthionine (Met, M)	ACG		AAG		AGG		G	
G	GUU		Valine (Val, V)	GCU	Alanine (Ala, A)	GAU	Acide aspartique (Asp, D)	GGU	Glycine (Gly, G)	U	
	GUC			GCC		GAC		GGC		C	
	GUA			GCA		GAA	Acide glutamique (Glu, E)	GGA		A	
	GUG			GCG		GAG		GGG		G	

Annexe 3 : Les vingt acides aminés

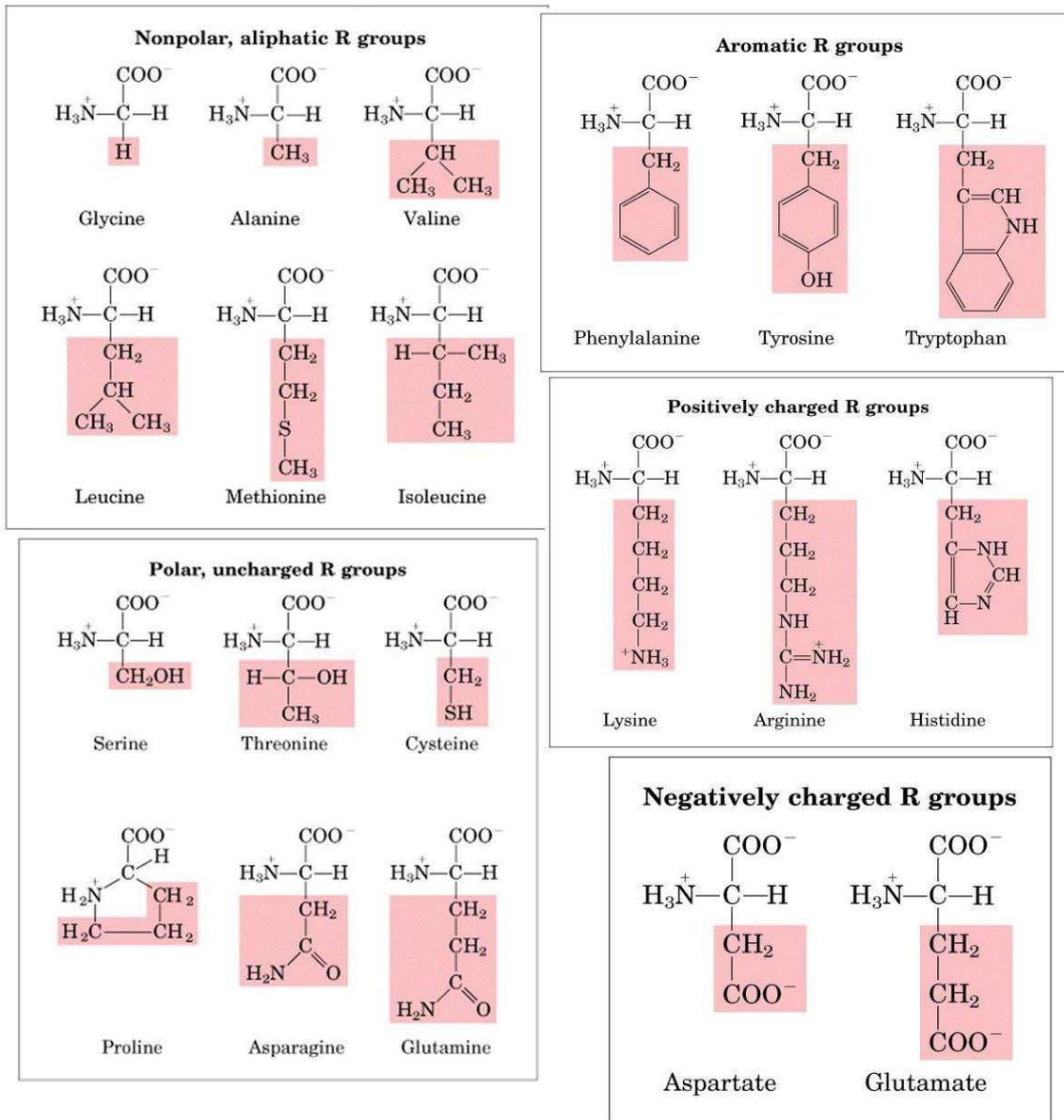


Figure extraite du livre « *Lehninger Principles of Biochemistry* » [182]

Annexe 4 : Séquençage des 80 mTK_{gst} les plus actives des banques SSM

A. Activité des lysats avec le L-glycéraldéhyde

B. Rapports Activités L-glycéraldéhyde / D-glycéraldéhyde

Banque SSM-L382

puits	L382	D470	A. mU	B.
A10	G	D	2,8	0,3
B10	S	D	5,8	0,3
C10	D	D	2,6	0,1
D10	A	D	4,4	0,1

Banque SSM-D470

puits	L382	D470	A. mU	B.
E10	L	T	4,3	0,3
F10	L	T	7,7	0,3
G10	L	S	4,2	0,5
H10	L	S	2,5	0,4

Banque SSM-L382D470

puits	L382	D470	A. mU	B.		puits	L382	D470	A. mU	B.
G8	A	D	6,4	0,4		E9	G	D	6,4	0,3
H4	A	T	6,5	0,8		F3	G	D	4,3	0,4
F1	D	G	9,0	1,3		A6	G	S	3,5	0,6
A1	D	I	6,7	0,8		B6	G	S	8,6	1,0
G4	D	I	7,1	0,9	SSM-3	C7	G	S	4,7	0,7
B9	D	N	6,2	1,0		E2	G	S	4,0	0,7
D3	D	Q	6,3	0,8		E8	G	S	6,8	0,7
B4	D	S	4,9	0,6		G3	G	S	11,7	1,5
C3	D	S	9,5	1,1		H6	G	S	10,6	0,9
D6	D	S	6,0	0,7		E6	G	T	7,7	1,0
E3	D	S	6,2	0,6	SSM-4	A8	G	V	3,6	0,6
G2	D	S	5,4	1,1		B2	I	S	1,7	0,3
G9	D	S	14,5	1,0		G5	I	S	4,9	0,6
H3	D	S	8,6	1,0		G1	L	S	4,5	0,5
H5	D	S	14,2	0,8		H9	L	G	3,1	0,3
H8	D	S	2,4	0,4		A2	M	S	2,9	0,3
A3	D	T	6,2	0,7		A7	M	S	3,9	0,3
B7	D	T	2,4	0,6	SSM-1	F9	M	S	5,0	0,5
C2	D	T	4,1	0,6		B5	N	N	3,5	0,4
C9	D	T	12,9	0,9		E7	N	N	7,8	0,5
C8	D	V	4,3	0,6		A4	N	S	3,6	0,5
D1	D	V	2,6	0,5		C5	N	S	8,5	0,6
D4	D	V	5,3	0,7		C6	N	S	6,3	0,6
H1	D	V	8,2	0,9		E1	N	S	9,8	0,8
D9	E	D	2,5	0,1		H2	N	S	5,5	0,7
F7	E	N	7,2	0,4		A9	N	T	5,2	0,6
A5	E	S	3,9	0,4		B3	N	T	3,1	0,6
B8	E	S	4,3	0,5		C1	N	T	2,1	0,6
E5	E	S	5,4	0,5		F5	N	T	5,2	0,9
G6	E	S	3,9	1,1		F6	N	T	6,3	0,7
C4	E	T	4,0	0,5		B1	N	V	8,0	0,5
D5	E	T	5,2	0,6		G7	N	V	3,7	0,6
F8	E	T	5,6	0,5		H7	Q	S	8,7	0,6
F4	S	R	3,3	0,6		D8	Y	V	5,0	0,6
D7	S	S	1,2	0,6						
F2	S	S	3,2	0,5						
E4	S	T	8,5	0,8						
D2	S	V	2,2	0,3						

Références Bibliographiques

1. Hailes, H.C.; Rother, D.; Müller, M.; Westphal, R.; Ward, J.M.; Pleiss, J.; Vogel, C.; Pohl, M., Engineering stereoselectivity of ThDP-dependent enzymes. *FEBS Journal* **2013**, n/a-n/a.
2. Meher, G.; Krishnamurthy, R., An expedient synthesis of L-ribulose and derivatives. *Carbohydrate Research* **2011**, *346* (6), 703-707.
3. Mathé, C.; Gosselin, G., L-Nucleoside enantiomers as antiviral drugs: A mini-review. *Antiviral Research* **2006**, *71* (2-3), 276-281.
4. Donner, T.W.; Magder, L.S.; Zarbalian, K., Dietary supplementation with D-tagatose in subjects with type 2 diabetes leads to weight loss and raises high-density lipoprotein cholesterol. *Nutr Res* **2010**, *30* (12), 801-6.
5. Zhang, Y.W.; Jeya, M.; Lee, J.K., L-Ribulose production by an Escherichia coli harboring L-arabinose isomerase from *Bacillus licheniformis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **2010**, *87* (6), 1993-9.
6. Jordan, F., Current mechanistic understanding of thiamin diphosphate-dependent enzymatic reactions. *Natural Product Reports* **2003**, *20* (2), 184-201.
7. Malandrinos, G.; Louloudi, M.; Hadjiladis, N., Thiamine models and perspectives on the mechanism of action of thiamine-dependent enzymes. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35* (8), 684-692.
8. Frank, R.A.W.; Leeper, F.J.; Luisi, B.F., Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2007**, *64* (7-8), 892-905.
9. Breslow, R., On the Mechanism of Thiamine Action. IV.1 Evidence from Studies on Model Systems. *Journal of the American Chemical Society* **1958**, *80* (14), 3719-3726.
10. Pohl, M.; Sprenger, G.A.; Müller, M., A new perspective on thiamine catalysis. *Current Opinion in Biotechnology* **2004**, *15* (4), 335-342.
11. Widmann, M.; Radloff, R.; Pleiss, J., The Thiamine diphosphate dependent Enzyme Engineering Database: A tool for the systematic analysis of sequence and structure relations. *BMC Biochemistry* **2010**, *11* (1), 9.
12. Müller, M.; Gocke, D.; Pohl, M., Thiamin diphosphate in biological chemistry: exploitation of diverse thiamin diphosphate-dependent enzymes for asymmetric chemoenzymatic synthesis. *FEBS Journal* **2009**, *276* (11), 2894-2904.
13. Sprenger, G.A.; Pohl, M., Synthetic potential of thiamin diphosphate-dependent enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **1999**, *6* (3), 145-159.
14. Horecker, B.L.; Smyrniotis, P.Z.; Hurwitz, J., The role of xylulose 5-phosphate in the transketolase reaction. *Journal of Biological Chemistry* **1956**, *223* (2), 1009-1019.
15. Zhao, Y.; Pan, X.; Zhao, J.; Wang, Y.; Peng, Y.; Zhong, C., Decreased transketolase activity contributes to impaired hippocampal neurogenesis induced by thiamine deficiency. *Journal of Neurochemistry* **2009**, *111* (2), 537-546.
16. McCool, B.A.; Plonk, S.G.; Martin, P.R.; Singleton, C.K., Cloning of human transketolase cDNAs and comparison of the nucleotide sequence of the coding region in Wernicke-Korsakoff and non-Wernicke-Korsakoff individuals. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268* (2), 1397-1404.
17. Thornalley, P.J.; Jahan, I.; Ng, R., Suppression of the Accumulation of Triosephosphates and Increased Formation of Methylglyoxal in Human Red Blood Cells during Hyperglycaemia by Thiamine In Vitro. *Journal of Biochemistry* **2001**, *129* (4), 543-549.
18. Cascante, M.; Centelles, J.J.; Veech, R.L.; Lee, W.-N.P.; Boros, L.G., Role of Thiamin (Vitamin B-1) and Transketolase in Tumor Cell Proliferation. *Nutrition and Cancer* **2000**, *36* (2), 150-154.

19. Van den Bergh, E.R.; Baker, S.C.; Raggars, R.J.; Terpstra, P.; Woudstra, E.C.; Dijkhuizen, L.; Meijer, W.G., Primary structure and phylogeny of the Calvin cycle enzymes transketolase and fructosebisphosphate aldolase of *Xanthobacter flavus*. *Journal of Bacteriology* **1996**, *178* (3), 888-93.
20. Schenk, G.; Layfield, R.; Candy, J.M.; Duggleby, R.G.; Nixon, P.F., Molecular Evolutionary Analysis of the Thiamine-Diphosphate-Dependent Enzyme, Transketolase. *Journal of Molecular Evolution* **1997**, *44* (5), 552-572.
21. Demuynck, C.; Bolte, J.; Hecquet, L.; Samaki, H., Enzymes as reagents in organic chemistry: transketolase-catalysed synthesis of d-[1,2-¹³C₂]xylulose. *Carbohydrate Research* **1990**, *206* (1), 79-85.
22. Kochetov, G.A., - [32] Transketolase from yeast, rat liver, and pig liver, *Methods in enzymology* A.W. Willis, Editor., *Academic Press* **1982**, p. 209-223.
23. French, C.; Ward, J., Improved production and stability of *E. coli* recombinants expressing transketolase for large scale biotransformation. *Biotechnology Letters* **1995**, *17* (3), 247-252.
24. Sprenger, G.A.; Schörken, U.; Sprenger, G.; Sahm, H., Transketolase a of *Escherichia coli* K12. *European Journal of Biochemistry* **1995**, *230* (2), 525-532.
25. Sundström, M.; Lindqvist, Y.; Schneider, G.; Hellman, U.; Ronne, H., Yeast TKL1 gene encodes a transketolase that is required for efficient glycolysis and biosynthesis of aromatic amino acids. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268* (32), 24346-24352.
26. Schaaff-Gerstenschläger, I.; Mannhaupt, G.; Vetter, I.; Zimmermann, F.K.; Feldmann, H., TKL2, a second transketolase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* **1993**, *217* (1), 487-492.
27. Wikner, C.; Meshalkina, L.; Nilsson, U.; Nikkola, M.; Lindqvist, Y.; Sundström, M.; Schneider, G., Analysis of an invariant cofactor-protein interaction in thiamin diphosphate-dependent enzymes by site-directed mutagenesis. Glutamic acid 418 in transketolase is essential for catalysis. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269* (51), 32144-50.
28. Sprenger, G.A., Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* K-12 transketolase (tkk) gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1993**, *1216* (2), 307-310.
29. R. Hobbs, G.; K. Mitra, R.; P. Chauhan, R.; M. Woodley, J.; D. Lilly, M., Enzyme-catalysed carbon-carbon bond formation: Large-scale production of *Escherichia coli* transketolase. *Journal of Biotechnology* **1996**, *45* (2), 173-179.
30. Asztalos, P.; Parthier, C.; Golbik, R.; Kleinschmidt, M.; Hübner, G.; Weiss, M.S.; Friedemann, R.; Wille, G.; Tittmann, K., Strain and Near Attack Conformers in Enzymic Thiamin Catalysis: X-ray Crystallographic Snapshots of Bacterial Transketolase in Covalent Complex with Donor Ketoses Xylulose 5-phosphate and Fructose 6-phosphate, and in Noncovalent Complex with Acceptor Aldose Ribose 5-phosphate†. *Biochemistry* **2007**, *46* (43), 12037-12052.
31. Hibbert, E.G.; Senussi, T.; Costelloe, S.J.; Lei, W.; Smith, M.E.; Ward, J.M.; Hailes, H.C.; Dalby, P.A., Directed evolution of transketolase activity on non-phosphorylated substrates. *J Biotechnol* **2007**, *131* (4), 425-32.
32. Nikkola, M.; Lindqvist, Y.; Schneider, G., Refined Structure of Transketolase from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.0 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* **1994**, *238* (3), 387-404.
33. Fiedler, E.; Thorell, S.; Sandalova, T.; Golbik, R.; König, S.; Schneider, G., Snapshot of a key intermediate in enzymatic thiamin catalysis: Crystal structure of the α -carbanion of (α,β -dihydroxyethyl)-thiamin diphosphate in the active site of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99* (2), 591-595.

34. Gerhardt, S.; Echt, S.; Busch, M.; Freigang, J.; Auerbach, G.; Bader, G.; Martin, W.F.; Bacher, A.; Huber, R.; Fischer, M., Structure and Properties of an Engineered Transketolase from Maize. *Plant Physiology* **2003**, *132* (4), 1941-1949.
35. Veitch, N.J.; Maugeri, D.A.; Cazzulo, J.J.; Lindqvist, Y.; Barrett, M.P., Transketolase from *Leishmania mexicana* has a dual subcellular localization. *Biochem. J.* **2004**, *382* (2), 759-767.
36. Mitschke, L.; Parthier, C.; Schröder-Tittmann, K.; Coy, J.; Lüdtkke, S.; Tittmann, K., The Crystal Structure of Human Transketolase and New Insights into Its Mode of Action. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285* (41), 31559-31570.
37. Meshalkina, L.; Nilsson, U.; Wikner, C.; Kostikowa, T.; Schneider, G., Examination of the Thiamin Diphosphate Binding Site in Yeast Transketolase by Site-Directed Mutagenesis. *European Journal of Biochemistry* **1997**, *244* (2), 646-652.
38. Schneider, G.; Lindqvist, Y., Crystallography and mutagenesis of transketolase: mechanistic implications for enzymatic thiamin catalysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1998**, *1385* (2), 387-398.
39. Kochetov, G.A.; Sevostyanova, I.A., Binding of the Coenzyme and Formation of the Transketolase Active Center. *IUBMB Life* **2005**, *57* (7), 491-497.
40. Kremer, A.B.; Egan, R.M.; Sable, H.Z., The active site of transketolase. Two arginine residues are essential for activity. *Journal of Biological Chemistry* **1980**, *255* (6), 2405-2410.
41. Nilsson, U.; Meshalkina, L.; Lindqvist, Y.; Schneider, G., Examination of Substrate Binding in Thiamin Diphosphate- dependent Transketolase by Protein Crystallography and Site-directed Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272* (3), 1864-1869.
42. Nilsson, U.; Hecquet, L.; Gefflaut, T.; Guerard, C.; Schneider, G., Asp477 is a determinant of the enantioselectivity in yeast transketolase. *FEBS letters* **1998**, *424* (1), 49-52.
43. Wikner, C.; Nilsson, U.; Meshalkina, L.; Udekwu, C.; Lindqvist, Y.; Schneider, G., Identification of Catalytically Important Residues in Yeast Transketolase†. *Biochemistry* **1997**, *36* (50), 15643-15649.
44. Meyer, D.; Neumann, P.; Ficner, R.; Tittmann, K., Observation of a stable carbene at the active site of a thiamin enzyme. *Nat Chem Biol* **2013**, *9* (8), 488-490.
45. Lüdtkke, S.; Neumann, P.; Erixon, K.M.; Leeper, F.; Kluger, R.; Ficner, R.; Tittmann, K., Sub-ångström-resolution crystallography reveals physical distortions that enhance reactivity of a covalent enzymatic intermediate. *Nat Chem* **2013**, *5* (9), 762-767.
46. Srere, P.; Cooper, J.R.; Tabachnick, M.; Racker, E., The oxidative pentose phosphate cycle. I. Preparation of substrates and enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1958**, *74* (2), 295-305.
47. Dickens, F.; Williamson, D.H., The determination of hydroxypyruvate and glycolaldehyde. *Biochem. J.* **1958**, *68* (1), 84-88.
48. Morris, K.G.; Smith, M.E.B.; Turner, N.J.; Lilly, M.D.; Mitra, R.K.; Woodley, J.M., Transketolase from *Escherichia coli*: A practical procedure for using the biocatalyst for asymmetric carbon-carbon bond synthesis. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7* (8), 2185-2188.
49. Hecquet, L.; Bolte, J.; Demuyne, C., Enzymatic synthesis of "natural-labeled" 6-deoxy-L-sorbose precursor of an important food flavor. *Tetrahedron* **1996**, *52* (24), 8223-8232.
50. Esakova, O.A.; Meshalkina, L.E.; Kochetov, G.A.; Golbik, R., Halogenated pyruvate derivatives as substrates of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry (Moscow)* **2009**, *74* (11), 1234-1238.
51. Schenk, G.; Duggleby, R.G.; Nixon, P.F., Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **1998**, *30* (12), 1297-1318.

52. Besse, P.; Bolte, J.; Demuynck, C.; Hecquet, L.; Veschambre, H., - Recent Progress in the Formation of Asymmetric Carbons by the Bioconversion Methodology, *Recent Research Developments in Organic Chemistry* **1997**, p. 191-228.
53. Schörken, U.; Sprenger, G.A., Thiamin-dependent enzymes as catalysts in chemoenzymatic syntheses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1998**, *1385* (2), 229-243.
54. Kobori, Y.; Myles, D.C.; Whitesides, G.M., Substrate specificity and carbohydrate synthesis using transketolase. *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57* (22), 5899-5907.
55. Turner, N.J., Applications of transketolases in organic synthesis. *Current Opinion in Biotechnology* **2000**, *11* (6), 527-531.
56. Myles, D.C.; Andrusis Iii, P.J.; Whitesides, G.M., A transketolase-based synthesis of (+)-exo-brevicomin. *Tetrahedron Letters* **1991**, *32* (37), 4835-4838.
57. Hecquet, L.; Lemaire, M.; Bolte, J.; Demuynck, C., Chemo-enzymatic synthesis of precursors of fagomine and 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35* (47), 8791-8794.
58. Charmantray, F.; Dellis, P.; Hélaïne, V.; Samreth, S.; Hecquet, L., Chemoenzymatic Synthesis of 5-Thio-D-xylopyranose. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, *2006* (24), 5526-5532.
59. Charmantray, F.; Hélaïne, V.; Legeret, B.; Hecquet, L., Preparative scale enzymatic synthesis of d-sedoheptulose-7-phosphate from β -hydroxypyruvate and d-ribose-5-phosphate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2009**, *57* (1-4), 6-9.
60. Guérard, C.; Alphand, V.; Archelas, A.; Demuynck, C.; Hecquet, L.; Furstoss, R.; Bolte, J., Transketolase-Mediated Synthesis of 4-Deoxy-D-fructose 6-Phosphate by Epoxide Hydrolase-Catalysed Resolution of 1,1-Diethoxy-3,4-epoxybutane. *European Journal of Organic Chemistry* **1999**, *1999* (12), 3399-3402.
61. Zimmermann, F.T.; Schneider, A.; Schörken, U.; Sprenger, G.A.; Fessner, W.-D., Efficient multi-enzymatic synthesis of D-xylulose 5-phosphate. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10* (9), 1643-1646.
62. Solovjeva, O.N.; Kochetov, G.A., Enzymatic synthesis of D-xylulose 5-phosphate from hydroxypyruvate and d-glyceraldehyde-3-phosphate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2008**, *54* (3-4), 90-92.
63. Shaeri, J.; Wright, I.; Rathbone, E.B.; Wohlgemuth, R.; Woodley, J.M., Characterization of enzymatic D-xylulose 5-phosphate synthesis. *Biotechnology and Bioengineering* **2008**, *101* (4), 761-767.
64. Breuer, M.; Hauer, B., Carbon-carbon coupling in biotransformation. *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, *14* (6), 570-576.
65. Kochetov, G.A.; Usmanov, R.A.; Mevkh, A.T., A new method of determination of transketolase activity by asymmetric synthesis reaction. *Analytical Biochemistry* **1978**, *88* (1), 296-301.
66. Reimer, L.M.; Conley, D.L.; Pompliano, D.L.; Frost, J.W., Construction of an enzyme-targeted organophosphonate using immobilized enzyme and whole-cell synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108* (25), 8010-8015.
67. Bhattacharya, S.; Schiavone, M.; Gomes, J.; Bhattacharya, S.K., Cascade of bioreactors in series for conversion of 3-phospho-d-glycerate into d-ribulose-1,5-bisphosphate: kinetic parameters of enzymes and operation variables. *Journal of Biotechnology* **2004**, *111* (2), 203-217.
68. O'Sullivan, B.; Al-Bahrani, H.; Lawrence, J.; Campos, M.; Cázares, A.; Baganz, F.; Wohlgemuth, R.; Hailes, H.C.; Szita, N., Modular microfluidic reactor and inline filtration system for the biocatalytic synthesis of chiral metabolites. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2012**, *77* (0), 1-8.
69. Benaissi, K.; Hélaïne, V.; Prévot, V.; Forano, C.; Hecquet, L., Efficient Immobilization of Yeast Transketolase on Layered Double Hydroxides and Application for Ketose Synthesis. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2011**, *353* (9), 1497-1509.

70. Touisni, N.; Charmantray, F.; Helaine, V.; Forano, C.; Hecquet, L.; Mousty, C., Optimized immobilization of Transketolase from *E. coli* in MgAl-Layered Double Hydroxides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, (0).
71. Chen, K.; Arnold, F.H., Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1993**, *90* (12), 5618-5622.
72. Stemmer, W.P.C., Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **1994**, *370* (6488), 389-391.
73. Leung, D.W.; Chen, E.; Goeddel, D.V., A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. **1989**, *1*, 11-15.
74. Wilson, D.S.; Keefe, A.D., - Random Mutagenesis by PCR, *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. **2001**, p.
75. Cirino, P.; Mayer, K.; Umeno, D., 1 - Generating Mutant Libraries Using Error-Prone PCR, *Directed Evolution Library Creation, Methods in Molecular Biology™*, F. Arnold and G. Georgiou, Editors., Humana Press **2003**, p. 3-9.
76. Cadwell, R.C.; Joyce, G.F., Randomization of genes by PCR mutagenesis. *Genome Research* **1992**, *2* (1), 28-33.
77. Otten, L.G.; Sio, C.F.; Vrieling, J.; Cool, R.H.; Quax, W.J., Altering the Substrate Specificity of Cephalosporin Acylase by Directed Evolution of the β -Subunit. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277* (44), 42121-42127.
78. Shivange, A.V.; Marienhagen, J.; Mundhada, H.; Schenk, A.; Schwaneberg, U., Advances in generating functional diversity for directed protein evolution. *Current Opinion in Chemical Biology* **2009**, *13* (1), 19-25.
79. Otten, L.G.; Quax, W.J., Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomolecular Engineering* **2005**, *22* (1-3), 1-9.
80. Bauer, J.C.W., Dowain A.; Braman, Jeffrey Carl; Geha, Raif S. (Stratagen), Circular site-directed mutagenesis. *United States Patent* **1998**, 5789166.
81. Kim, Y.-G.; Maas, S., 4 - Multiple Site-Directed Mutagenesis In Vitro, *In Vitro Mutagenesis Protocols, Methods in Molecular Biology*, **2001**, p. 29-36.
82. Cedrone, F.; Ménez, A.; Quéméneur, E., Tailoring new enzyme functions by rational redesign. *Current Opinion in Structural Biology* **2000**, *10* (4), 405-410.
83. Reetz, M.T.; Bocola, M.; Carballeira, J.D.; Zha, D.; Vogel, A., Expanding the Range of Substrate Acceptance of Enzymes: Combinatorial Active-Site Saturation Test. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (27), 4192-4196.
84. Short, J.M. (Diversa Corporation), Saturation mutagenesis in directed evolution *United States Patent* 6171820, **2001**.
85. Kretz, K.; Richardson, T.; Gray, K.; Robertson, D.; Tan, X.; Short, J., Gene site saturation mutagenesis: a comprehensive mutagenesis approach. *Methods in enzymology* **2004**, *388*, 3-11.
86. Borrego, B.; Wienecke, A.; Schwienhorst, A., Combinatorial libraries by cassette mutagenesis. *Nucleic Acids Research* **1995**, *23* (10), 1834-1835.
87. Wells, J.A.; Vasser, M.; Powers, D.B., Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites. *Gene* **1985**, *34* (2-3), 315-323.
88. Taylor, S.V.; Kast, P.; Hilvert, D., Investigating and Engineering Enzymes by Genetic Selection. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (18), 3310-3335.

89. Lee, S.-J.; Kang, H.-Y.; Lee, Y., High-throughput screening methods for selecting l-threonine aldolases with improved activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2003**, *26* (3–6), 265-272.
90. Reetz, M.T.; Zonta, A.; Schimossek, K.; Jaeger, K.-E.; Liebeton, K., Creation of Enantioselective Biocatalysts for Organic Chemistry by In Vitro Evolution. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1997**, *36* (24), 2830-2832.
91. Klein, G.; Reymond, J.-L., An enantioselective fluorimetric assay for alcohol dehydrogenases using albumin-catalyzed β -elimination of umbelliferone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8* (9), 1113-1116.
92. Badalassi, F.; Wahler, D.; Klein, G.; Crotti, P.; Reymond, J.-L., A Versatile Periodate-Coupled Fluorogenic Assay for Hydrolytic Enzymes. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39* (22), 4067-4070.
93. Bergmeyer, H.U., *Methods of Enzymatic Analysis* (Second Edition), ed. U.B. Hans: *Academic Press*. **1974**.
94. Passonneau, J.V.; Lowry, O.H., 7 - A Collection of Enzyme Assays, *Enzymatic Analysis: A Practical Guide*. *Humana Press* **1993**, p. 229-305.
95. Reetz, M.T.; Becker, M.H.; Klein, H.-W.; Stöckigt, D., A Method for High-Throughput Screening of Enantioselective Catalysts. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38* (12), 1758-1761.
96. Reetz, M.T.; Eipper, A.; Tielmann, P.; Mynott, R., A Practical NMR-Based High-Throughput Assay for Screening Enantioselective Catalysts and Biocatalysts. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2002**, *344* (9), 1008-1016.
97. Brakmann, S., Discovery of Superior Enzymes by Directed Molecular Evolution. *ChemBioChem* **2001**, *2* (12), 865-871.
98. Turner, N.J., Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends in Biotechnology* **2003**, *21* (11), 474-478.
99. Arnold, F.H., Design by Directed Evolution. *Accounts of Chemical Research* **1998**, *31* (3), 125-131.
100. Bornscheuer, U.T.; Pohl, M., Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology* **2001**, *5* (2), 137-143.
101. Lutz, S.; Patrick, W.M., Novel methods for directed evolution of enzymes: quality, not quantity. *Current Opinion in Biotechnology* **2004**, *15* (4), 291-297.
102. Tracewell, C.A.; Arnold, F.H., Directed enzyme evolution: climbing fitness peaks one amino acid at a time. *Current Opinion in Chemical Biology* **2009**, *13* (1), 3-9.
103. Kazlauskas, R.; Lutz, S., Engineering enzymes by 'intelligent' design. *Current Opinion in Chemical Biology* **2009**, *13* (1), 1-2.
104. Dalby, P.A., Strategy and success for the directed evolution of enzymes. *Current Opinion in Structural Biology* **2011**, *21* (4), 473-480.
105. Wang, M.; Si, T.; Zhao, H., Biocatalyst development by directed evolution. *Bioresource Technology* **2012**, *115* (0), 117-125.
106. Reetz, M.T., Controlling the enantioselectivity of enzymes by directed evolution: Practical and theoretical ramifications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101* (16), 5716-5722.
107. Hecquet, L.; Bolte, J.; Demuynck, C., New Assays for Transketolase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1993**, *57* (12), 2174-2176.
108. Naula, C.; Alibu, V.P.; Brock, J.M.; Veitch, N.J.; Burchmore, R.J.S.; Barrett, M.P., A new erythrose 4-phosphate dehydrogenase coupled assay for transketolase. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2008**, *70* (6), 1185-1187.

109. Lee, J.-Y.; Cheong, D.-E.; Kim, G.-J., A novel assay system for the measurement of transketolase activity using xylulokinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* **2008**, *30* (5), 899-904.
110. Sevestre, A.; Hélaine, V.; Guyot, G.; Martin, C.; Hecquet, L., A fluorogenic assay for transketolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Tetrahedron Letters* **2003**, *44* (4), 827-830.
111. Sevestre, A.; Charmantray, F.; Hélaine, V.; Lásiková, A.; Hecquet, L., Synthesis of stereochemical probes for new fluorogenic assays for yeast transketolase variants. *Tetrahedron* **2006**, *62* (17), 3969-3976.
112. Charmantray, F.; Hélaine, V.; Lásiková, A.; Legeret, B.; Hecquet, L., Chemoenzymatic synthesis of l-tyrosine derivative for a transketolase assay. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49* (20), 3229-3233.
113. Sanchez-Paniagua-Lopez, M.; Charmantray, F.; Helaine, V.; Hecquet, L.; Mousty, C., Electrochemical detection of transketolase activity using a tyrosinase biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, *26* (1), 139-143.
114. Smith, M.E.B.; Kaulmann, U.; Ward, J.M.; Hailes, H.C., A colorimetric assay for screening transketolase activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, *14* (20), 7062-7065.
115. Hecquet, L.; Bolte, J.; Demuyne, C., Chemoenzymatic synthesis of 6-deoxy-D-fructose and 6-deoxy-L-sorbose using transketolase. *Tetrahedron* **1994**, *50* (29), 8677-8684.
116. Hobbs, G.R.; Lilly, M.D.; Turner, N.J.; Ward, J.M.; Willets, A.J.; Woodley, J.M., Enzyme-catalysed carbon-carbon bond formation: use of transketolase from *Escherichia coli*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1993**, *0* (2), 165-166.
117. Mitra, R.K.; Woodley, J.M.; Lilly, M.D., *Escherichia coli* transketolase-catalyzed carbon-carbon bond formation: biotransformation characterization for reactor evaluation and selection. *Enzyme and Microbial Technology* **1998**, *22* (1), 64-70.
118. Miller, O.J.; Hibbert, E.G.; Ingram, C.U.; Lye, G.J.; Dalby, P.A., Optimisation and evaluation of a generic microplate-based HPLC screen for transketolase activity. *Biotechnol Lett* **2007**, *29* (11), 1759-70.
119. Ranoux, A.; Arends, I.W.C.E.; Hanefeld, U., Development of screening methods for transketolase activity and substrate scope. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53* (7), 790-793.
120. Simon, G., Synthèse chimioenzymatique d'analogues de monosaccharides utilisés comme sondes pour le développement d'un test de sélection de la transcétolase de *Saccharomyces cerevisiae* basé sur l'auxotrophie. *Thesis*. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand (France), **2009**.
121. Simon, G.; Bouzon, M.; Charmantray, F.; Hélaine, V.; Légeret, B.; Marlière, P.; Hecquet, L., Amino acid precursors for the detection of transketolase activity in *Escherichia coli* auxotrophs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19* (14), 3767-3770.
122. Simon, G.; Eljezi, T.; Legeret, B.; Charmantray, F.; Castillo, J.A.; Guérard-Hélaine, C.; Lemaire, M.; Bouzon, M.; Marlière, P.; Hélaine, V.; Hecquet, L., Synthesis of Specially Designed Probes to Broaden Transketolase Scope. *ChemCatChem* **2013**, *5* (3), 784-795.
123. Morley, K.L.; Kazlauskas, R.J., Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends in Biotechnology* **2005**, *23* (5), 231-237.
124. Dalby, P.A., Optimising enzyme function by directed evolution. *Current Opinion in Structural Biology* **2003**, *13* (4), 500-505.
125. Hibbert, E.G.; Senussi, T.; Smith, M.E.; Costelloe, S.J.; Ward, J.M.; Hailes, H.C.; Dalby, P.A., Directed evolution of transketolase substrate specificity towards an aliphatic aldehyde. *J Biotechnol* **2008**, *134* (3-4), 240-5.
126. Cazares, A.; Galman, J.L.; Crago, L.G.; Smith, M.E.; Strafford, J.; Rios-Solis, L.; Lye, G.J.; Dalby, P.A.; Hailes, H.C., Non-alpha-hydroxylated aldehydes with evolved transketolase enzymes. *Org Biomol Chem* **2010**, *8* (6), 1301-9.

127. Smith, M.E.B.; Hibbert, E.G.; Jones, A.B.; Dalby, P.A.; Hailes, H.C., Enhancing and Reversing the Stereoselectivity of Escherichia coli Transketolase via Single-Point Mutations. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2008**, *350* (16), 2631-2638.
128. Galman, J.L.; Steadman, D.; Bacon, S.; Morris, P.; Smith, M.E.; Ward, J.M.; Dalby, P.A.; Hailes, H.C., alpha,alpha'-Dihydroxyketone formation using aromatic and heteroaromatic aldehydes with evolved transketolase enzymes. *Chem Commun (Camb)* **2010**, *46* (40), 7608-10.
129. Payongsri, P.; Steadman, D.; Strafford, J.; MacMurray, A.; Hailes, H.C.; Dalby, P.A., Rational substrate and enzyme engineering of transketolase for aromatics. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2012**, *10* (45), 9021-9029.
130. Strafford, J.; Payongsri, P.; Hibbert, E.G.; Morris, P.; Batth, S.S.; Steadman, D.; Smith, M.E.B.; Ward, J.M.; Hailes, H.C.; Dalby, P.A., Directed evolution to re-adapt a co-evolved network within an enzyme. *Journal of Biotechnology* **2012**, *157* (1), 237-245.
131. Ranoux, A.; Hanefeld, U., Improving Transketolase. *Topics in Catalysis* **2013**, *56* (9-10), 750-764.
132. Ranoux, A.; Karmee, S.K.; Jin, J.; Bhaduri, A.; Caiazzo, A.; Arends, I.W.C.E.; Hanefeld, U., Enhancement of the Substrate Scope of Transketolase. *ChemBioChem* **2012**, *13* (13), 1921-1931.
133. Bloom, J.D.; Labthavikul, S.T.; Otey, C.R.; Arnold, F.H., Protein stability promotes evolvability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103* (15), 5869-5874.
134. Donk, P.J., A highly resistant thermophilic organism. *Journal of Bacteriology* **1920**, *5* (4), 373-374.
135. Nazina, T.N.; Tourova, T.P.; Poltarau, A.B.; Novikova, E.V.; Grigoryan, A.A.; Ivanova, A.E.; Lysenko, A.M.; Petrunyaka, V.V.; Osipov, G.A.; Belyaev, S.S.; Ivanov, M.V., Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **2001**, *51* (2), 433-46.
136. Manachini, P.L.; Mora, D.; Nicastro, G.; Parini, C.; Stackebrandt, E.; Pukall, R.; Fortina, M.G., *Bacillus thermodenitrificans* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **2000**, *50* (3), 1331-7.
137. Garg, G.; Dhiman, S.S.; Mahajan, R.; Kaur, A.; Sharma, J., Bleach-boosting effect of crude xylanase from *Bacillus stearothermophilus* SDX on wheat straw pulp. *New Biotechnology* **2011**, *28* (1), 58-64.
138. Cheng, L.; Mu, W.; Jiang, B., Thermostable L-arabinose isomerase from *Bacillus stearothermophilus* IAM 11001 for D-tagatose production: gene cloning, purification and characterisation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2010**, *90* (8), 1327-1333.
139. Yeom, S.J.; Kim, N.H.; Park, C.S.; Oh, D.K., L-ribose production from L-arabinose by using purified L-arabinose isomerase and mannose-6-phosphate isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology* **2009**, *75* (21), 6941-6943.
140. Ferdjani, S.; Ionita, M.; Roy, B.; Dion, M.; Djeghaba, Z.; Rabiller, C.; Tellier, C., Correlation between thermostability and stability of glycosidases in ionic liquid. *Biotechnology Letters* **2011**, *33* (6), 1215-1219.
141. Liu, X.; Dong, Y.; Zhang, J.; Zhang, A.; Wang, L.; Feng, L., Two novel metal-independent long-chain alkyl alcohol dehydrogenases from *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. *Microbiology* **2009**, *155* (Pt 6), 2078-85.
142. 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* **2007**, *104* (13), 5602-5607.

143. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, *72* (1–2), 248-254.
144. Jahromi, R.R.; Morris, P.; Martinez-Torres, R.J.; Dalby, P.A., Structural stability of *E. coli* transketolase to temperature and pH denaturation. *J Biotechnol* **2011**, *155* (2), 209-16.
145. Kuimov, A.; Filippov, M.; Kochetov, G., Multiple forms of transketolase. *Biochem Int* **1990**, *21* (6), 1081-7.
146. Datta, A.G.; Racker, E., Mechanism of Action of Transketolase: I. Properties of the crystalline yeast enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **1961**, *236* (3), 617-623.
147. Saitou, S.; Ozawa, T.; Tomita, I., The purification and some properties of Brewer's yeast apotransketolase. *FEBS letters* **1974**, *40* (1), 114-118.
148. Cowan, D.A., Thermophilic proteins: Stability and function in aqueous and organic solvents. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **1997**, *118* (3), 429-438.
149. Park, S.; Kazlauskas, R.J., Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology. *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, *14* (4), 432-437.
150. Bolte, J.; Demuynck, C.; Samaki, H., Utilization of enzymes in organic chemistry: Transketolase catalyzed synthesis of ketoses. *Tetrahedron Letters* **1987**, *28* (45), 5525-5528.
151. Yi, D.; Devamani, T.; Abdoul-Zabar, J.; Charmantray, F.; Helaine, V.; Hecquet, L.; Fessner, W.-D., A pH-Based High-Throughput Assay for Transketolase: Fingerprinting of Substrate Tolerance and Quantitative Kinetics. *ChemBioChem* **2012**, *13* (15), 2290-2300.
152. Kazlauskas, R.J., - Quantitative Assay of Hydrolases for Activity and Selectivity Using Color Changes, *Enzyme Assays. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA* **2006**, p. 15-39.
153. Vuorinen, T.; Serianni, A.S., Synthesis of D-erythro-2-pentulose and D-threo-2-pentulose and analysis of the ¹³C- and ¹H-NMR spectra of the 1-¹³C- and 2-¹³C-substituted sugars. *Carbohydrate Research* **1991**, *209* (0), 13-31.
154. Smith, M.E.B.; Smithies, K.; Senussi, T.; Dalby, P.A.; Hailes, H.C., The First Mimetic of the Transketolase Reaction. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, *2006* (5), 1121-1123.
155. Yi, D., Enzymatic Properties and Directed Evolution of Transketolase and Chemoenzymatic Synthesis of neo-Sialoconjugates. *Thesis. Technische Universität Darmstadt*, **2012**.
156. Chen-Goodspeed, M.; Sogorb, M.A.; Wu, F.; Raushel, F.M., Enhancement, Relaxation, and Reversal of the Stereoselectivity for Phosphotriesterase by Rational Evolution of Active Site Residues†. *Biochemistry* **2001**, *40* (5), 1332-1339.
157. Lutz, S.; Bornscheuer, U.T., Protein engineering handbook: *Wiley-VCH*. **2009**.
158. Hult, K.; Berglund, P., Engineered enzymes for improved organic synthesis. *Curr Opin Biotechnol* **2003**, *14* (4), 395-400.
159. Reetz, M.T.; Wilensek, S.; Zha, D.; Jaeger, K.E., Directed Evolution of an Enantioselective Enzyme through Combinatorial Multiple-Cassette Mutagenesis. *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40* (19), 3589-3591.
160. Zha, D.; Wilensek, S.; Hermes, M.; Jaeger, K.-E.; Reetz, M.T., Complete reversal of enantioselectivity of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. *Chemical Communications* **2001**, (24), 2664-2665.
161. Koga, Y.; Kato, K.; Nakano, H.; Yamane, T., Inverting Enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* KWI-56 Lipase by Combinatorial Mutation and High-throughput Screening Using Single-molecule PCR and In Vitro Expression. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *331* (3), 585-592.
162. Ivancic, M.; Valinger, G.; Gruber, K.; Schwab, H., Inverting enantioselectivity of *Burkholderia gladioli* esterase EstB by directed and designed evolution. *Journal of Biotechnology* **2007**, *129* (1), 109-122.
163. May, O.; Nguyen, P.T.; Arnold, F.H., Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nat Biotechnol* **2000**, *18* (3), 317-20.

164. Abou-Nader, M.; Benedik, M.J., Rapid generation of random mutant libraries. *Bioeng Bugs* **2010**, *1* (5), 337-40.
165. Persson, M.; Palcic, M.M., A high-throughput pH indicator assay for screening glycosyltransferase saturation mutagenesis libraries. *Anal Biochem* **2008**, *378* (1), 1-7.
166. Kochetov, G.A.; Philippov, P.P., A new method for continuous recording of the transketolase reaction. *Analytical Biochemistry* **1972**, *48* (1), 286-291.
167. Holldorf, A.W., Methods of Enzymatic Analysis, ed. H.U. Bergmeyer. Vol. 4: Elsevier. **1984**.
168. Mitra, R.; Woodley, J., A useful assay for transketolase in asymmetric syntheses. *Biotechnology Techniques* **1996**, *10* (3), 167-172.
169. Janes, L.E.; Löwendahl, A.C.; Kazlauskas, R.J., Quantitative Screening of Hydrolase Libraries Using pH Indicators: Identifying Active and Enantioselective Hydrolases. *Chemistry – A European Journal* **1998**, *4* (11), 2324-2331.
170. Liu, A.M.F.; Somers, N.A.; Kazlauskas, R.J.; Brush, T.S.; Zocher, F.; Enzelberger, M.M.; Bornscheuer, U.T.; Horsman, G.P.; Mezzetti, A.; Schmidt-Dannert, C.; Schmid, R.D., Mapping the substrate selectivity of new hydrolases using colorimetric screening: lipases from *Bacillus thermocatenulatus* and *Ophiostoma piliferum*, esterases from *Pseudomonas fluorescens* and *Streptomyces diastatochromogenes*. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12* (4), 545-556.
171. Chapman, E.; Wong, C.H., A pH sensitive colorimetric assay for the high-throughput screening of enzyme inhibitors and substrates: a case study using kinases. *Bioorg Med Chem* **2002**, *10* (3), 551-5.
172. He, N.; Yi, D.; Fessner, W.-D., Flexibility of Substrate Binding of Cytosine-5' -Monophosphate-N-Acetylneuraminase Synthetase (CMP-Sialate Synthetase) from *Neisseria meningitidis*: An Enabling Catalyst for the Synthesis of Neo-sialoconjugates. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2011**, *353* (13), 2384-2398.
173. Deng, C.; Chen, R.R., A pH-sensitive assay for galactosyltransferase. *Analytical Biochemistry* **2004**, *330* (2), 219-226.
174. Hübner, G.; Golbik, R.; Meshalkina, L.E., A method for determination of transketolase activity based on the use of a pH indicator. *Biochemistry international* **1992**, *26* (3), 545-550.
175. Yu, K.; Hu, S.; Huang, J.; Mei, L.H., A high-throughput colorimetric assay to measure the activity of glutamate decarboxylase. *Enzyme Microb Technol* **2011**, *49* (3), 272-6.
176. Bubb, W.A.; Berthon, H.A.; Kuchel, P.W., Tris Buffer Reactivity with Low-Molecular-Weight Aldehydes: NMR Characterization of the Reactions of Glyceraldehyde-3-Phosphate. *Bioorganic Chemistry* **1995**, *23* (2), 119-130.
177. Long, G.L.; Winefordner, J.D., Limit of Detection A Closer Look at the IUPAC Definition. *Analytical Chemistry* **1983**, *55* (7), 712A-724A.
178. Grognum, J.; Reymond, J.-L., - Enzyme Activity Fingerprinting Methods for Hydrolases, *Protein Science Encyclopedia*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA **2008**, p.
179. Reetz, M.T., - Changing the Enantioselectivity of Enzymes by Directed Evolution, *Methods in Enzymology* E.R. Dan and P.N. Joseph, Editors., *Academic Press* **2004**, p. 238-256.
180. Habe, H.; Fukuoka, T.; Kitamoto, D.; Sakaki, K., Glycerol Conversion to D-Xylulose by a Two-stage Microbial Reaction Using *Candida parapsilosis* and *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Oleo Science* **2009**, *58* (11), 595-600.
181. Reference NMR spectra for D-Xylulose, *Online Database: Biological Magnetic Resonance Data Bank* (<http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/>), BRMD ID: bmse000027
182. Lehninger, A.; Nelson, D.; Cox, M., *Lehninger Principles of Biochemistry: W. H. Freeman*. **2008**.

Publications

DOI: 10.1002/adsc.201200590

Thermostable Transketolase from *Geobacillus stearothermophilus*: Characterization and Catalytic PropertiesJuliane Abdoul-Zabar,^{a,b} Isabelle Sorel,^{a,b,c} Virgil H elaine,^{a,b} Franck Charmantray,^{a,b} Titu Devamani,^c Dong Yi,^e V eronique de Berardinis,^c Dominique Louis,^c Philippe Marli ere,^d Wolf-Dieter Fessner,^e and Laurence Hecquet^{a,b,*}^a Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

Fax: (+33)-4-7340-7717; phone: (+33)-4-7340-787; e-mail: laurence.hecquet@univ-bpclermont.fr

^b CNRS, UMR 6296, ICCF, F-63177 Aubière, France^c CEA, DSV, IG, Genoscope, 2 rue Gaston-Crémieux, F-91057 Evry, France^d Isthmus SARL, 81 rue Réaumur, F-75002 Paris, France^e Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt, Petersenstra e 22, D-64287 Darmstadt, Germany

Received: July 6, 2012; Revised: October 12, 2012; Published online: December 28, 2012

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.201200590>.

Abstract: Here we have characterized the first transketolase (TK) from a thermophilic microorganism, *Geobacillus stearothermophilus*, which was expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli*. The *G. stearothermophilus* TK (mTK_{gst}) retained 100% activity for one week at 50 °C and for 3 days at 65 °C, and has an optimum temperature range around 60–70 °C, which will be useful for preparative applications and for future biocatalyst development. The thermostability of the mTK_{gst} allowed us to carry out an easy, one-step purification by heat shock treatment of crude cell extracts at 65 °C for 45 min, directly yielding 132 mg of pure mTK_{gst} from 1 L of culture. The reaction rate of mTK_{gst} with glycolaldehyde was 14 times higher at 70 °C than at 20 °C, and 4 times higher at 50 °C when compared to *E. coli* TK under identical conditions. When tested at 50 °C with other aldehydes as acceptors, mTK_{gst} activity was approximately 3 times higher than those obtained at 20 °C. Applications of this new TK in biocatalysis

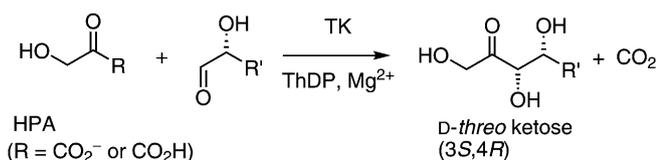
were performed with hydroxypyruvate as donor and three different aldehydes as acceptors – glycolaldehyde, D-glyceraldehyde and butyraldehyde – from which the corresponding products L-erythrulose **1**, D-xylulose **2** and 1,3-dihydroxyhexan-2-one **3** were obtained, respectively. The optical rotations for products **1** and **2** indicate that the stereospecificity of mTK_{gst} is identical to that of other TK sources, leading to a (3*S*) configuration. With the non-hydroxylated substrate, butanal, the *ee* value was 85% (3*S*), showing higher enantioselectivity than the *E. coli* TK (75% *ee*, 3*S*). Processes at elevated temperatures could offer opportunities to extend the applications of TK biocatalysis, by favoring hydrophobic aldehyde acceptor substrate solubility and tolerance towards non-conventional media.

Keywords: biocatalysis; C–C bond formation; mono-saccharides; thermostability; transketolases

Introduction

This paper focuses on a thiamine-dependent enzyme, transketolase (TK, EC 2.2.1.1.), which *in vivo* catalyzes the stereospecific formation of a C–C bond by a reversible transfer of the C-1–C-2 ketol unit from a ketose phosphate to an aldose phosphate. The new asymmetric center is stereospecifically formed in the (*S*) configuration. For synthetic applications, TK is

preferentially used with hydroxypyruvate (HPA)^[1] as the donor substrate, thereby rendering the ketol transfer irreversible, and making TK an ideal tool for ketose synthesis (Scheme 1).^[2–9] Previous studies showed that this enzyme type preferentially accepts α -hydroxylated aldehydes with (2*R*) configuration, although activity is lower when aldehydes are non-phosphorylated and less functionalized (alkyl, allyl, aromatic or heterocyclic moieties).^[2b,3] The final ketose



Scheme 1. Irreversible reaction catalyzed by TK in the presence of hydroxypyruvate (HPA) as donor substrate and an α -hydroxy aldehyde as acceptor substrate.

products invariably have the *D*-threo configuration (3*S*,4*R*).

To advance this research, TKs from yeast^[10] (TK_{yeast}) or from *E. coli*^[11] (TK_{eco}) have been cloned and overexpressed, giving sufficient amounts of protein with high specific activity. To improve synthetic processes based on TK-catalyzed reactions, some studies have described TK immobilization methods^[12,13a] and modular microfluidic reactor design.^[13b]

From the industrial point of view, enzymatic processes at elevated temperature offer many advantages, such as higher reaction rate, improved solubility of organic substrates, and higher tolerance towards non-conventional media. In addition, for TK improvement by mutagenesis,^[14,15] a thermostable enzyme also offers better resistance against protein destabilizing factors.

We have chosen *Geobacillus stearothermophilus* (formerly *Bacillus stearothermophilus*) as a potential source of a process and thermally stable TK enzyme. This Gram-positive thermophilic bacterium is widely distributed in soil, hot springs and ocean sediments, and grows over a temperature range of 30–75 °C. Many heat-stable enzymes, such as xylanase,^[16] L-arabinose isomerase,^[17] glycosidases,^[18] and α -amylases,^[19] have been isolated from this thermophilic bacterium. As yet, no complete genome sequence is available in public databases for any *G. stearothermophilus* strain and to the best of our knowledge no transketolase enzyme has hitherto been described.

Here we report the first characterization of a *Geobacillus* TK expressed from the *G. stearothermophilus* gene *tk*, which was identified from the total known genome analysis, in recombinant *E. coli* cells. In line with the thermophilic property of the donor microorganism, we planned herein to study the thermostability of the TK enzyme and the optimal conditions for enzyme purification and biocatalysis. Moreover, we considered its behavior towards various acceptor aldehydes for a comparison to TK_{eco} and TK_{yeast}, with respect to kinetic parameters *versus* temperature. Finally, to determine its stereoselectivity, the *G. stearothermophilus* TK was applied for reactions performed on a preparative scale at 50 °C in the presence of Li-HPA as donor and some typical acceptor substrates.

Results and Discussion

Analysis of the *tk* Gene from *G. stearothermophilus* for Heterologous Expression

The protein sequences and solved dimeric 3D structures of microbial TKs from *E. coli*,^[20a] *S. cerevisiae*^[21a] and *B. anthracis*^[22] show high structural homologies. These micro-organisms contain two TK isoenzymes: TKTA/TKTB in *E. coli*, TKL1/TKL2 in yeast, and TK1/TK2 in *B. anthracis*. *E. coli* TKTA^[20b] and yeast TKL1^[21b] are the most active and most frequently used for biocatalysis.

Since no *G. stearothermophilus* TK (TK_{gst}) was hitherto known in the public databases, we used the draft genomic sequence of *G. stearothermophilus* strain 10 to find a gene orthologous to that of the known *Bacillus anthracis tk1* gene (belonging to the same family). Analysis of the *G. stearothermophilus* genome revealed only one *tk* gene, suggesting that this organism contains only a single TK enzyme (55% identity with TK1 and 72% with TK2 of *B. anthracis*) (Figure 1).

However, since the publicly available *G. stearothermophilus* genome sequence is an incomplete draft, a second TK might have been missed. We further used the TK protein sequence of *G. stearothermophilus* DSM 13240 to search for homologous TK proteins in the other available draft genomes of *Geobacillus* species (six *Geobacillus* sp., *G. kaustophilus*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidasius*). For all these available draft genomes, also only a single *tk* gene homologous to that of the *G. stearothermophilus* was found, suggesting that generally only one *tk* gene occurs in *Geobacillus* species.

Cloning, Expression, and Purification of *G. stearothermophilus* TK from Recombinant *E. coli*

The coding sequence for the wild-type TK of *G. stearothermophilus*, amplified by PCR, was cloned into expression vector pGEN452, derived from pET47b (see Experimental Section). Thus the expression of the cloned gene is under control of the T7 promoter, allowing the production of large enzyme quantities. In view of intended further studies we modified the coding sequence of *G. stearothermophilus* wild-type TK to remove some restriction sites and introduce new unique restriction sites for cassette mutagenesis purposes. This slightly modifies the sequence of the gene and changes three amino acids in the protein sequence: L397F, D399G and H479Q. Because these residues are located at positions distant from the active site, the changes were expected not to disturb the enzyme activity. The gene sequence was synthe-

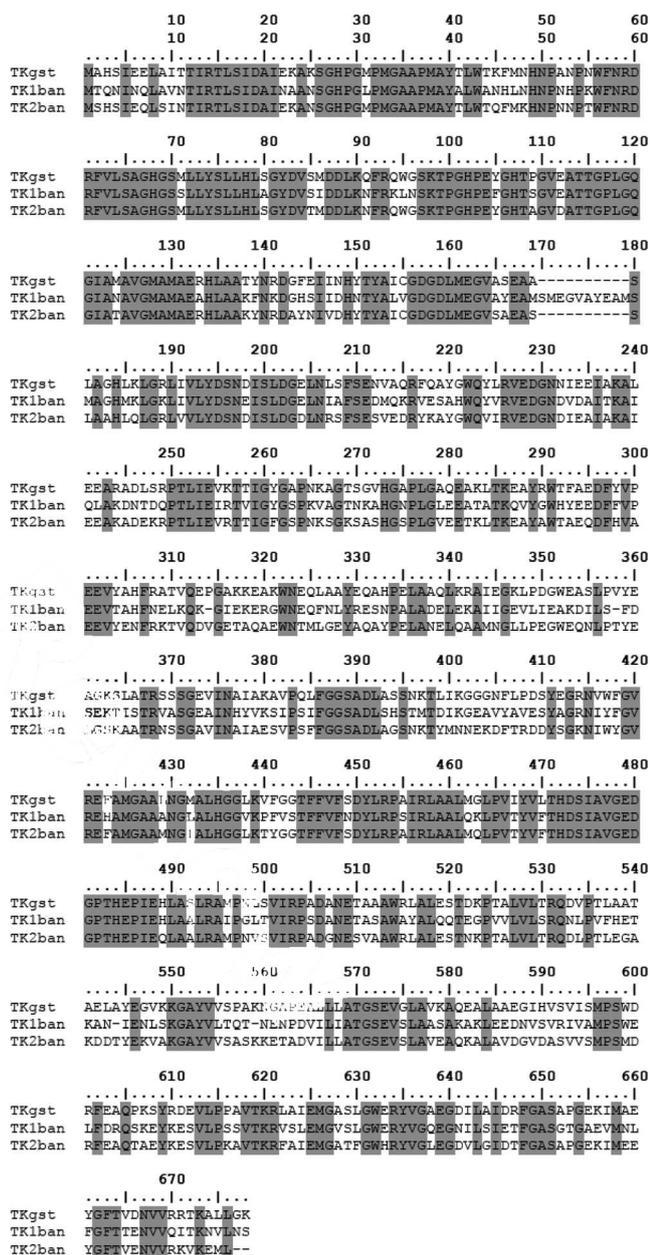


Figure 1. Sequence alignment of *G. stearothermophilus* transketolase (GstTK) and *B. anthracis* transketolase 1 and 2 (BanTK1 and BanTK2) using the program CLUSTALW. Identical residues are indicated by grey background.

sized commercially (see Experimental Section) and cloned into the expression vector pGEN452.

The high rates of overexpression of *G. stearothermophilus* wild-type TK (TK_{gst}) and *G. stearothermophilus* TK expressed from the modified synthetic gene sequence (mTK_{gst}) were confirmed by SDS-PAGE and found to be very similar (Figure 2). A hexa-histidine-tag was added at the N-terminus of the enzyme to facilitate purification.

After expression in *E. coli* BL21 (DE3), TK_{gst} and mTK_{gst} were purified using affinity chromatography

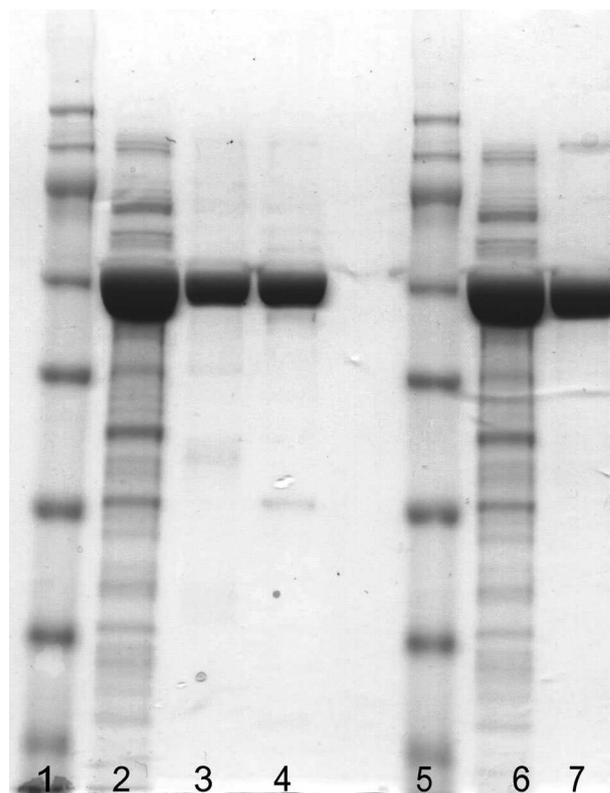


Figure 2. SDS/PAGE analysis of the TK_{gst} and mTK_{gst} purification (for conditions, see Experimental Section). Lane 1: SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, lane 2: crude extract mTK_{gst} (20 µg), lane 3: mTK_{gst} purified by IMAC (5 µg), lane 4: mTK_{gst} purified by heat shock (5 µg), lane 5: See-Blue® Plus2 Pre-Stained Standard, lane 6: crude extract TK_{gst} (20 µg), lane 7: TK_{gst} purified by IMAC (5 µg).

by IMAC. The expressed His₆-tagged fusion proteins were applied to an Ni²⁺ chelating affinity column for purification. By this procedure, 160 mg each of the purified enzymes TK_{gst} or mTK_{gst} (0.6 U·mg⁻¹) were effectively obtained from the cells grown in 1 L culture (5 g·L⁻¹ of wet cells) (Table 1).

Apparently, the sequence modifications introduced into the wild-type *tk_{gst}* gene and causing small variations in protein sequence did not affect the overall specific mTK_{gst} activity. Thus, for all further studies we exclusively used the protein expressed from the synthetic gene, and all the results presented here were obtained from the corresponding protein variant mTK_{gst}. Given the thermostability of the mTK_{gst} (*vide infra*), we performed an alternative purification procedure by heat shock treatment (Figure 2 and Table 1). After cell lysis, crude extract was heated at 65°C for 45 min, then centrifuged at 6,000 g for 25 min. This easy and rapid purification method yielded 132 mg of purified enzyme from the cells grown in 1 L of culture. The specific activity and the SDS/PAGE profile for mTK_{gst} were similar to that obtained with the affinity chromatography method.

Table 1. Purification of the TK_{gst} and mTK_{gst} from recombinant *E. coli* cells.

Purification step	Protein ^[a] [mg]	Total activity ^[b] [U]	Specific activity ^[b] [U·mg ⁻¹]	Yield [%]	Purification (fold)
Crude extract	600	180	0.3	–	
Purified TK _{gst} or mTK _{gst} by IMAC	160	140	0.9	78	3
Purified mTK _{gst} by heat shock	132	112	0.9	62	3

^[a] Crude extract obtained after sonication of *E. coli* cells overexpressing TK_{gst} or mTK_{gst} harvested from 1 L of culture.

^[b] Activity measured in the presence of L-erythrulose and D-ribose-5-phosphate as donor and acceptor substrates, respectively, in buffered medium at 20 °C. Glycolaldehyde released was measured spectrophotometrically at 340 nm *via* NADH consumption by alcohol dehydrogenase.

Determination of mTK_{gst} Activity

Specific activity of mTK_{gst} was determined in the presence of L-erythrulose as donor and D-ribose-5-phosphate (D-R5P) as acceptor substrates.^[23] L-Erythrulose, a non-natural substrate, was used in order to replace D-xylulose-5-phosphate,^[8b] a natural donor substrate which is not continuously commercially available (Scheme 2). This assay was chosen because it allows a direct, continuous measurement of TK initial velocity at different temperatures (20 °C–70 °C; using a Peltier-effect controller) by following the formation of glycolaldehyde (GA) spectrophotometrically at 340 nm *via* consumption of NADH in a coupled enzymatic reaction using yeast alcohol dehydrogenase (ADH).^[23] We checked that ADH was stable in the range from 20 °C to 75 °C at least for the time required for the measurement of initial TK velocity (5 min.). This method was used throughout for TK activity determinations.

pH and Temperature Profiles

The effect of pH on mTK_{gst} activity was determined in the range of pH 5–9 at 20 °C (Figure 3, A).

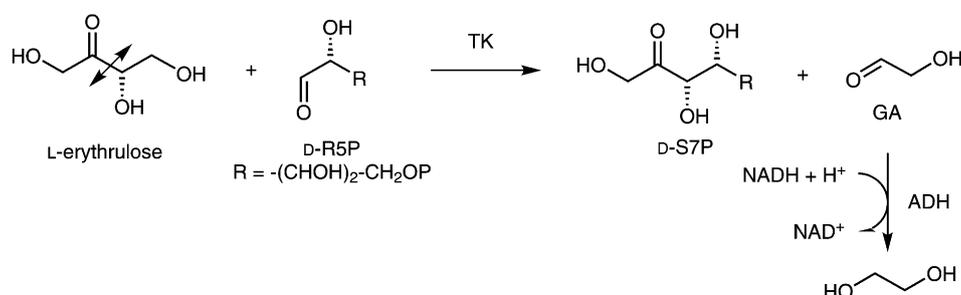
The enzyme showed the highest activity at pH 7–8, which is similar to the optimum pH for TK activity

from all microbial TKs characterized so far. The *E. coli* enzyme displays maximum activity in glycylglycine buffer at pH 8.0 to 8.5,^[11a] between pH 7.0 and 7.5 in phosphate buffer,^[24] and 7.0 in Tris buffer.^[25a] Reported optimum pH values for bakers's and brewer's yeast TK are 7.5 and 7.6, respectively.^[26,27]

The influence of temperature on mTK_{gst} activity was studied between 20–75 °C in Tris buffered medium (Figure 3, B). mTK_{gst} has an optimum temperature range of 60–70 °C, leading to an improvement of up to 10-fold when compared to the activity measured at 20 °C. This temperature profile was identical to that obtained for wild-type TK_{gst} (data not shown). The optimum temperature of mTK_{gst} was much higher than that of other characterized TK from microbial sources such as TK_{eco} which has a broad optimum activity at 20–40 °C.^[11a] In contrast, erythrocyte TK exhibited an optimal pH range at 50 °C with a sharp drop in activity when temperature was increased to 60 °C.^[11c]

Thermostability

Thermostability was studied in the range 20–85 °C by measuring the residual enzymatic activity after extended incubation at certain temperatures. mTK_{gst} retained 100% activity for one week at 50 °C and 3 days



Scheme 2. Assay for activity determination of TK in the presence of L-erythrulose and D-ribose-5-phosphate (D-R5P) as substrates leading to D-sedoheptulose-7-phosphate (D-S7P) and glycolaldehyde (GA). Glycolaldehyde released is measured spectrophotometrically at 340 nm using alcohol dehydrogenase (ADH) and NADH.

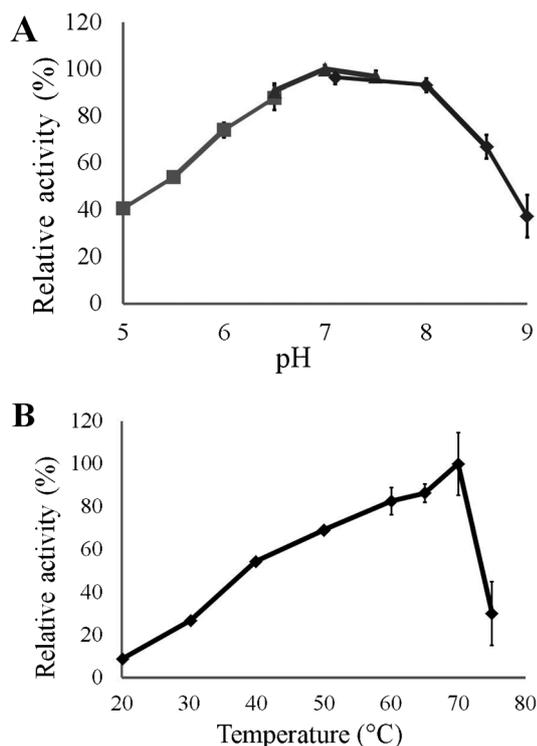


Figure 3. mTK_{gst} activities measured in buffered medium in the presence of L-erythrulose and D-ribose-5-phosphate as donor and acceptor substrates, respectively. Glycolaldehyde released was measured spectrophotometrically at 340 nm via NADH consumption with alcohol dehydrogenase. (A) Effect of pH on the mTK_{gst} activity. Buffers (50 mM) used were glycylglycine (pK_a 8.17) ■, MES (pK_a 6.15) ▲, and Tris (pK_a 7.2) ◆. (B) Effect of temperature on the mTK_{gst} activity. TK was incubated at the indicated temperature; the maximum activity corresponds to a specific activity of 11 U·mg⁻¹. Activity of the enzyme measured at 20°C: maximum activity corresponds to a specific activity of 0.86 U·mg⁻¹.

at 70°C (data not shown). The results obtained from two-hour incubations at 50°C, 70°C, 75°C and 85°C are indicated in Figure 4, A. The mTK_{gst} activity decreased rapidly at 75°C (half-life was about 15 min), and at 85°C mTK_{gst} lost its activity immediately. The results were compared with other microbial TK sources, *E. coli* and *S. cerevisiae* (Figure 4, B). At 50°C, yeast TK activity decreased gradually (half-life 35 min) and activity loss was immediate at 70°C. TK_{eco} was more resistant, retaining 100% of its activity at 50°C for 90 min, while its activity completely vanished during 5 min exposure at 70°C. This finding was corroborated by a recent study^[25a] of the thermal inactivation of TK_{eco} at above 40°C for incubation times of up to 1 h. At 40–55°C the residual activity increased with incubation time and temperature when measured after recooling samples to 25°C. TK_{eco} lost its activity at above 55°C. In addition, Kochetov

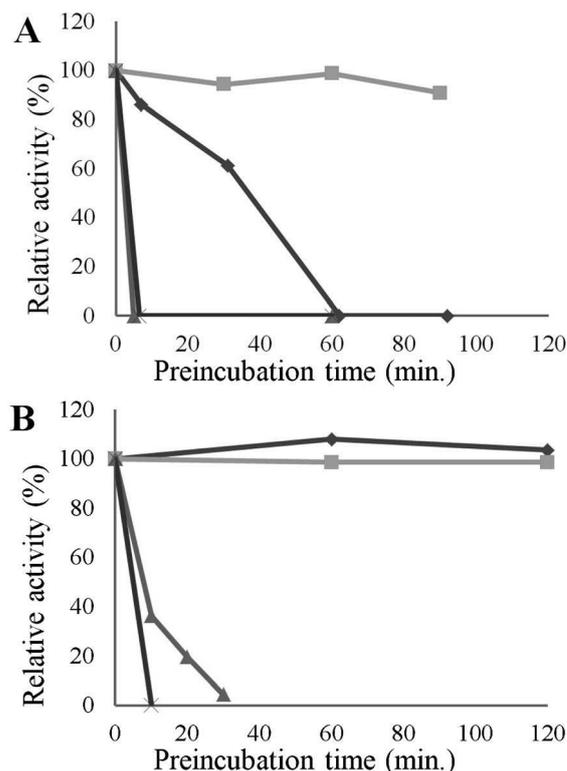


Figure 4. Thermostability of different TK sources against time. (A) Thermostability of mTK_{gst} at 50°C ◆, at 70°C ■, at 75°C ▲ and at 85°C ×. (B) Thermostability for other microbial TKs; TK_{eco} at 50°C ■, and at 70°C ▲, Maximum activity corresponds to a specific activity of 0.86 mg⁻¹. TK_{yeast} at 50°C ◆, and at 70°C ×. Maximum activity corresponds to a specific activity of 0.8 U·mg⁻¹ for TK_{yeast} and of 12 U·mg⁻¹ for TK_{eco}. Following incubation of TK at the indicated temperature in glycylglycine buffer at pH 7.5, TK activities were measured from aliquots at 20°C in presence of L-erythrulose and D-ribose-5-phosphate as donor and acceptor substrates, respectively. Glycolaldehyde released was measured with alcohol dehydrogenase and NADH by spectrophotometry at 340 nm.

showed a rapid thermoinactivation of TK_{yeast} at 60°C.^[25b]

Our study shows that mTK_{gst} exhibits high thermostability as expected from the property of the microorganism, extending the potential of this catalyst to a simple method of heat shock purification and possible improvements for demanding applications in synthetic biocatalysis.

Determination of mTK_{gst} Kinetic Constants

The kinetic parameters K_M and v_{max} of mTK_{gst} were determined using the standard Michaelis–Menten model and compared with those obtained for TK_{eco} and TK_{yeast}. The results obtained by the Hanes–Woolf method are summarized in Table 2.

Table 2. Temperature dependence of kinetic constants for mTK_{gst} and for TK_{eco}.

TK sources	T [°C]	L-Erythrulose		D-Ribose 5-P	
		K_M [mM] ^[a]	v_{max} [U·mg ⁻¹] ^[a]	K_M [mM] ^[a]	v_{max} [U·mg ⁻¹] ^[a]
mTK _{gst}	25	5.2 ± 0.2	0.97 ± 0.02	0.20 ± 0.03	1.0 ± 0.03
	50	8.0 ± 0.7	6.6 ± 0.1	0.13 ± 0.09	8.4 ± 0.2
TK _{eco}	25	18 ± 2	12 ± 1	1.4 ^[11a]	50.4 ^[11a]

^[a] K_M (mM), v_{max} (U·mg⁻¹) and k_{cat} values were measured by varying L-erythrulose and D-R5P concentrations in the presence of NADH and YADH by spectrophotometry at 340 nm. One unit (U) of TK releases 1 μmol of glycolaldehyde per minute at pH 7.5 (glycylglycine buffer, 50 mM) and at the specified temperatures. Hanes–Woolf plots were used to determine v_{max} and K_M values. For K_M , the cosubstrate was applied in excess.

Substrate affinities of mTK_{gst} for L-erythrulose and D-ribose-5-phosphate were found to be similar independent of the temperature and were better than those obtained with TK_{eco} and TK_{yeast}. The v_{max} values of mTK_{gst} increased at 50 °C (6 times higher with L-erythrulose and 8 times higher with D-ribose-5-phosphate than at 25 °C).

Substrate Specificity of mTK_{gst}

Li-HPA Stability against Temperature

For synthetic purposes, we used Li-HPA as donor substrate, making the reaction irreversible due to the release of carbon dioxide (Scheme 1). We studied its stability at temperatures of 20 °C, 50 °C and 70 °C for 60 min in different buffers at pH 7.5 (Figure 5). At 20 °C (Figure 5, A) Li-HPA was stable in water and in buffered medium. At 50 °C (Figure 5, B) and 70 °C (Figure 5, C), Li-HPA appeared to be stable in plain water, but gradually decomposed in buffered medium. HPA was shown to be more stable in glycylglycine buffer than in TEA, Hepes or phosphate buffers.

We further compared the stability of Li-HPA with and without mTK_{gst} in glycylglycine buffer (Figure 6). Li-HPA disappeared much faster in the presence of TK than in its absence. As reported in previous studies,^[2b] Li-HPA decarboxylation in buffered solution yields glycolaldehyde as the primary product, which then reacts as an acceptor substrate for TK, giving rise to the formation of L-erythrulose by subsequent condensation with residual Li-HPA. The velocity of this side reaction paralleled the increase in TK activity with increasing temperature.

Given the instability of Li-HPA in buffered solution at temperatures above 20 °C, determination of TK specific rates towards aldehydes were performed at 50 °C in glycylglycine buffer, in which Li-HPA degradation is insignificant during the first minutes of the reaction. In all cases, the TK rate values take into account the velocity of Li-HPA degradation in the absence of added aldehydes. Preparative scale syntheses were performed in water at 50 °C, where Li-HPA is

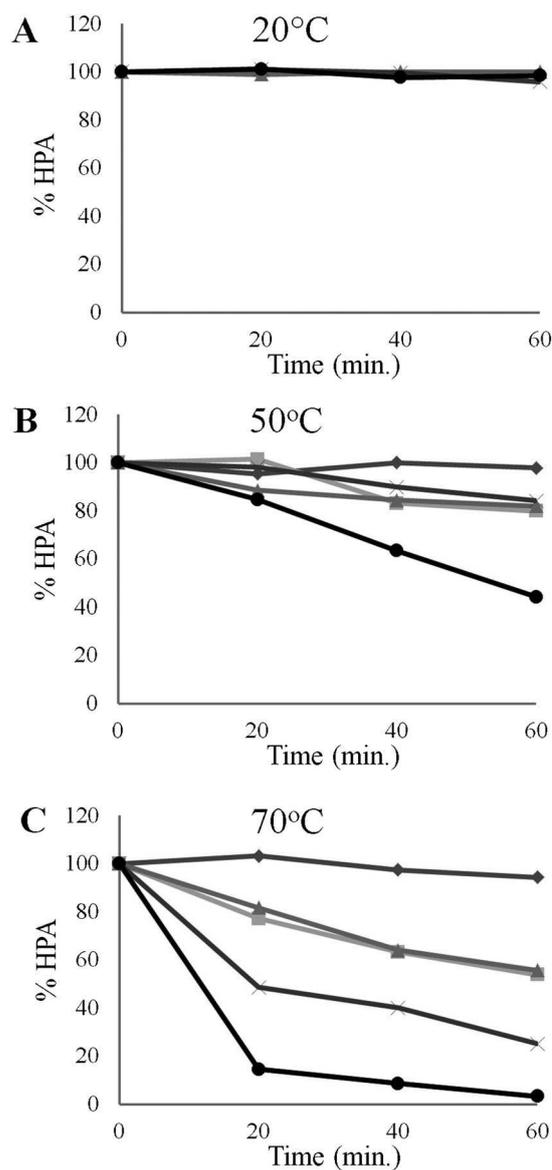


Figure 5. Li-HPA stability against time and temperature in the absence of TK in H₂O ♦, in glycylglycine buffer ▲, in TEA buffer ■, in KH₂PO₄ buffer ×, and in Hepes buffer ●. (A) Stability of Li-HPA at 20 °C, (B) at 50 °C and (C) at 70 °C. Li-HPA concentrations (50 mM = 100%) determined against time from aliquots of medium in the presence of L-lactate dehydrogenase as auxiliary enzyme and NADH by spectrophotometry at 340 nm.

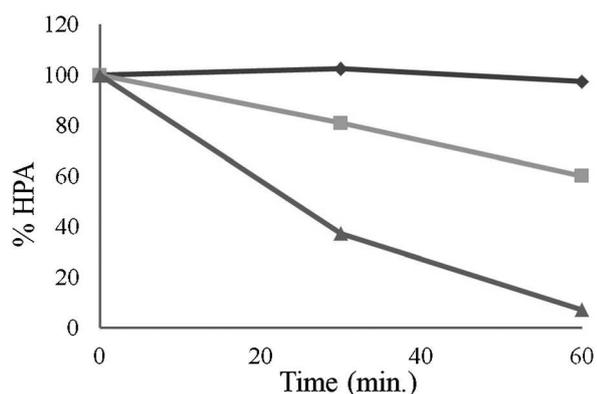


Figure 6. Li-HPA stability (50 mM = 100%) against time and temperature with mTK_{gst}, ThDP and MgCl₂ in glycyglycine buffer. at 20°C ◆, 50°C ■ and 70°C ▲.

sufficiently stable. The pH can be easily adjusted continuously by pH-stat control.

Substrate Specificity for Different Aldehydes

We determined initial rates of mTK_{gst} for some standard aldehydes as acceptor substrates having varied carbon chain lengths and hydrophobic properties rela-

tive to glycolaldehyde (best reference substrate for *E. coli* and yeast TK^[2,3]) (Table 3).

Initial rates were determined in glycyglycine buffer at different temperatures in the presence of Li-HPA (taking into account its limited stability) by measuring residual Li-HPA concentrations from aliquots of the TK-catalyzed reaction, which were analyzed spectrophotometrically at 340 nm by the standard L-lactate dehydrogenase (LDH) assay in the presence of NADH (Scheme 3).

With glycolaldehyde, the mTK_{gst} relative velocity at 50°C and 65°C (data not shown) was 8 and 14 times higher, respectively, than at 20°C. The value of the relative velocity of mTK_{gst} at 50°C was 5.5 times higher than that obtained with TK_{eco} at 20°C. The determination of relative velocities for mTK_{gst} with other aldehydes as acceptor substrates were investigated at 50°C only owing to the instability of Li-HPA at higher temperature. For these other substrates, the relative activity of mTK_{gst} was approximately 3 times higher than those obtained at 20°C. We noted that at 20°C and 50°C, the mTK_{gst} relative activities with D,L-glyceraldehyde were 4 times lower than with enantiomerically pure D-glyceraldehyde, which suggests partial inhibition by L-glyceraldehyde as already described in the literature by using other TK sources.^[2a,3b,9b,26]

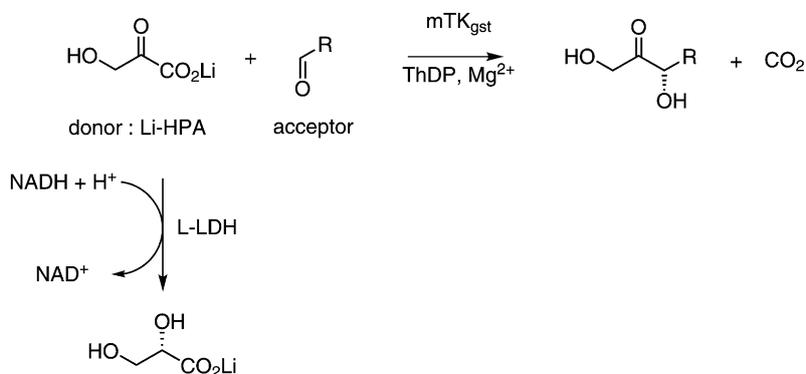
Table 3. Substrate range and relative velocities^[a] of mTK_{gst} with Li-HPA as a function of temperature (normalized to TK_{eco} with glycolaldehyde at 20°C).

Acceptor substrates	mM	20°C Other TKs	20°C mTK _{gst}	50°C mTK _{gst}
Glycolaldehyde	50	1 ^[a,b,c]	0.7	5.5
D-Glyceraldehyde	50	0.77 ^[b]	0.9	2.8
D,L-Glyceraldehyde	100	0.55, ^[b] 0.37 ^[c]	0.2	0.7
Butyraldehyde	200	0.11 ^[b]	0.07	0.2
D-Ribose	100	0.3 ^[b]	0.04	0.12

^[a] Own values obtained with TK_{eco}.

^[b] Literature values obtained with TK_{yeast}.^[2a,3a]

^[c] Literature values obtained with TK_{eco}.^[28]



Scheme 3. Irreversible reaction catalyzed by TK in the presence of hydroxypruvate (Li-HPA) as donor and various acceptor substrates.

tions determined for products **1** and **2** indicate that the mTK_{gst} shows apparent diastereospecificity with α -hydroxylated substrates, similar to other known TK sources; also, the enzyme retains high stereoselectivity with aliphatic analogues, leading to ketose-type products such as **3** with absolute (3*S*) configuration.

Processes at elevated temperature can offer many opportunities to improve and extend TK biocatalysis applications, such as higher substrate solubility of hydrophobic aldehyde acceptors and higher tolerance towards non-conventional media, which we will be continuing to investigate using free and immobilized enzyme. Other avenues of research will be the 3D structure determination of this new TK protein and the potential improvement of its biocatalytic properties by mutagenesis.

Experimental Section

Strains and Chemicals

G. stearothermophilus strain 10 was purchased from DSMZ, *E. coli* BL21 (DE3) Gold strain from Stratagene. Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. Reagents for molecular biology were purchased from Life Technologies. Enzymes were purchased from Thermo Fischer Scientific. Oligonucleotides were purchased from Eurofins-MWG-Operon. Hydroxypyruvate lithium salt was synthesized chemically by a literature method.^[32]

Sequence Analysis

The draft genome sequence of *G. stearothermophilus* is available through a BLAST server on the University of Oklahoma website (<http://www.genome.ou.edu/bstear-o.html>), and no annotation was available. TK1 of *B. anthracis* [Q81MY7] was chosen as tblastn.^[33] The detected genomic region of *G. stearothermophilus* was then analyzed to determine the *tk* nucleotide sequence. The translation of *tk* sequence was done to provide the *G. stearothermophilus* TK protein sequence. The genome analysis using *G. stearothermophilus* TK against other *Geobacillus* species draft genomes was done through IMG Blast server (<http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi>).

Cloning of the *G. stearothermophilus* Wild-Type and Synthetic *tk* Genes

The coding sequence of *G. stearothermophilus* wild-type TK was amplified by PCR with the following primers: forward 5'-AGGCGTTAATTAATGGCGCATCAATCGAGGAGTTGG-3' and reverse 5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTTACTTGCCGAGCAGCGCTTTTGTGC-3' including *PacI/NotI* restriction sites. This sequence was cloned into expression vector pGEN452, derived from pET47b by *SacII/AvrII* digestion and introduction of the following sequence GGCCCGATCGCCGCGCGGCCGCAAGCTTC with *PvuI* and *NotI* restriction sites for cloning purposes. Thus the expression of the cloned gene is under the control of T7 promoter, allowing the production of a large quantity of enzyme. The sequence of the resulting

plasmid named pGEN717 was verified. A hexa-histidine-tag was added at the N-terminus of the enzyme for purification purposes. The overexpression of *G. stearothermophilus* wild-type TK was checked by SDS-PAGE (Figure 1). Then we modified the coding sequence of *G. stearothermophilus* wild-type TK to remove some restriction sites and introduce new unique restriction sites for cassette mutagenesis purposes. The modified nucleotides are capitalized: atggcgcat caatcgaggagttggcgattacgacgattcgaacgctgtcgatt gacgcatcgaaaaagcgaaatccgggcaTccgggcatgcc gatggcgcgccgccaatggcgctacacgcttggacgaaatt tatgaatcataaccggcgcaatccaaactggttaaccgc gaccgTtttgtcttgtcagccgggacgggtcgatgttattgta cagctgtctcatttaagcggctacgacgattcgatggat gatttgaacaatccgctcaatggggaagcaaacgcccggc catccggaatacggccatacgcggggcgtggaagcgac gaccggccactcggccaaggattgcatggcggtcgg catggcgatggcggaacggcatttggccgctacatacaaccgc gacgggttgagattatcaatcattatacgtacgc catttgcggcgatggcgatttggatggaaggagtgggcgagc gaagctgcgctcactcgcggccacttgaagctcggTcgAct gatcgtcctgtatgactcgaacgacatttgcgtggacggg gagctcaacctgtcgttctcggaaaacgctgcccacgcttcc caagcAtacggctggcaatatttgcgcttgaggacggcaaca tattgaagaatcgccaaagcgtGgaggagcgccggcg gacctcagccggcgacgctcattgaagtaaaaacgac gattggctacggcgccaaataaagcgggacgctccggcgct caggtgtcctcggcggcccaagaggcgaagctgacgaaa gaggcgtatcgttggacatttgcggaagatttttacgtgcca gaagaagtgtacgccacttccgtgacgaggtgcaagagccgg gagcgaaaaaagaggcgaaatggaatgagcagctcgcgcctat gaacaggcccatccggaactggccgccaattgaagcgagc gatcgaaggcaaaactccagatggatgggaagcttcttggccgg tatacgaagcaggcaaaaagcttggcaaccgctcatcgtccggg gaagtgatcaacgccatcgccaaagcggTAccg caattgtttggcggttcggcggaacttggcaagctcgaa taaaacgctcatcaaagcggcggaacttcttCccggGcagc tacgaaggcgcaacgcttgggttggcgtgcgaggtttgc catggggcgcgctgaacggcatggcgctcaccggcggtt gaaagtgttcggcggaacgcttctcgtgttctctgac tatttgcgtccggcgatccgcttggcgcgctgatgggct tAccggtcatctacgctctgacgcacgacgacatcgccgctcggc gaagacgggcccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc tAgcttcgcttcggcgatgcccgaacttgcggt catccgctccggctgacgcaaacgaaacggcgcgac catggcggtggcgctcgaatcgacggacaagcc gactgcgctcgtcttgacgctcaagatgtgcccagcttggcg caacagctgagttggcgtatgaaggcgtgaaaaaggtgcA tacgctgtttcaccggcgaaaaacggcgctccg gagcgctgttggcggactggctcgggaagtcggcttggccg taaaagcgcaagaagcgtcgcgctgagggcattc catgtctccgctcatcagcatgccatgctgggaccgcttc gaagcgcagccaaaatcgtaccgcat gaagtgttccgcccggcgtgacgaagcggctcgccatt gaaatggcgcgctcgtcgggttgggagcgtacgtcggcgcc gagggcgacatttggccatcgacc gattcgggtcttccgctccgggagagaaaatcatggccgag tatggctttacggttgacaacgctcgtccgcccga caaaagcgtcgtcggcaagtaa.

The *G. stearothermophilus tk* nucleotide sequence was used to design a synthetic *G. stearothermophilus tk* gene purchased from Invitrogen. The synthetic *G. stearothermo-*

philus tk gene was cloned into pGEN452 by digestion of the plasmid received from Invitrogen and subsequent ligation. The sequence of the resulting plasmid named pGEN768 was verified.

Expression and Purification of *G. stearothermophilus* TK (TK_{gst} and mTK_{gst}) from *E. coli*

Expression: Expression was carried out in *E. coli* BL21 (DE3) Gold strain. This strain was first transformed by electroporation with pGEN717 for the expression of the wild-type TK (TK_{gst}) and plated on LB medium with 30 µg·mL⁻¹ kanamycin. The *E. coli* BL21 (DE3) strain was then transformed by electroporation with pGEN768 for the expression of the mTK_{gst} from the synthetic *tk* gene. A 100 mL pre-culture was grown at 37 °C in LB medium with 30 µg·mL⁻¹ kanamycin overnight. The pre-culture was used to inoculate 1 liter of culture medium containing 30 µg·mL⁻¹ kanamycin. Isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG) at 1 mM was introduced when the OD range was 0.7–0.8. The cells were then grown overnight at 30 °C and harvested (5 g·L⁻¹ of biomass).

Purification by chromatography affinity: The recombinant TK_{gst} or mTK_{gst} was purified as a 6×His-tagged fusion. The harvested recombinant cells from 1 L culture were suspended in 50 mL of 50 mM phosphate buffer containing 300 mM NaCl (pH 8.0). The cells were disrupted by sonication for 15 min on ice, and the insoluble pellet was discarded after centrifugation (10,000 g, 20 min, 4 °C). The crude extract was applied to a Ni-NTA (QIAGEN) Ni²⁺ chelating affinity column equilibrated with the phosphate buffer mentioned above. After washing the column with the same buffer, the 6×His-tagged recombinant protein was finally eluted with 50 mM phosphate buffer containing 300 mM NaCl and 250 mM imidazole (pH 8.0). The fractions containing TK (estimated Bradford test and activity assay) were collected and concentrated using an Amicon Ultra-15 centrifugal filter device (Millipore). Protein concentration was determined by the method of Bradford, and bovine serum albumin (BSA) was used as the standard. The enzyme activity was determined by the ADH activity assay described. After purification from 1 L culture, 160 mg of total proteins was obtained with a total TK_{gst} or mTK_{gst} activity of 140 U, corresponding to a specific activity of 0.9 U·mg⁻¹.

Purification of TK by heat shock: The harvested recombinant cells from 1 L of culture were suspended in 50 mL of 50 mM glycyglycine buffer (pH 7.0). The cells were disrupted by sonication for 15 min on ice, and the insoluble pellet was discarded after centrifugation (10,000 rpm, 20 min, 4 °C). The supernatant crude extract was heated at 65 °C for 45 min, and then centrifuged at 6,000 g for 25 min. The insoluble pellet was discarded. After this treatment of 1 L culture, 132 mg of total proteins was obtained with a total activity of 112 U, corresponding to a specific activity of 0.9 U·mg⁻¹ at 20 °C. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)⁷ was performed on a 10% polyacrylamide gel with SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard in NuPAGE® MOPS SDS running buffer. Proteins were visualized by staining with Coomassie® blue G-250. Protein determination was performed with the Bradford test^[34] using BSA as a standard.

Determination of TK Activity

One unit of TK activity is defined as the amount of TK that catalyzes the formation of 1 µmol of ketose product per minute at 20 °C in glycyglycine buffer (50 mM, pH 7.5). TK enzymatic assay was performed in the presence of L-erythrulose and D-ribose-5-phosphate (D-R5P) leading to D-sedoheptulose-7-phosphate (D-S7P) and glycolaldehyde (GA).^[25] The GA formed is reduced by yeast alcohol dehydrogenase (ADH) to glycol in the presence of nicotinic adenine dinucleotide, reduced form (NADH). L-Erythrulose (88 mM, 10 mg·mL⁻¹), D-R5P (9.0 mM, 2.4 mg·mL⁻¹), ThDP (2.4 mM, 1.1 mg·mL⁻¹), MgCl₂ (0.5 mM, 0.1 mg·mL⁻¹), NADH (0.28 mM, 0.2 mg·mL⁻¹), ADH (50 U·mL⁻¹, 0.15 mg·mL⁻¹) and the TK suspension (10 µL) were added to disposable plastic cuvettes and completed to 1 mL with glycyglycine buffer (50 mM, pH 7.5). The disappearance of NADH was followed by spectrophotometry at 340 nm (value ε_{NADH 340} = 6220 M⁻¹·cm⁻¹).

Determination of TK activity as a function of the temperature: The temperature of the assay was controlled by a Peltier effect controller. The TK sample was first incubated at the chosen temperature for 10 min in the presence of ThDP, MgCl₂, NADH, L-erythrulose and buffer in the above concentrations. The reaction was started by the addition of a solution of YADH and D-ribose-5-phosphate and the disappearance of NADH was followed by spectrophotometry at 340 nm. At temperatures above 50 °C, a larger excess of the auxiliary enzyme ADH (100 U·mL⁻¹) was used to deal with its quick loss of activity. Glycyglycine was chosen as a buffer since L-erythrulose was instable in other buffers such as HEPES or Tris at higher temperatures.

Determination of the Li-HPA Concentration

The Li-HPA concentration was determined by an enzymatic assay using L-lactate dehydrogenase. Sample of Li-HPA (20 µL) was introduced in a cuvette containing 20 µL of NADH (10 mg·mL⁻¹), 20 µL of L-lactate dehydrogenase (100 U·mL⁻¹) and 960 µL of TEA buffer 0.1 M, pH 7.5. The disappearance of NADH was followed by spectrophotometry at 340 nm and difference between initial absorbance and final absorbance gave the Li-HPA concentration using the Beer-Lambert law (value ε_{NADH 340} = 6220 M⁻¹·cm⁻¹).

Determination of the TK Temperature, pH and Thermostability Profiles

The optimum temperature for TK activity was examined on the range of 20–75 °C in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) with L-erythrulose and D-ribose-5-phosphate as substrates. The effect of pH on the TK activity was examined using 50 mM MES buffer (pH 5.0–6.5), HEPES buffer (pH 6.5–7.5), and glycyglycine buffer (pH 7.0–9.0). The thermostability was studied at the range 50–65 °C with L-erythrulose and R-5-P as substrates. Enzyme solutions (4.5 mg·mL⁻¹) were incubated at various temperatures in 500 µL tubes for up to 150 h in a sand bath. The residual activities were measured at different times by the standard assay described above.

Determination of TK Kinetic Constants

K_M (mM) v_{\max} ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) and k_{cat} values were determined for L-erythrulose and D-ribose-5-phosphate using the enzyme assay described above. Initial velocities of TK were measured by varying L-erythrulose and D-R-5-P concentrations in the presence of NADH and YADH by spectrophotometry at 340 nm. One unit (U) of TK leads to 1 μmol of glycolaldehyde per minute at pH 7.5 (Glycylglycine buffer 50 mM) and at various temperatures.

Hanes–Wolf plots were used to determine v_{\max} and K_M values. For K_M , the co-substrate was present in excess. All measurements were performed in triplicate.

Synthesis of Ketoses and Analogues Catalyzed by mTK_{gst}

Synthesis of L-erythrulose 1: The synthesis was performed from glycolaldehyde (GA) and hydroxypyruvate lithium salt (Li-HPA). ThDP (66 mg, 140 μmol) and $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (117 mg, 580 μmol) were dissolved in H_2O (29 mL) and the pH adjusted to 7.5 with 0.1 M NaOH. To this stirred solution was added mTK_{gst} (1 mL, 9 mg of TK) and the mixture was stirred for 20 min at 50°C. In another flask, Li-HPA (330 mg, 3 mmol) and glycolaldehyde (180 mg, 3 mmol) were dissolved in H_2O (30 mL) and the pH adjusted to 7.5 with 0.1 M NaOH. Following the 20 min enzyme/cofactor preincubation, the Li-HPA/aldehyde mixture was added to the enzyme solution and the mixture was stirred at 50°C. The pH was maintained at 7.5 by adding 0.1 M HCl using a pH stat (Schott, Titroline alpha). The reaction was monitored by titrating Li-HPA at 340 nm in the presence of L-lactate dehydrogenase (3 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) and NADH (0.4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). After total conversion of Li-HPA (1 h), silica was added and the reaction mixture concentrated to dryness under vacuum then dry loaded onto a flash silica column. After flash liquid chromatography using ethyl acetate:methanol v/v 9:1 as eluent, L-erythrulose was isolated as a yellow oil; yield: 160 mg (44%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +6.3 (c 1.48, H_2O), lit. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +6.3 (c 1.1, H_2O),^[13a] $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +6.7 (c 1.48, H_2O).^[14] NMR spectra were identical to those previously described.^[13a] ^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 4.52 (d, J = 19.3 Hz, 1H, 1- H_A), 4.45 (d, J = 19.3 Hz, 1H, 1- H_B), 4.26 (t, J = 4.2 Hz, 1H, 3-H), 3.80 (dd, J = 11.6, 4.5 Hz, 1H, 4-H), 3.76 (dd, J = 11.6, 4.0 Hz, 1H, 4-H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD): δ = 212.98 (C-2), 77.82 (C-3), 67.75 (C-1), 64.86 (C-4).

Synthesis of D-xylulose 2: ThDP (44 mg, 100 μmol) and $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (78 mg, 380 μmol) were dissolved in H_2O (19 mL) and the pH adjusted to 7.5 with 0.1 M NaOH. To this stirred solution was added mTK_{gst} (1 mL, 9 mg of TK), and the mixture was stirred for 20 min at 50°C. In another flask, Li-HPA (220 mg, 2 mmol) and D-glyceraldehyde (188 mg, 2 mmol) were dissolved in H_2O (20 mL) and the pH adjusted to 7.5 with 0.1 M NaOH. Following the 20 min enzyme/cofactor preincubation, the Li-HPA/aldehyde mixture was added to the enzyme solution and the mixture was stirred at 50°C. The pH was maintained at 7.5 by adding 0.1 M HCl using a pH stat (Schott, Titroline alpha). The reaction was monitored by titrating Li-HPA at 340 nm in the presence of L-lactate dehydrogenase (3 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) and NADH (0.4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). After total conversion of Li-HPA (3 h), proteins were precipitated by adding three volumes of methanol, discarded after centrifugation. Silica was added to the

supernatant and the suspension was concentrated to dryness under vacuum. The residue was dry-loaded onto a flash silica column and purified by flash liquid chromatography using dichloromethane:methanol v/v 9:1 as eluent. The fractions containing the product were combined, concentrated under vacuum, dissolved in 20 mL of water and chromatographed on cation exchange resin (Dowex-50W). The fractions containing the product were combined and their pH was adjusted to 6.5 using anion exchange resin (Dowex Marathon 11). The solution was filtered and concentrated under vacuum to give D-xylulose as a colourless oil; yield: 115 mg (38%); $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: -30.9 (c 2.0, H_2O), lit. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: -30.0 (c 2.4, H_2O).^[29] NMR spectra were identical to those previously described.^[35,36] The β -anomer was the preponderant form over the α -anomer and the keto isomer. ^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ (keto isomer) = 4.55 (d, J = 19.4 Hz, 1H, 1- H_A), 4.43 (d, J = 19.4 Hz, 1H, 1- H_B), 3.98 (m, 1H, 4-H), 3.98 (m, 1H, 3-H), 3.58 (m, 2H, 5-H); δ (α -anomer) = 4.36 (m, 1H, 4-H), 4.21–4.16 (m, 1H, 3-H), 4.14 (m, J = 9.4 Hz, 1H, 5- H_A), 3.79 (dd, J = 9.5, 4.1 Hz, 1H, 5- H_B), 3.59 (m, 2H, 1- H_2); δ (β -anomer) = 4.28 (dd, J = 11.8, 5.6 Hz, 1H, 4-H), 4.09 (dd, J = 9.5, 6.5 Hz, 1H, 5- H_A), 3.95 (d, J = 5.6 Hz, 1H, 3-H), 3.55 (m, 1H, 5- H_B), 3.49 (q, J = 12.1 Hz, 2H, 1- H_2); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O): δ (keto isomer) = 215.70 (C-2), 83.25 (C-3), 74.71 (C-4), 68.79 (C-1), 64.65 (C-5); δ (α -anomer) = 108.49 (C-2), 78.60 (C-3), 78.06 (C-4), 74.71 (C-5), 65.18 (C-1); δ (β -anomer) = 105.70 (C-2), 78.99 (C-3), 77.65 (C-4), 72.60 (C-5), 65.78 (C-1); MS (HR-ESI): m/z = 149.0446, calcd. for $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$: 149.0450.

Synthesis of 1,3-dihydroxyhexan-2-one 3:^[15a] ThDP (28 mg, 2.4 mM) and $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (48 mg, 9.4 mM) were dissolved in H_2O (25 mL, total volume) and the pH adjusted to 7.5 using 0.1 M NaOH. To this stirred solution was added butyraldehyde (90 mg, 50 mm). After adjusting the pH to 7.5, mTK_{gst} (15 mg) and Li-HPA (138 mg, 50 mm) were added and the resulting mixture was stirred at 40°C for 24 h. The pH was maintained at 7.5 throughout by adding 0.1 M HCl using a pH stat. Reactions were monitored by TLC, and after 24 h the reaction mixture was concentrated under vacuum. Purified 1,3-dihydroxyhexan-2-one was obtained as a white powder by flash column chromatography using hexane:ethyl acetate (1:1) as eluent; yield: 72 mg (43%). NMR spectroscopic data were identical to those described previously.^[15a] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 4.48 (d, J = 20.1 Hz, 1H, 1- H_A), 4.42 (d, J = 20.1 Hz, 1H, 1- H_B), 4.32 (dd, J = 8.0, 3.9 Hz, 1H, 3-H), 2.73 (br, 2H, OH), 1.75 (m, 1H, 4-H), 1.61 (m, 1H, 4-H), 1.47 (m, 2H, 5-H), 0.95 (t, J = 7.3 Hz, 3H, 6-H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 211.7 (C-2), 74.6 (C-3), 65.4 (C-1), 36.2 (C-4), 18.0 (C-5), 13.7 (C-6).

Synthesis of 1,3-dibenzoyloxy-hexane-2-one:^[15a] Dibenzoylation of 1,3-dihydroxyhexane-2-one (70 mg, 1 equiv.) was carried out with benzoyl chloride (0.3 mL, 5 equiv.) and triethylamine (0.36 mL, 5 equiv.) in CH_2Cl_2 (5 mL) for 2 h at room temperature. After 2 h the reaction was quenched by adding saturated NaHCO_3 solution (5 mL), and the organic phase was dried and concentrated under vacuum. Purified 1,3-dibenzoyloxyhexane-2-one was obtained by flash silica gel chromatography using hexane:ethyl acetate (1:1) as eluent; yield: 102 mg (56%). Enantiomeric excess of the product was found to be 85%, determined by chiral HPLC. Analysis was performed on a Shi-

madzu instrument equipped with a Chiralcel IB column (Diacel, 250×4.6 mm) using hexane:2-propanol (90:10) as eluent. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.01 (m, 4H, Ar-H), 7.40 (m, 2H, Ar-H), 7.40 (m, 4H, Ar-H), 5.4 (t, *J*=6.3 Hz, 1H, 3-H), 5.1 (d, *J*=17.4 Hz, 1H, 1-H_A), 5.0 (d, *J*=17.4 Hz, 1H, 1-H_B), 1.90 (m, 2H, 4-H), 1.50 (m, 2H, 5-H), 0.93 (t, *J*=7.5 Hz, 3H, 6-H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=200.8 (C-2), 166.03 (C-1'), 165.78 (C-3'), 133.63, 133.43, 130.17, 129.92, 129.87, 129.13, 128.59, 128.45 (Ar-C), 77.11 (C-3), 66.58 (C-1), 32.89 (C-4), 18.43 (C-5), 13.72 (C-6).

Acknowledgements

The authors thank the French National Research Agency (grant ANR-09-BLAN-0424-CSD3 to LH) and Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant Fe244/9-1 to WDF) for financial support under the DeoTK research program, as well as the ESF for support via COST CM0701. DY gratefully acknowledges a PhD scholarship administered by DAAD.

References

- [1] E. Racker, G. de La Haba, I. G. Leder, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 1010.
- [2] a) J. Bolte, C. Demuynck, H. Samaki, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5525–5528; b) Y. Kobori, D. C. Myles, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5899–5907; c) W.-D. Fessner, V. Helaine, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 574–586.
- [3] a) C. Demuynck, J. Bolte, L. Hecquet, V. Dalmas, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5085–5088; b) N. J. Turner, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 527–531.
- [4] D. C. Myles, P. J. Andrusis, G. M. Whitesides, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4835–4838.
- [5] L. Hecquet, J. Bolte, C. Demuynck, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 8223–8232.
- [6] T. Ziegler, A. Straub, F. Effenberger, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 737–738; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 716–717.
- [7] F. Charmantray, P. Dellis, V. Helaine, S. Samreth, L. Hecquet, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 5526–5532.
- [8] a) C. Guerard, V. Alphand, A. Archelas, C. Demuynck, L. Hecquet, R. Furstoss, J. Bolte, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 3399–3402; b) F. T. Zimmermann, A. Schneider, U. Schorken, G. A. Sprenger, W. D. Fessner, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1643–1646; c) O. N. Slovejeva, G. A. Kochetov, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2008**, *54*, 90–92; d) F. Charmantray, V. Helaine, B. Legeret, L. Hecquet, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2009**, *57*, 6–9.
- [9] a) C. U. Ingram, M. Bommer, M. E. B. Smith, P. A. Dalby, J. M. Ward, H. C. Hailes, G. J. Lye, *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *96*, 559–569; b) D. Yi, T. Devamani, J. Abdoul-Zabar, F. Charmantray, V. Helaine, L. Hecquet, W. D. Fessner, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2290–2300.
- [10] C. Wikner, L. Meshalkina, U. Nilsson, M. Nikkola, Y. Lindqvist, M. Sundstrom, G. Schneider, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 32144–32150.
- [11] a) G. A. Sprenger, U. Scörken, G. Sprenger, H. Sahn, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 525–532; b) G. R. Hobbs, R. K. Mitra, R. P. Chauhan, J. M. Woodley, M. D. Lilly, *J. Biotechnol.* **1996**, *45*, 173–179; c) E. G. Hibbert, T. Senussi, S. J. Costelloe, W. L. Lei, M. E. B. Smith, J. M. Ward, H. C. Hailes, P. A. Dalby, *J. Biotechnol.* **2007**, *131*, 425–432; d) S. D. Himmo, M. Thomson, C. J. Gubler, *Prep. Biochem.* **1988**, *18*, 261–276.
- [12] a) G. A. Kochetov, R. A. Usmanov, A. T. Mevkh, *Anal. Biochem.* **1978**, *88*, 296–301; b) L. M. Reimer, D. L. Conley, D. L. Pompliano, J. W. Frost, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 8010–8015; c) S. Bhattacharya, M. Schiavone, J. Gomes, S. K. Bhattacharya, *J. Biotechnol.* **2004**, *111*, 203–217; d) S. Matosevic, G. J. Lye, F. Baganz, *Biotechnol. Prog.* **2010**, *26*, 118–126.
- [13] a) K. Benaissi, V. Hélaine, V. Prevot, C. Forano, L. Hecquet *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 1497–1509; b) B. O'Sullivan, H. Al-Bahrani, J. Lawrence, M. Camposa, A. Cazares, F. Baganz, R. Wohlgemuth, H. C. Hailes, N. Szita, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2012**, *77*, 1–8.
- [14] M. E. B. Smith, E. G. Hibbert, A. B. Jones, P. A. Dalby, H. C. Hailes, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2631–2638.
- [15] a) A. Cázares, J. L. Galman, L. G. Crago, M. E. Smith, J. Strafford, L. Ríos-Solis, G. J. Lye, P. A. Dalby, H. C. Hailes, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1301–1309; b) E. G. Hibbert, T. Senussi, M. E. B. Smith, S. J. Costelloe, J. M. Ward, H. C. Hailes, P. A. Dalby, *J. Biotechnol.* **2008**, *134*, 240–245.
- [16] G. Garg, S. S. Dhiman, R. Mahajan, A. Kaur, J. Sharma, *J. Biotechnol.* **2011**, *1*, 58–64.
- [17] L. Cheng, W. Mu, B. Jiang, *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *8*, 1327–1333.
- [18] S. Ferdjani, M. Ionita, B. Roy, M. Dion, Z. Djeghaba, C. Rabiller, C. Tellier, *Biotechnol. Lett.* **2011**, *3*, 1215–1219.
- [19] W. Cuevas, D. A. Estell, S. H. Hadi, H. Sura, S. K. Lee, S. Ramer, W. A. Shaw, A. R. Topozada, W. Weyler, **2009**, *Int. Patent PCT/US2009/046034*, **2009**.
- [20] a) J. Littlechild, N. Turner, G. Hobbs, M. Lilly, A. Rawas, H. Watson, *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1995**, *51*, 1074–1076; b) G. A. Sprenger, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1216*, 307–310.
- [21] a) M. Sundström, Y. Lindqvist, G. Schneider, U. Hellman, H. Ronne, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24346–24352; b) I. Schaff-Gerstenschlager, G. Mannhauf, I. Vetter, F. K. Zimmermann, H. Feldmann, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *217*, 487–492.
- [22] N. Maltseva, Y. Kim, K. Kwon, A. Joachimiak, W. F. Anderson, *RCSB protein data bank (PDB entries 3H-YL and 3M49, submitted 06/2009 and 04/2010)*.
- [23] L. Hecquet, J. Bolte, C. Demuynck, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, *57*, 2174–2176.
- [24] R. K. Mitra, J. M. Woodley, M. D. Lilly, *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *22*, 64–70.
- [25] a) R. R. F. Jahromi, P. Morris, R. J. Martinez-Torres, P. A. Dalby, *J. Biotechnol.* **2011**, *155*, 209–216; b) A. Kuimov, M. Filippov, G. Kochetov, *Biochem. Int.* **1990**, *21*, 1081–1087.
- [26] A. G. Datta, E. Racker, *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 617–623.
- [27] S. Saitou, T. Ozawa, I. Tomita, *FEBS Lett.* **1974**, *40*, 114–118.

- [28] G. R. Hobbs, M. D. Lilly, N. J. Turner, J. M. Ward, A. J. Willets, J. M. Woodley, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 54, 165–166.
- [29] H. Habe, T. Fukuoka, D. Kitamoto, K. Sakaki, *J. Oleo Sci.* **2009**, 58; 595–600.
- [30] F. Effenberger, V. Null, T. Ziegler *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5157–5160.
- [31] V. Dalmas, C. Demuynck, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, 4, 1169–1172.
- [32] F. Dickens, D. H. Williamson, *Biochem. Prep.* **1962**, 9, 86–90.
- [33] S. F. Altschu, T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 3389–3402.
- [34] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–254.
- [35] C. Demuynck, J. Bolte, L. Hecquet, H. Samaki, *Carbohydr. Res.* **1990**, 206, 79–85.
- [36] Reference spectrum from Biological Magnetic Resonance Data Bank: <http://www.bmrb.wisc.edu/metabolics/>.
-

A pH-Based High-Throughput Assay for Transketolase: Fingerprinting of Substrate Tolerance and Quantitative Kinetics

Dong Yi,^[a] Titu Devamani,^[a] Juliane Abdoul-Zabar,^[b] Franck Charmantray,^[b] Virgil Helaine,^[b] Laurence Hecquet,^[b] and Wolf-Dieter Fessner^{*[a]}

A pH-based high-throughput assay method has been developed for the rapid and reliable measurement of transketolase (TK) activity. The method is based on the decarboxylation of lithium hydroxypyruvate (HPA) as a hydroxyacetyl donor with an aldehyde acceptor, using phenol red as the pH indicator. Upon release of carbon dioxide from HPA, the pH increase in the reaction mixture can be determined photometrically by the color change of the pH indicator. At low buffer concentration (2 mM triethanolamine, pH 7.5), the method is highly sensitive and allows continuous monitoring, for quantitative determination of the kinetic parameters. By using this method, the substrate specificities of the TK enzymes from *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, as well as two active-site-modi-

fied variants of the *E. coli* TK (D469E, H26Y) were evaluated against a panel of substrate analogues; specific activities and kinetic constants could be rapidly determined. Substrate quality indicated by assay determination was substantiated with novel TK applications by using achiral 3-hydroxypropanal and 4-hydroxybutanal for preparative synthesis of chiral deoxyketose-type products. Determination of *ee* for the latter could be performed by chiral GC analysis, with an unambiguous correlation of the absolute configuration from rotation data. This pH-based assay method is broadly applicable and allows rapid, sensitive, and reliable screening of the substrate tolerance of known TK enzymes and variants obtained from directed evolu-

Introduction

Transketolase (TK, EC 2.2.1.1) is an essential enzyme in the carbohydrate metabolism of all organisms.^[1] It is involved in the pentose phosphate pathway, where it reversibly transfers a terminal two-carbon hydroxyacetyl unit from a donor ketose phosphate to an acceptor aldose phosphate.^[2] The enzyme shows remarkably broad substrate specificity, in that any length of sugar phosphate chain (from a two- to nine-carbons) can be accommodated. TK catalysis is mediated by thiamine diphosphate (TPP) and divalent magnesium (Mg^{2+}) as cofactors.^[3] TK has important potential for applications in asymmetric synthesis,^[4,5] because it is stereospecific for the cleavage and formation of a *D-threo* vicinal diol unit. From these two adjacent centers of chirality, the one at C3 with absolute *S* configuration is created with the carboligation step, whereas the one at C4 with *R* configuration is most efficiently determined by kinetic resolution of 2-hydroxylated aldehyde acceptors.^[6,7] When using hydroxypyruvate (HPA) as the donor, the release of CO_2 renders the ketol transfer irreversible.^[8] Microbial TK biocatalysts, particularly those from *Saccharomyces cerevisiae*^[6,9] and *Escherichia coli*,^[10] have been shown to accept a wide range of phosphorylated and nonphosphorylated acceptor aldehydes for stereoselective formation of *D-threo* (3*S*,4*R*)-ketose products.

The development of new, and the improvement of known, enzymes is essential for making progress in biocatalysis. Mapping of an enzyme's substrate tolerance,^[11,12] also called "activity fingerprinting",^[13] is a valuable technique to characterize the scope of synthetic applications. Also, the determination of pro-

tein crystal structures and identification of catalytic sites of TK from *E. coli* (TK_{eco})^[14] and from *S. cerevisiae* (TK_{yst})^[15] among several others,^[16] has paved the way for protein engineering efforts to expand the substrate range of TK.^[17–20] Indeed, the D469E variant of the TK_{eco} was recently shown to have eightfold activity relative to the wild-type enzyme, and twofold-improved stereoselectivity with propanal as an acceptor substrate, whereas the H26Y variant had fourfold improved activity for the same reaction but with high stereoselectivity for an inverted (3*R*)-configuration.^[19] For such endeavors—evaluating single enzymes against libraries of substrates, or libraries of enzyme variants against a single substrate—generic methods for high-throughput screening in microtiter plate format are required; these must be rapid, sensitive, reliable, and widely applicable.

The conventional method for measuring TK activity uses *D*-ribose 5-phosphate and *D*-xylulose 5-phosphate,^[21] because of

[a] D. Yi, Dr. T. Devamani, Prof. Dr. W.-D. Fessner
Institut für Organische Chemie und Biochemie
Technische Universität Darmstadt
Petersenstrasse 22, 64287 Darmstadt (Germany)
E-mail: fessner@tu-darmstadt.de

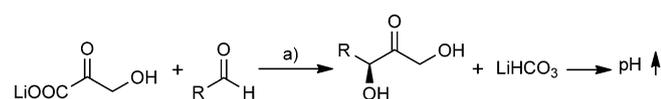
[b] J. Abdoul-Zabar, Dr. F. Charmantray, Dr. V. Helaine, Prof. Dr. L. Hecquet
Clermont Université, Université Blaise Pascal
Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, UMR CNRS 6296
B.P. 10448, 63177 Aubière (France)

 Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201200364>.

their superior substrate qualities as acceptor and donor, respectively, and the reaction is followed spectrophotometrically by monitoring the amount of NADH consumed by auxiliary-enzyme-catalyzed reactions.^[22] Similar multienzyme assays that use alternative acceptor or donor substrates of transketolase have been reported.^[23] An umbelliferone-based sensitive fluorogenic assay has been devised to determine TK activity and stereoselectivity.^[24] Although operated in a continuous mode, like the standard method, none of these highly substrate-specific methods is adaptable to probe the kinetics of TK for non-natural substrate analogues.

Several assay formats have been developed to probe the substrate tolerance of TK by direct measurement of remaining substrate or formed product. Measurement of chiral product formation by optical activity^[25] or ellipsometry^[26] is highly dependent on substrate structure and thus not of generic utility. Determination of HPA depletion by near-UV spectroscopic monitoring,^[27] enzymatic assay,^[28] or HPLC analysis^[29] is hampered by low sensitivity or low throughput. Colorimetric determination of ketose formation by heterocyclic condensation reactions is limited by low specificity,^[30] whereas tetrazolium-red-based oxidation is restricted to non-hydroxylated aldehyde acceptors, such as those used for modified propanal tolerance,^[31] in addition, the latter two methods require multiple reagent handling steps and are thus time consuming and laborious. A major disadvantage of all methods that involve substrate/product determination is, however, that they are discontinuous and do not allow direct measurement of enzyme kinetics, which is not only tedious but also a significant source of experimental error.

In the TK catalytic reaction with HPA as the donor, one equivalent of bicarbonate is produced upon each HPA decarboxylation and ketol transfer cycle by TK, which causes the pH



Scheme 1. Principle of the pH-based assay method for TK activity determination. a) transketolase, Mg^{2+} , TPP.

value of the reaction system to rise (Scheme 1). Direct monitoring of pH changes by a pH indicator is highly convenient and independent of the structure of the acceptor substrate. This assay principle has been successfully developed to monitor enzymatic reactions that involve various types of ester hydrolysis,^[11,32] phosphoryl transfer,^[33] nucleotidyl transfer,^[34] and glycosyltransfer,^[35,35] as well as decarboxylation reactions.^[37] The advantages of pH-based assay methods are obvious: pH indicators are inexpensive; no auxiliary enzymes are necessary; initial reaction rates can be monitored in real-time; and the reactions should be easily adaptable to high-throughput mode in microtiter plate format. Indeed, based on this principle, Hübner et al. have reported a pH-based assay method for TK by using *p*-nitrophenol as the pH indicator,^[38] but the low sensitivity of the latter (light yellow color development) makes

this method ineffective for kinetic determinations of low enzyme activities that are typical for non-natural acceptor substrates.

Here, we report the development of a new continuous pH-based assay method for high-throughput screening of TK, based on HPA as the donor and phenol red as a sensitive pH indicator; the assay is generic and can be used for the reliable colorimetric determination of specific enzyme activity and measurement of kinetic constants. This method is particularly suitable for mapping substrate tolerances of TKs from different sources, with a broad variety of natural and non-natural, α -hydroxylated and nonhydroxylated, nonphosphorylated acceptor substrates. The results obtained from kinetic measurements were verified by exemplary preparative synthesis and characterization of the corresponding chiral products. Because of its simplicity, the method should also prove valuable for the quantitative screening of mutant TK libraries, as is required in the directed evolution of novel enzyme properties.

Results and Discussion

Assay method development

Protons released or consumed in an enzymatic reaction can be detected through color change of a suitable pH indicator. An assay based on colorimetric determination of this type is a direct measure of the enzyme of interest, thus allowing measurements that are rapid, qualitative, and, under suitably controlled conditions, also quantitative.^[39] The TK-catalyzed decarboxylation of HPA produces one equivalent of the corresponding bicarbonate salt per catalytic cycle. In the TK reaction (Figure 1), HPA is a medium-strength acid with $pK_a < 2$, where-

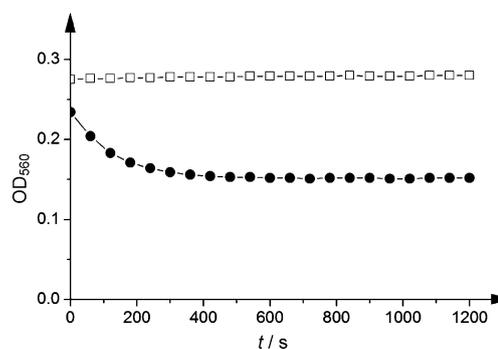


Figure 1. Observation of pH changes from chemical background reactivity of amine buffers. \square 2 mM TEA (pH 7.5), \bullet 2 mM Tris-HCl (pH 7.5). Samples contained 0.028 mM phenol red and 50 mM glycolaldehyde in 200 μ L of 2 mM amine-HCl buffer starting at pH 7.5. Absorbance was measured at 560 nm by a plate reader.

as the aldehyde acceptor and the chiral hydroxyketone produced are both neutral. At the optimum pH of the TK reaction (\sim pH 7.5),^[2] none will affect the pH of reaction system. However, the bicarbonate ion is the dissociated form of carbonic acid, which by its effective first pK_a (pK_{a1}) of 6.33 (owing to its unfavorable dehydration equilibrium), is actually a significantly



Scheme 2. Dynamic dissociation equilibrium of bicarbonate in water.

weaker acid than HPA ($pK_{a2} = 10.22$).^[40] Bicarbonate is amphoteric and involved in dynamic dissociation equilibria in water (Scheme 2), and its solutions react as alkaline due to the partial formation of hydroxide. Therefore, the pH of the TK reaction system rises upon conversion of HPA. This pH change is revealed as a color change by a pH indicator, and the stoichiometric formation of bicarbonate can be determined photometrically for absolute quantification.

To ensure maximum sensitivity and fidelity of a pH-dependent enzyme assay, the color change interval of the indicator needs to be around the optimum pH of the biocatalysis reaction. For our study, we chose phenol red as the pH indicator because of its high absorption coefficient ($\epsilon = 56\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 557 nm),^[33] and because its pK_a (7.4) and applicable pH range (pH 6.8–8.2) coincide with the appropriate pH optimum for TK catalysis (~pH 7.5, depending on the source of TK).^[2] When exposed to alkali, phenol red changes from yellow to bright red, and thus can be easily observed by the human eye, with sensitivity higher by at least one order of magnitude when compared to *p*-nitrophenol. The highest sensitivity occurs at low buffer concentrations and high indicator concentrations; in unbuffered solution the background absorbance level changes too readily with small experimental variations. For our study, a buffer concentration as low as 2 mM was found to be satisfactory, and phenol red at 10 mg L⁻¹ (0.028 mM) was optimal for signal intensity; at least up to this concentration no inhibition of TK activity was notable by the presence of phenol red.

For the choice of buffer, its pK_a and the pK_a of the indicator dye should be as similar as possible to ensure that the color change is proportional to the number of produced protons.^[37] TK activity is usually determined in Tris ($pK_a = 8.06$) or Gly-Gly ($pK_{a2} = 8.25$) buffer solutions.^[41] However, upon testing with Tris buffer we consistently noted an initial absorbance decrease of the assay solution before addition of HPA to start the reaction, and that this continued for several minutes before reaching a steady absorption level (Figure 1). This decrease, which indicates a slight acidification of the solution, was only observed when the assay mixture contained Tris buffer plus any one of the aldehyde or HPA components. Apparently, the primary amine group of Tris slowly reacts with electrophilic carbonyl compounds (aldehyde and HPA) to form covalent products such as carbinolamine, imine, or oxazolidine,^[42] which, due to their lower basicity, leads to a release of protons. As Tris buffer proved unsuitable for this assay, we switched to triethanolamine (TEA), which has a similar pK_a (7.8) but lacks a reactive primary amino group. Indeed, TEA buffer produced a stable absorption signal for the assay system with no detectable pH variation from chemical reactivity, and therefore was chosen for further development. Although certain tertiary amines have been shown to catalyze decomposition of HPA (reminiscent of the TK reaction at elevated temperature),^[43] no reaction occurred with TEA under moderate conditions.

The relationship between the quantity of HCO_3^- produced upon HPA conversion and the absorbance of indicator was determined by titration of the entire TK assay mixture with NaHCO_3 , that is, with all potentially buffering elements included, but omitting the aldehyde substrate to exclude catalytic turnover. A calibration curve (Figure 2A) was plotted at 560 nm for HCO_3^- concentrations between 0.0 and 0.8 mM, to mimic the low degree of HPA conversion by TK under initial-rate conditions. This standard curve, which shows good linearity over the entire range, was used to calculate the increase in HCO_3^- concentration during the catalytic reaction. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values derived from the linear regression curve^[44] were 0.04 and 0.11 mM HCO_3^- , respectively.

A practical test of the assay was performed by using TK_{ySt} as catalyst with some nonphosphorylated hydroxyaldehydes that had been reported to span a wider kinetic range of activity, such as D-glyceraldehyde, D-erythrose, and D-ribose.^[6,9,41] Resultant time curves for absorption changes (Figure 2B) clearly demonstrate a steady signal development and distinct activity within the acceptor series that correlates with known substrate quality (as determined by conventional assays).

For a quantitative interpretation, time curves of absorbance data with D-glyceraldehyde as acceptor (Figure 2C) were converted into absolute concentrations of HCO_3^- according to the calibration curve. By assuming initial-rate conditions, the slope of the resultant curve was used for calculating the specific activity of TK_{ySt} according to Equation (1). Thus, 1 U is defined as the amount of enzyme required to produce 1 μmol of HCO_3^- from HPA per minute, under the assay conditions.

$$\text{Specific activity [U mg}^{-1}] = \frac{\text{slope} \times 10^3 [\mu\text{M s}^{-1}] \times 60 [\text{s}] \times 200 \times 10^{-6} [\text{L}]}{\text{amount of TK [mg]}} \quad (1)$$

Varying the amount of TK_{ySt} catalyst confirmed a linear relationship between activity and amount of enzyme (Figure 2D), which demonstrates that this method can be used for quantitative determination of the absolute and relative specific activities of different TK enzymes. The observed LOD and LOQ values^[44] were 2.5 and 7.5 mU, respectively.

Determination of kinetic constants

In order to evaluate the data quality resulting from the pH-dependent assay format, we attempted to determine quantitative substrate kinetics for TK_{eco} and TK_{ySt} for a comparison against published data available from conventional assay measurements. In addition to the HPA donor, we included known good acceptor substrates such as glycolaldehyde, D-glyceraldehyde, and D-erythrose, but omitted D-ribose because of its apparent K_M ($> 1 \text{ M}$).^[41] The kinetic constants were determined by varying the concentration of the individual substrate (LiHPA or aldehyde) while keeping all other parameters constant (Table 1). For HPA the K_M value of 5.5 mM determined with TK_{eco} is almost identical to the recently published value of 5.3 mM for the same acceptor component by an HPLC method,^[17] but is

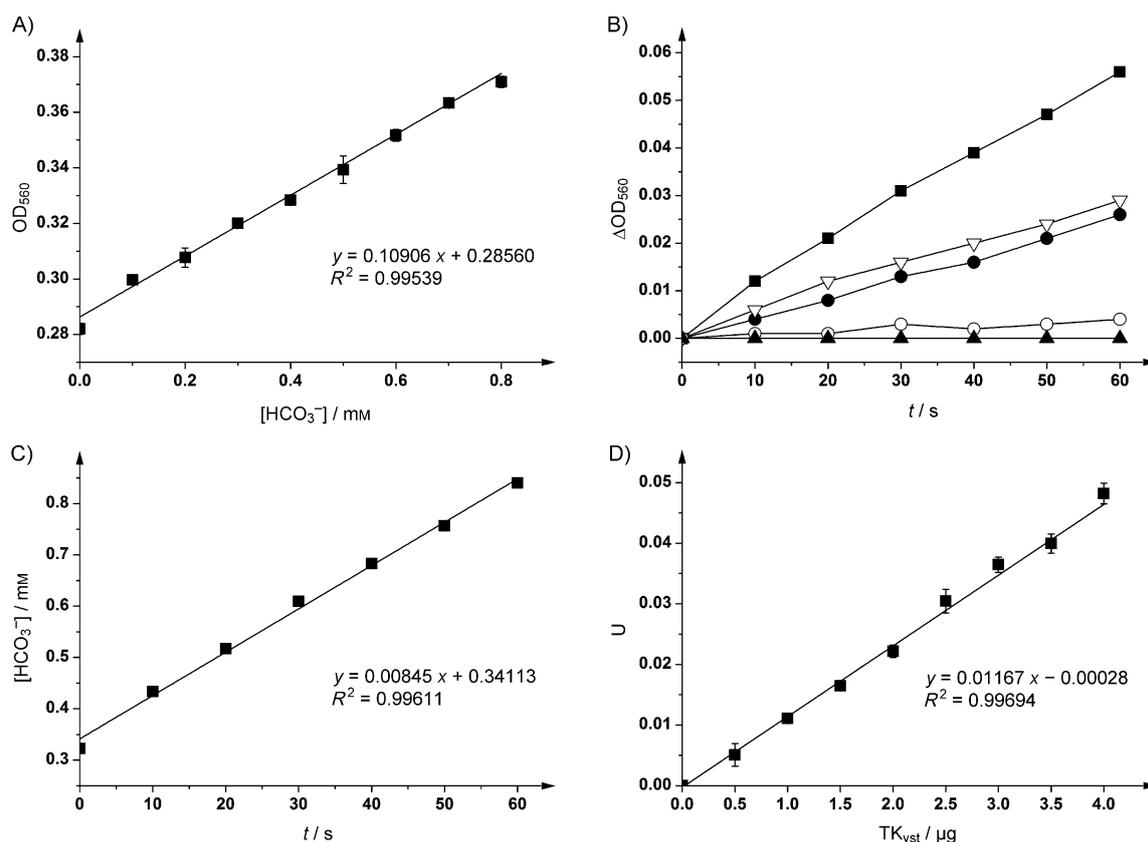


Figure 2. Development of the assay method. Samples contained 0.028 mM phenol red, 2.4 mM TPP, and 9 mM MgCl_2 in 200 μL of 2 mM TEA buffer (pH 7.5) as well as enzyme and acceptor as specified. After addition of 50 mM LiHPA, absorbance was measured at 560 nm using a plate reader. A) Standard curve; reaction mixtures contained 12 μg TK_{yst} and varying amounts of NaHCO_3 (0–0.8 mM). B) Time curve of absorbance change using different acceptor substrates. Assay solutions contained 12 μg TK_{yst} and various aldehydes; ■ 50 mM D-glyceraldehyde, ● 50 mM D,L-glyceraldehyde, ▽ 50 mM D-erythrose, ○ 200 mM D-ribose (32 μg TK_{yst}); ▲ control without enzyme. C) Time curve for absolute data. Absorbance data from B) for 50 mM D-glyceraldehyde was converted into equivalent HCO_3^- concentration according to the calibration curve. The slope of the resultant curve was used for calculating specific activity. D) Dependence of rate on amount of enzyme; reaction mixtures contained 50 mM D-glyceraldehyde and varying amounts of TK_{yst} (0–4 μg).

Table 1. Determination of kinetic constants for different TK enzymes.

	TK_{yst}			TK_{eco}			$\text{TK}_{\text{eco}}^{\text{D469E}}$		
	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$]	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$]	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$]
LiHPA	3.4 ± 0.3	28 ± 1	8.3 ± 0.2	5.5 ± 0.5	33 ± 1	6.0 ± 0.2	1.3 ± 0.2	9.2 ± 0.2	6.9 ± 0.3
glycolaldehyde	21 ± 2	29 ± 2	1.4 ± 0.1	13 ± 2	34 ± 2	2.6 ± 0.2	43 ± 3	16 ± 1	0.37 ± 0.01
D-glyceraldehyde	40 ± 2	24 ± 1	0.61 ± 0.02	48 ± 4	32 ± 1	0.67 ± 0.03	152 ± 16	7.9 ± 0.6	0.052 ± 0.005
D,L-glyceraldehyde	45 ± 4	11 ± 1	0.24 ± 0.01	57 ± 6	11 ± 1	0.20 ± 0.01	114 ± 14	2.3 ± 0.2	0.020 ± 0.002
D-erythrose	214 ± 17	39 ± 2	0.18 ± 0.01	194 ± 33	38 ± 4	0.20 ± 0.03	230 ± 35	2.3 ± 0.2	0.010 ± 0.001

at variance with a value of 18 mM determined photometrically by using a phosphorylated acceptor component.^[41] The K_M of 3.4 mM with TK_{yst} is somewhat lower than the 7 mM measured with a phosphorylated acceptor.^[45] Regarding the acceptor components, the glycolaldehyde K_M value of 13.4 mM with TK_{eco} exactly matches the published value (13.4 mM), whereas those for D,L-glyceraldehyde and D-erythrose are somewhat higher (57.3 vs. 10 mM, and 194 vs. 150 mM, respectively). Taking into account that most of the published data resulted from conventional assays with phosphorylated donor and acceptor components in coupled-enzyme systems, we believe that our pH-based method yields data that are sufficiently reli-

able for direct comparison, yet are easier and more rapidly determined. The results summarized in Table 1 demonstrate that overall catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) of the wild-type TK enzymes decreased about one order of magnitude upon increasing the acceptor chain length from C2 to C4 (glycolaldehyde to D-erythrose). In particular, for glycolaldehyde, TK_{eco} showed significantly higher affinity and rate than TK_{yst} but otherwise it appears that the kinetic values for TK_{eco} and TK_{yst} are rather similar, for D-glyceraldehyde, D,L-glyceraldehyde, and D-erythrose.

Recently, Smith et al. found that active-site substitution D469E in TK_{eco} caused eightfold higher activity towards the nonhydroxylated substrate analogue propanal, with twofold

improved stereoselectivity, whereas variant H26Y produced the enantiomeric product because of a reversal in the aldehyde attack.^[19] For a broader kinetic comparison, we reconstructed and purified these two enzyme variants, TK_{eco}^{D469E} and TK_{eco}^{H26Y}, for inclusion in the comparison with wild-type activity. According to our kinetic analysis, the K_M value of the TK_{eco}^{D469E} variant for HPA (1.3 mM) is lower than that of its parent wild-type, but as k_{cat} is also much reduced the overall efficiency for the donor substrate conversion remains practically unchanged. However, its K_M values for glycolaldehyde, D-glyceraldehyde, D,L-glyceraldehyde and D-erythrose are higher than those of wild-type TK_{eco} (by a factor of about 2–3), and the k_{cat} values are lower (by a factor of 0.5–0.1), thereby resulting in an overall reduction in catalytic efficiency to 5–14% of the parent, which indicates that the enzyme variant has lost much of its catalytic capacity towards 2-hydroxyaldehydes as compared to its parent. Surprisingly, however, the TK_{eco}^{H26Y} variant showed much lower activity than wild-type against the entire panel of substrates, quite in contrast to the reported fourfold higher activity for propanal relative to wild-type TK_{eco}.^[19] DNA sequencing proved our genetic construct to be correct, which excludes the possibility that undesired amino acid exchanges had been introduced at any other locations in the TK protein sequence. Currently, we are unable to present a conclusive explanation as to the discrepancy between our kinetic studies and the reported assay results for the same TK enzyme variant. We note, however, that the reported higher activity of the TK_{eco}^{H26Y} variant is all the more surprising in light of the inability of the authors to identify this mutant protein as a positive hit during earlier screenings of libraries that had been made by site-specific saturation mutagenesis.^[18] Because of the low specific activity of this variant, kinetic values determined for most of the substrates were found to be rather low, with large experimental variation, and thus had to be omitted from the subsequent comparison with other TK enzymes.

Determination of acceptor specificities

Several authors have contributed to the body of data on substrate specificity of TK enzymes from different sources, and particularly the specific activities of wild type TK_{eco}^[41] and TK_{yst}^[45] towards various phosphorylated and unphosphorylated aldoses and aldehydes have been reported. Unfortunately, most data were obtained under very different reaction conditions and by using different assay methods, and therefore an absolute comparison is difficult or impossible. Thus, we have used our new pH-based assay method in an attempt to determine the catalytic capacities of TK_{yst}, TK_{eco} and variants TK_{eco}^{D469E} and TK_{eco}^{H26Y} in parallel, for direct comparisons under identical reaction conditions with various acceptor aldehydes. In particular, it was of interest to explore the substrate scope and stereoselectivity of the two enzyme variants, as these had previously been investigated only against generic aliphatic substrates.^[19]

The four different TK catalysts were tested against a larger variety of aldehydes as substrate analogues. The substrate library included aldehydes with chain lengths from C₁ to C₆, with varying degree of hydroxylation. Among the 2-hydroxyal-

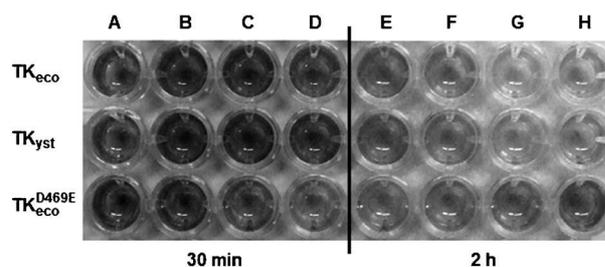


Figure 3. Reaction plates for TK assay. The assay solution contained 50 mM or 200 mM acceptor aldehyde, 4, 12, or 20 μ g TK, 2.4 mM TPP, 9 mM MgCl₂, and 0.028 mM phenol red in 2 mM TEA buffer (pH 7.5). The reaction started after adding 50 mM LiHPA; total assay volume was 200 μ L. Photographs were taken 30 min (left; good substrates) and 2 h (right; weak substrates) after reaction start. A) 50 mM methanal, B) 50 mM glycolaldehyde, C) 50 mM D-glyceraldehyde, D) 50 mM D,L-glyceraldehyde, E) 50 mM D,L-2,4-dihydroxybutanal, F) 200 mM D-glucose, G) 200 mM propanal, H) 200 mM ethanal.

ed aldehydes, preference was given to those compounds bearing a (2*R*)-configuration, to match the natural TK specificity. A test plate for a typical subset of experiments (Figure 3, see the Supporting Information for a color version) clearly demonstrates the broad range of color intensity that developed during the reactions in individual wells (different acceptor substrates and TK catalysts). For good substrates, the bright red color indicated practically complete reaction in less than 30 min; weak substrates required monitoring for longer time, for example, up to a few hours, or the use of a larger amount of enzyme. The specific activity data corresponding to the quantitative evaluation for the entire substrate library is shown in Figure 4.

From a quantitative comparison of the specific data, it became apparent that the catalytic capabilities of wild-type TK_{eco} and TK_{yst} are quite similar, with only very little variation (Table 2). Both enzymes show the highest rates for glycolaldehyde, followed by D-glyceraldehyde; but TK_{eco} shows about 20–40% higher activity than TK_{yst}. Aldehydes with shorter (methanal) or longer carbon backbones (equal or larger than tetroses) caused a parallel decrease in rates with both catalysts. Common sugars (pentoses, hexoses) yielded only low specific activities, even at higher substrate concentration (200 instead of 50 mM); this is likely attributable to the minimal prevalence in solution of free aldehyde forms (the true enzyme substrate).

Wild-type TK enzymes have a strong preference for α -hydroxylated acceptors with strict stereoselectivity towards the (2*R*)-configuration, as is clearly revealed by the results for D-glyceraldehyde versus racemic substrate. When using D,L-glyceraldehyde as an acceptor (at the identical 50 mM), both TK_{eco} and TK_{yst} showed reduced activity: lower than 50% compared to pure D-glyceraldehyde. Notwithstanding the lower concentration of the reactive D-enantiomer, this result might illustrate that the L-configured isomer acts as an inhibitor of TK. On the other hand, stereoselectivity of TK_{eco} and TK_{yst} towards the hydroxyl configuration at the C3/C4 positions was much less distinct than at C2, as evidenced by the relatively similar rates for D-erythrose versus L-threose, and by the relatively small variation in rate within the pentoses series (D-ribose, L-lyxose,

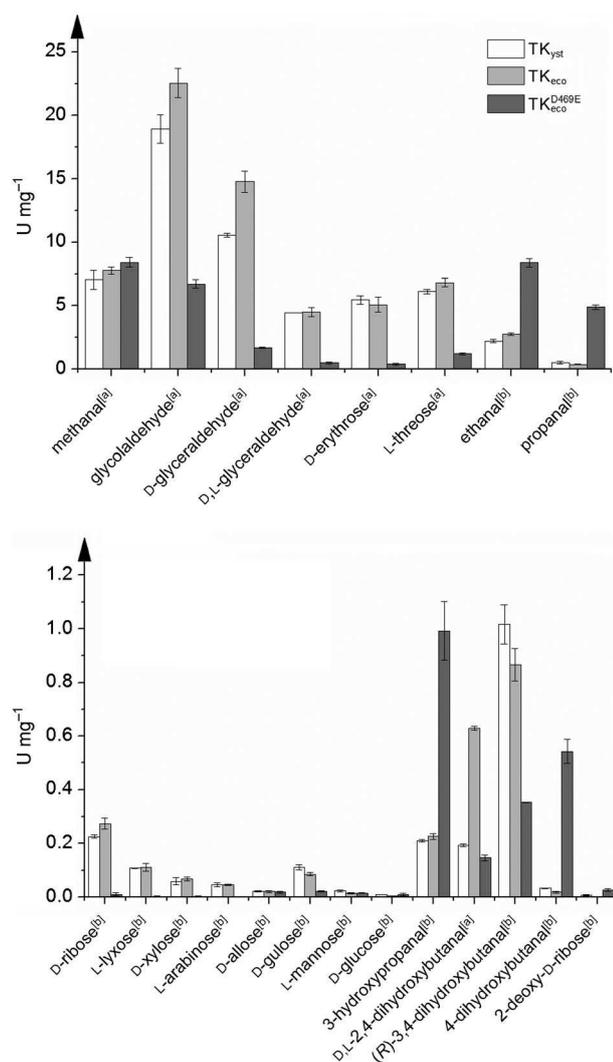


Figure 4. Determination of TK acceptor specificity. The assay solution contained [a] 50 or [b] 200 mM acceptor, 4, 12, or 32 μg TK, 2.4 mM TPP, 9 mM MgCl_2 , 0.028 mM phenol red and 2 mM TEA (pH 7.5). The reaction started after the addition of 50 mM LiHPA; total assay volume was 200 μL . The OD increase was measured at 560 nm by a plate reader.

D-xylose, and L-arabinose). Deletion of acceptor hydroxylation caused a strong drop in activity for both TK_{eco} and TK_{yst} enzymes; relative to glycolaldehyde, the aliphatic structural analogues ethanal (2-hydroxyl deletion) and propanal (replacement of 2-OH for methyl) reacted more slowly (12 and 3%, respectively; even at fourfold concentration). The loss in activity from 2-deoxygenation could not be recovered by hydroxylation at more distant positions, such as in 3-hydroxypropanal, (R)-3,4-dihydroxybutanal, 4-hydroxybutanal, or 2-deoxy-D-ribose: all showed rather low activity with wild-type TK enzymes.

For variant $\text{TK}_{\text{eco}}^{\text{D469E}}$, previously observed to accept propanal with eightfold higher activity than wild-type TK,^[19] we found that it also consistently showed significantly higher activity towards other 2-deoxygenated aldehydes (ethanal, propanal, 3-hydroxypropanal, and 4-hydroxybutanal) than the corresponding wild-type enzyme. Although the variant also accepts 2-

Table 2. Determination of TK acceptor specificity.

Acceptor	Conc. [mM]	TK_{yst} [U mg^{-1}]	TK_{eco} [U mg^{-1}]	$\text{TK}_{\text{eco}}^{\text{D469E}}$ [U mg^{-1}]
methanal	50	7.1 ± 0.8	7.8 ± 0.3	8.4 ± 0.4
glycolaldehyde	50	19 ± 1	23 ± 1	6.7 ± 0.3
ethanal	200	2.2 ± 0.1	2.8 ± 0.1	8.4 ± 0.3
D-glyceraldehyde	50	11 ± 1	15 ± 1	1.7 ± 0.1
D,L-glyceraldehyde	50	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.4	0.50 ± 0.08
3-hydroxypropanal	200	0.21 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.99 ± 0.11
propanal	200	0.50 ± 0.09	0.37 ± 0.02	4.9 ± 0.2
D-erythrose	50	5.5 ± 0.3	5.1 ± 0.6	0.39 ± 0.08
L-threose	50	6.1 ± 0.2	6.8 ± 0.3	1.2 ± 0.1
D,L-2,4-dihydroxybutanal	50	0.19 ± 0.01	0.63 ± 0.01	0.15 ± 0.01
(R)-3,4-dihydroxybutanal	200	1.0 ± 0.1	0.87 ± 0.06	0.35 ± 0.01
4-hydroxybutanal	200	0.034 ± 0.001	0.019 ± 0.004	0.54 ± 0.05
D-ribose	200	0.23 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.011 ± 0.006
L-lyxose	200	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	n.d.
D-xylose	200	0.060 ± 0.013	0.068 ± 0.008	n.d.
L-arabinose	200	0.045 ± 0.007	0.046 ± 0.002	n.d.
2-deoxy-D-ribose	200	0.007 ± 0.002	n.d.	0.027 ± 0.004
D-allose	200	0.022 ± 0.003	0.021 ± 0.003	0.019 ± 0.005
D-gulose	200	0.11 ± 0.01	0.086 ± 0.006	0.022 ± 0.003
L-mannose	200	0.023 ± 0.003	0.015 ± 0.002	0.015 ± 0.001
D-glucose	200	0.009 ± 0.0003	0.005 ± 0.001	0.011 ± 0.006

n.d. = not detectable.

deoxy-D-ribose better than D-ribose, interestingly, it showed lower activity towards (R)-3,4-dihydroxybutanal and all aldehydes with 2-hydroxylation, which indicates its relatively narrow substrate spectrum. Unfortunately, the unexpectedly low specific activity of $\text{TK}_{\text{eco}}^{\text{H26Y}}$ rendered a direct comparison with this variant impossible.

The new assay format has allowed rapid recording of quantitative multisubstrate activity profiles for the closely related TK_{yst} , TK_{eco} and $\text{TK}_{\text{eco}}^{\text{D469E}}$ variants. For better visualization of their substrate scope, the relative specific activity data were processed to gray scale values according to the Raymond method,^[13] to draw a functional fingerprint map of the three enzyme variants for a graphical representation (Figure 5). The specific activity of TK_{eco} with 50 mM glycolaldehyde was used as reference value (100%). The resulting map indeed readily illustrates the similarities and differences between the enzymes' relative substrate specificities. Thus, it clearly indicates the high catalytic conformity of the wild-type TK enzymes, although variant $\text{TK}_{\text{eco}}^{\text{D469E}}$ acts rather differently. This feature is remarkable as TK_{yst} shows only 42.2% amino acid identity with TK_{eco} , whereas variant $\text{TK}_{\text{eco}}^{\text{D469E}}$ is 99.8% identical to TK_{eco} (the exception is the single amino acid substitution). The fingerprint also clearly reveals that, beyond the functional similarity, TK_{eco} displays somewhat higher activities than TK_{yst} towards glycolaldehyde and D-glyceraldehyde, whereas $\text{TK}_{\text{eco}}^{\text{D469E}}$ should be the preferred catalyst towards methanal and, in particular, 2-deoxygenated aldehydes (ethanal, propanal, 3-hydroxypropanal, and 4-hydroxybutanal).



Figure 5. Fingerprint comparison for TK_{yst}, TK_{eco}, and TK^{D469E}_{eco}. The relative specific activity data was converted to gray-scale values.^[22] The specific activity of TK_{eco} with 50 mM glycolaldehyde was used as the reference (100%). A) 50 mM methanal, B) 50 mM glycolaldehyde, C) 50 mM D-glyceraldehyde, D) 50 mM D,L-glyceraldehyde, E) 50 mM D-erythrose, F) 50 mM L-threose, G) 50 mM D,L-2,4-dihydroxybutanal, H) 200 mM D-ribose, I) 200 mM ethanal, J) 200 mM 3-hydroxypropanal, K) 200 mM propanal, L) 200 mM (R)-3,4-dihydroxybutanal, M) 200 mM 4-hydroxybutanal.

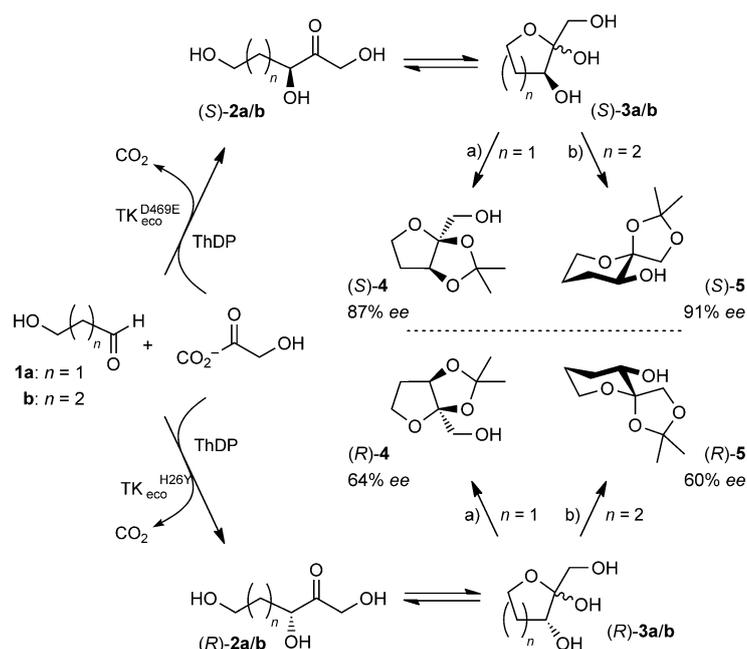
Although the number of substrates included in the fingerprint analysis (considering factors such as chain length, hydroxylation pattern, and chirality) and the number of enzymes available in this study are rather limited, it appears that this approach should prove a valuable tool to discriminate TK enzyme variants that might become available from various other sources or from experiments in directed evolution. In this first attempt, we have only considered the influence of chirality inherent to the substrate; however, we note that the level of chiral induction at C3 in the product might further be indicated by color coding for *R* or *S* configuration^[13] once this is determined.

Verification by preparative synthesis

Charting substrate tolerance of enzymes used for carboligation is usually performed in direction of synthesis, and the disappearance of substrate(s) is used as an indicator. For TK reactions, most often the disappearance of HPA has been monitored, and thus many putative products have been described on the basis of indirect evidence only, or have been characterized without rigorous determination of stereochemical purity (enantiomeric, diastereomeric). Although our pH-based method actually requires catalytic turnover of substrates for the consumption of protons (as direct evidence of product formation), issues of product stereoconfiguration remain, particularly when dealing with substrates that lack a 2-hydroxylation site for correct positioning of the electrophile, and with enzyme variants that are selected for non-natural activities. Therefore, we have scaled up a few exemplary reactions to gain better insight into the fidelity of the TK carboligation process.

Specifically, substrates functionalized with hydroxyl groups at positions beyond C2 are interesting, because the corresponding products are able to form stable cyclic isomers, which should preserve the level of chirality induced during the carboligation step. Otherwise, chiral centers next to free carbonyl groups are notoriously unstable and might lead to ambiguous results upon *ee* or *de* determination. As an additional benefit, hydroxylated substrates are highly water soluble and

nonvolatile. Therefore we selected 3-hydroxypropanal (**1 a**) and 4-hydroxybutanal (**1 b**) as substrates to evaluate the enantioselectivity of all three TK catalysts from *E. coli*. For this part of the study, the variant TK^{H26Y}_{eco} was included, but this required a larger amount of catalyst because of its significantly lower activity. According to NMR analysis, the resulting deoxyketose-type products **2 a/b** (Scheme 3) in aqueous solution indeed were found to form cyclic isomers **3 a/b** in equilibrium with their open-chain isomers. For structural analysis and determination of enantiomeric purity, the products were converted to the corresponding acetal-protected derivatives **4/5**. Remarkably, the pyranoid structures **3 b** exclusively provided the 1,2-protected *spiro*-acetals **5** as the thermodynamically most



Scheme 3. Preparative-scale application of TK catalysts using β/γ -hydroxylated aldehydes, and product derivatization for determination of enantioselectivity of carboligation by chiral GC analysis. Reaction conditions: a) propanone, TsOH; b) 2,2-dimethoxypropane, TsOH. ThDP = thiamine diphosphate.

stable α -anomeric form, whereas furanoid product **3 a** yielded the 2,3-protected fused acetal **4** upon slightly extended reaction times. Acetals **4/5** were easily analyzed by GC analysis on chiral stationary phase for *ee* determination. The enantiomeric excess of products (Table 3) isolated from TK^{D469E}_{eco} (87/91% *ee*) was found to be higher than that from wild-type (64/85% *ee*), whereas in the case of TK^{H26Y}_{eco}, products showed inverse absolute configuration although at a somewhat lower level of enantioselectivity (60/64% *ee*).

It is worth noting that compounds **2 a/b** have been unavailable before by using enzymatic carboligation, because the 4-deoxyketose constitution is unique in that it can be generated only by TK catalysis; such structures devoid of functionality at C4 cannot be accessed by any of the known aldolases, which require a nucleophilic attack to a carbonyl electrophile located at this position.^[4]

Aldehyde	Product	TK _{eco}		TK _{eco} ^{D469E}		TK _{eco} ^{H26Y}	
		Yield [%]	<i>ee</i> [%]	Yield [%]	<i>ee</i> [%]	Yield [%]	<i>ee</i> [%]
1 a	3 a	53	64 (S)	59	87 (S)	23	64 (R)
1 b	3 b	34	85 (S)	56	91 (S)	29	60 (R)

The absolute configurations of the new products could be assigned by correlation of the optical rotation values determined for the enzymatic products of **2 a** to that of an enantiomerically pure sample prepared from natural 2-deoxy-D-ribose. The unambiguous reference material (S)-**2 a** has been reported to show an $[\alpha]_D^{25}$ value of $+12.8^\circ$ ($c=1.0$, water).^[46] Because the material isolated from reactions with 3-propanal (both with wild-type and TK_{eco}^{D469E}) showed positive signs of rotation, the major enantiomer must have an identical 3S-configured chiral center. This confirms that TK_{eco} and TK_{eco}^{D469E} maintain their natural enantioselectivity, not only for aliphatic substrates but also for 2-deoxygenated aldehydes carrying remote sites of hydroxylation. In contrast, the opposite sign for the corresponding product of TK_{eco}^{H26Y} indicates that the latter similarly maintains its inverted enantioselectivity for the (3R)-configuration. The absolute level of stereoselectivity observed with the more remotely functionalized β/γ-hydroxyaldehydes **1 a/b** is similar for all TK variants, but apparently slightly lower than with generic aliphatic aldehydes, possibly due to more prominent binding interactions of the additional OH group to protein residues in the active site, which are not accessible to purely aliphatic substrates.

Assay development for TK library screening

The TK_{eco}^{D469E} and TK_{eco}^{H26Y} catalysts were created by random site-specific saturation mutagenesis of the wild-type TK_{eco} gene, followed by screening of the mutant library with tetrazolium-based colorimetric^[31] and HPLC assays.^[29] However, the former can only be used for non-α-hydroxylated aldehyde acceptors, and both methods are rather laborious and time-consuming. Thus, we tried to further evaluate our pH-based assay for its suitability for high-throughput screening of TK libraries. Assays for HTS require not only small sample volume, high throughput, and robustness, but also adequate sensitivity, reproducibility, and accuracy, in order to discriminate among the large numbers of substrates that span the entire range of activity.

We have optimized the culture and lysis method for cells bearing recombinant protein on 96-well plates, and adapted the pH-based assay for screening in microtiter plate format. For proof-of-principle, only cells expressing recombinant wild-type TK_{yst} and TK_{eco} were used as samples; BL21(DE3) host cell served as the negative control. Background activity from the native TK gene of the host was deemed too low to interfere with the measurements. In view of the requirement for very low buffer concentration in the assay system, cell lysis had to be effected in the absence of high concentration of buffering components. For this reason, we adopted a recently published method by using 10% BugBuster solution with 0.5 mg mL⁻¹ ly-

sozyme and 4 U mL⁻¹ Benzonase endonuclease as the resuspension buffer.^[36] By shaking at room temperature for 0.5–1 h, practically all *E. coli* host cells became disintegrated (judged by microscope examination). A 40 μL sample of the supernatant

was applied for activity measurement. We chose low concentrations of glycolaldehyde (5 mM for TK_{yst}, 2.5 mM for TK_{eco}) as a rate-limiting factor.

For evaluation and validation of high-throughput screening assays, Zhang et al. defined a screening window coefficient, “Z-factor”,^[47] a dimensionless statistical parameter that reflects both the assay signal dynamic range and the data variation associated with the signal measurements; it is therefore suitable for assay quality assessment. The assay method is judged to be “excellent” when $0.5 < Z \leq 1.0$ (an ideal method is characterized by a Z-factor of 1). We used 48 parallel samples (half a 96-well plate) for each cell type to compare the differences within the same sample dataset as well as between the diverse recombinants, and calculated the Z-factor to assess the high-throughput application of our screening method (Table 4).

	TK _{yst}	TK _{eco}
glycolaldehyde [mM]	5.0	2.5
average activity [mU]	2.3	38
relative standard deviation	14%	7%
Z-factor	0.52	0.80

Soluble expression of TK_{yst} in *E. coli* is compromised by formation of inclusion bodies and hence reached a much lower concentration than that attainable for TK_{eco}, which is why its activity with 5 mM glycolaldehyde (2.3 mU) in crude extracts already reaches the LOD of this method (2.5 mU). However, the Z-factor value (0.52) is still above 0.5, which demonstrates that the pH-based assay has enough precision for its use in high-throughput applications. In comparison, application of the assay to the screening of TK_{eco} variants, at even lower substrate concentrations, is far superior.

Conclusions

Using HPA as the donor component in TK reactions causes a defined pH increase, the rate of which was shown to be directly proportional to TK activity. Proton consumption can be quantified by the pH indicator phenol red with high specificity and sensitivity; this allows the use this system for quantitative measurements covering a broad range of TK activity. TEA buffer at low concentration (2 mM) proved sufficient to avoid an undesired pH interference from assay components. As proof of the reliability of the assay to measure product formation, a few examples of newly investigated substrate–enzyme combinations were scrutinized by preparative synthesis of 4-

deoxyketose-type products **2a/b**, which hitherto have been inaccessible from enzymatic carbonylation. In particular, we were able to show that, when using β/γ -hydroxylated aldehydes, the TK enzymes tested retained their previously observed absolute stereoselectivity for generic aliphatic substrates.

We have demonstrated that this new assay format is applicable to the reliable determination of kinetic constants by using three different TK variants, both wild-type and mutated proteins. The method is also useful for rapid quantitative multi-substrate screening to chart and distinguish the distinct acceptor specificities of enzyme variants, and thereby produce a functional fingerprint map of their substrate tolerance that readily illustrates the similarities and differences between the enzymes' relative specificities. Finally, we have successfully adapted the pH-based assay to the high-throughput screening of mutated TK libraries in microtiter plate format. The statistical Z-factors (0.52 and 0.80 for TK_{yst} and TK_{eco}, respectively) with low concentrations of glycolaldehyde indicate that this pH-based assay is suitable for reliable screening in high-throughput tasks.

Thus, this pH-based assay should prove a very useful tool in the screening of novel TK enzymes for their substrate tolerance and for the effects of their modification by directed evolution, because of its simplicity, speed, high sensitivity, and low cost.

Experimental Section

General: Standard aliphatic aldehydes and sugars were purchased from various commercial vendors and used without further purification. Solvents were distilled before use. Phenol red, triethanolamine (TEA), and thiamine diphosphate (TPP) were obtained from Sigma-Aldrich. D-Glyceraldehyde,^[48] 3-hydroxypropanal,^[49] 4-hydroxybutanal,^[50] D,L-2,4-dihydroxybutanal,^[6] (R)-3,4-dihydroxybutanal^[51] and LiHPA^[52] were synthesized according to procedures in the literature. NMR spectra were recorded on Bruker DRX500 spectrometer. Optical rotations were measured with a PerkinElmer Model 241 polarimeter. Column chromatography was performed on Merck 60 silica gel (0.063–0.200 mesh; Millipore); analytical thin layer chromatography was performed on Merck silica gel plates 60 GF254 with anisaldehyde stain for detection. Oligonucleotides were synthesized by Biomers (Ulm, Germany). Terrific Broth (TB) was prepared as tryptone (12 g), yeast extract (24 g), glycerol (4 mL), KH₂PO₄ (2.31 g), and K₂HPO₄ (12.53 g) in H₂O (1 L). Gene sequencing was performed by Eurofins MWG (Ebersberg, Germany).

Preparation of recombinant and mutant TKs from *E. coli* and *S. cerevisiae*: The genes coding for wild-type TK_{eco} and TK_{yst} (*tktA*,^[41] Genbank Accession X68025, and *TKL1*,^[53] X73224, respectively) were ligated into pET-47b vectors (Novagen/Millipore), and transformed into the *E. coli* BL21(DE3) host strain for the overexpression of recombinant TKs, respectively. Variants TK_{eco}^{D469E} and TK_{eco}^{H26Y} were constructed by site-directed mutagenesis by using the QuikChange kit (Agilent) with PCR primers TKEDef 5'-C GGT CTG GGC GAA GAA GGC CCG AC-3' (forward) and TKEDeb 5'-G TCG GGC CTT CTT CGC CCA GAC CG-3' (reverse), and TKEHYf 5'-GTA CAG AAA GCC AAA TCC GGT TAT CCG GGT GCC CC-3' (forward) and TKEHYb 5'-GG GGC ACC CGG ATA ACC GGA TTT GGC TTT CTG TAC-3' (reverse), respectively. The DpnI digested PCR products were transformed into JM109 competent cells for plasmid amplification. Positive mutant plasmids were identified by sequencing and transferred into BL21(DE3) competent cells for protein expres-

sion. The cells were cultured in a 10 L fermenter in TB medium and induced by adding IPTG (0.1 mM) for protein expression at 28 °C. Harvested cells were treated with lysozyme (Roth) and ultrasonication to obtain a crude cell extract. Recombinant proteins were purified by Ni-affinity chromatography (GE Healthcare). Buffer exchange for TEA (2 mM, pH 7.5) was effected by ultrafiltration.

Assay development: The standard curve of the assay was determined by using a series of NaHCO₃ concentrations (0–1.0 mM) in a 96-well plate. The reaction mixture (200 μ L) contained TEA buffer (2.0 mM, pH 7.5), LiHPA (50 mM), TPP (2.4 mM), MgCl₂ (9.0 mM), TK_{yst} (12 μ g), and phenol red (0.028 mM). The relationship between concentration of HCO₃⁻ and absorbance was measured at 560 nm by using a Vmax plate reader (Molecular Devices, USA) to obtain the standard curve as $y = ax + b$. LOD was defined by $LOD = 3.3S_b/\bar{a}$, and LOQ was defined as $LOQ = 10S_b/\bar{a}$, where S_b is the standard deviation of the control and \bar{a} is the slope of the standard curve.^[44]

The reactions were performed in 96-well plates at 20 °C (200 μ L per well). The assay mixture contained TK (4, 12, or 32 μ g), acceptor (50 mM or 200 mM), TPP (2.4 mM), Mg²⁺ (9 mM), TEA (2 mM, pH 7.5) and phenol red (0.028 mM). LiHPA (50 mM) was added to start the reaction. The absorbance was measured at 560 nm by using a plate reader.

The specific activity measurement at varying enzyme concentration used a series of TK_{yst} (0–4 μ g). D-Glyceraldehyde (50 mM) was used as the acceptor. Absorbance data for the first 60 s were recorded and converted into concentrations of HCO₃⁻ according to the calibration curve for the activity calculation. The LOD and LOQ of the TK activity measurement were defined as for the standard curve.

Determination of acceptor specificity: For screening the acceptor tolerance of TKs, the activities with various acceptors were measured by using the standard assay mixture, supplemented with either methanal, glycolaldehyde, D,L-glyceraldehyde, D-glyceraldehyde, D-erythrose, L-threose and D,L-2,4-dihydroxybutanal (each 50 mM), or D-ribose, L-xylose, D-xylose, L-arabinose, ethanal, 3-hydroxypropanal, propanal, (R)-3,4-dihydroxybutanal, 2-deoxy-D-ribose, D-allose, D-gulose, L-mannose, or D-glucose (each 200 mM). TK was added to at a concentration that depended on the relative acceptor activity (4 μ g for methanal, 12 μ g for glycolaldehyde, D,L-glyceraldehyde, D-glyceraldehyde, D-erythrose, L-threose and D,L-2,4-dihydroxybutanal, and 32 μ g for D-ribose, L-xylose, D-xylose, L-arabinose, ethanal, 3-hydroxypropanal, propanal, (R)-3,4-dihydroxybutanal, 2-deoxy-D-ribose, D-allose, D-gulose, L-mannose and D-glucose).

Preparative synthesis: The aldehyde acceptor (3-hydroxypropanal or 4-hydroxy butanal; 200 mM) and LiHPA (138 mg, 50 mM) were added to an aqueous solution (total reaction volume, 25 mL) of TPP (28 mg, 2.4 mM) and MgCl₂·(H₂O)₆ (48 mg, 9.4 mM) at pH 7.5 with stirring. After readjusting the pH to 7.5, lyophilized enzyme (TK_{eco}, TK_{eco}^{D469E}, or TK_{eco}^{H26Y}, 15 mg) was added, and the resultant mixture was stirred (35 °C, 24 h) with the pH maintained at 7.5 by controlled addition of HCl (1 M) by a pH stat (Titroline alpha, Schott, Germany). The reaction was monitored by TLC, which indicated complete conversion after 24 h (except for TK_{eco}^{H26Y}). The solution was concentrated in vacuo, and product (**2a** or **2b**) was purified by flash chromatography by using CHCl₃/MeOH (85:15) as eluent.

4-Deoxy-glycero-pentulose (2a): Using TK_{eco}: 53% yield; 3S configuration, 64% ee; $[\alpha]_D^{20} = +15.5$ ($c = 1.0$, H₂O);^[46] $[\alpha]_D^{20} = +12.8$ ($c = 1.0$, H₂O); using TK_{eco}^{D469E}: 59% yield; 3S configuration, 87% ee; $[\alpha]_D^{20} = +19.0$ ($c = 1.0$, H₂O); using TK_{eco}^{H26Y}: 23% yield; 3R configura-

tion, 64% ee; $[\alpha]_D^{20} = -12.0$ ($c = 1.0$, H₂O). In aqueous solution the product exists as an equilibrium of α - and β -anomeric forms, and the open-chain isomer is in a 51:34:15 ratio; spectroscopic signals are denoted as $\alpha/\beta/o$, respectively. ¹H NMR (D₂O, 500 MHz): $\delta = 1.79$ (m, 2H; 4-Ho), 1.88 (m, 2H; 4-H β), 1.95 (m, 2H; 4-H α), 2.23 (m, 2H; 4-H α), 2.35 (m, 2H; 4-Ho), 2.36 (m, 2H; 4-H β), 3.50 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H; 1-H $\beta\alpha$), 3.54 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H; 1-H $\alpha\alpha$), 3.61 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H; 1-H $\beta\beta$), 3.67 (dt, $J = 1.1$, 6.1 Hz, 2H; 5-Ho), 3.75 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H; 1-H $\alpha\beta$), 3.79 (m, 2H; 5-H α), 3.98 (m, 2H; 5-H α), 4.02 (m, 2H; 5-H β), 4.19 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H; 3-H α), 4.19 (dd, $J = 5.5$, 1.8 Hz, 1H; 3-H β), 4.41 (dd, $J = 4.0$, 8.6 Hz, 1H; 3-Ho), 4.47 (d, $J = 19.2$ Hz, 1H; 1-H βo), 4.54 ppm (d, $J = 19.2$ Hz, 1H; 1-H αo); ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz): $\delta = 31.00$ (C-4 α), 32.05 (C-4 β), 32.80 (C-4o), 57.33 (C-5o), 62.29 (C-1 β), 62.90 (C-1 α), 64.85 (C-5 α), 65.01 (C-1o), 66.41 (C-5 β), 70.53 (C-3 α), 71.99 (C-3o), 74.95 (C-3 β), 102.59 (C-2 α), 106.09 (C-2 β), 214.14 ppm (C-2o).

4,5-Dideoxy-glycero-hexulose (2b): Using TK_{eco}: 34% yield; 3S configuration, ee 85%; $[\alpha]_D^{20} = -5.0$ ($c = 1.0$, H₂O); using TK_{eco}^{D469E}: 56% yield; 3S configuration, ee 91%; $[\alpha]_D^{20} = -8.4$ ($c = 1.0$, H₂O); using TK_{eco}^{H26Y}: 29% yield; 3R configuration, ee 60%; $[\alpha]_D^{20} = +1.7$ ($c = 1.0$, H₂O). In aqueous solution the product exists as an equilibrium of α - and β -anomeric forms and the open-chain isomer in a 32:55:13 ratio; spectroscopic signals are denoted as $\alpha/\beta/o$, respectively. ¹H NMR (D₂O, 500 MHz): $\delta = 1.35$ (m, 2H; 4-H α), 1.58 (m, 2H; 5-Ho), 1.64 (m, 2H; 5-H β), 1.68 (m, 2H; 5-H α), 1.80 (m, 2H; 4-H β), 1.95 (m, 2H; 4-Ho), 3.44 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H; 1-H $\beta\beta$), 3.45 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H; 1-H $\beta\alpha$), 3.56 (m, 2H; 6-H β), 3.61 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H; 1-H $\alpha\alpha$), 3.63 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; 1-H $\alpha\beta$), 3.66 (m, 1H; 3-H α), 3.67 (m, 1H; 3-H β), 3.74 (m, 2H; 6-H α), 3.88 (dt, $J = 2.9$, 11.9 Hz, 2H; 6-Ho), 4.34 (dd, $J = 4.0$, 9.0 Hz, 1H; 2-Ho), 4.45 (d, $J = 19.2$ Hz, 1H; 1-H βo), 4.52 ppm (d, $J = 19.2$ Hz, 1H; 1-H αo); ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz): $\delta = 18.87$ (C-4 α), 25.14 (C-5 α), 24.20 (C-5 β), 26.14 (C-4 β), 26.96 (C-5o), 29.37 (C-4o), 60.34 (C-6 β), 60.83 (C-6 α), 61.18 (C-6o), 63.94 (C-1 β), 64.01 (C-1 α), 64.98 (C-1o), 65.63 (C-3 α), 66.79 (C-3 β), 74.35 (C-3o), 96.32 (C-2 α), 96.71 (C-2 β), 214.03 ppm (C-2o).

2,3-O-Isopropylidene-4-deoxy- β -L-glycero-pentulofuranose (4): *p*-Toluenesulfonic acid (20 mg) was added to a solution of **2a** (200 mg) in acetone (10 mL), and stirred (room temperature, 12 h). After addition of triethylamine (20 μ L), the mixture was concentrated in vacuo, and the residue was purified by flash silica chromatography with hexane/ethylacetate (80:20) as eluent to give the product as colorless syrup (78 mg, 30% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): $\delta = 1.31$ (s, 3H; Me), 1.46 (s, 3H; Me), 1.85 (m, 2H; 4-H β), 2.01 (dd, $J = 4.6$, 13.4 Hz, 1H; 4-H α), 3.62 (s, 2H; 1-H), 3.96 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H; 5-H α), 4.03 (m, 1H; 5-H β), 4.39 ppm (d, $J = 4.3$ Hz, 3-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): $\delta = 25.51$ (Me), 26.41 (Me), 32.40 (C-4), 62.72 (C-1), 66.37 (C-5), 80.38 (C-3), 110.38 (CMe₂), 113.27 ppm (C-2).

1,2-O-Isopropylidene-4,5-dideoxy- α -L-glycero-hexulose (5): 2,2-Dimethoxypropane (330 μ L) and *p*-toluenesulfonic acid (20 mg) were added to a solution of **2b** (200 mg) in dry CH₂Cl₂ (5 mL), and the mixture was stirred at room temperature with monitoring by TLC. After 2 h, the reaction was quenched with saturated NaHCO₃ and extracted with ethylacetate (3 \times 10 mL). The combined organic layers were concentrated, and the residue was purified by flash silica chromatography with hexane/ethylacetate (85:15) as eluent, to furnish **5** as a colorless syrup (140 mg, 55% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): $\delta = 1.37$ (s, 3H; Me), 1.49 (s, 3H; Me), 1.52 (m, 1H; 4-H α), 1.57 (m, 1H; 5-H α), 1.65 (m, 1H; 5-H β), 1.95 (m, 1H; 4-H β), 3.41 (dd, $J = 5.0$, 11.4 Hz, 1H; 3-H), 3.56 (m, 1H; 6-H_{eq}), 3.70 (m, 1H; 6-H_{ax}), 3.81 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H; 1-H α), 4.11 ppm (d, $J = 8.5$ Hz, 1H; 1-H β); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): $\delta = 24.01$ (C-5), 25.51 (Me),

25.62 (Me), 28.63 (C-4), 60.33 (C-3), 66.57 (C-6), 71.25 (C-1), 104.24 (CMe₂), 110.33 ppm (C-2).

Chiral GC analysis: Racemic acetals **4** and **5** were resolved by GC by using a chiral FS-cyclodex β -I/P column (CS GmbH, Germany; 0.25 \times 25 m, carrier H₂) with a flame ionization detector, with the following temperature profile: start at 40 °C, increasing temperature (10 °C per min) for 14 min, 180 °C for 19 min. Compound **4** showed a retention time of 14.9 for the *R* isomer and 15.1 for the *S* isomer; retention times for **5** were 15.0 and 15.2 for the *R* and *S* isomers, respectively.

Determination of kinetics constants: The enzymatic kinetics with HPA as donor and different aldehydes as acceptor (glycolaldehyde, D,L-glyceraldehyde, D-glyceraldehyde, and D-erythrose) were determined by varying the concentration of individual substrates while keeping all other parameters constant. The reaction rate at each concentration was calculated according to the calculation curve, and the resultant data were applied in a nonlinear fit to the Michaelis-Menten equation by using Origin 8.0 software (OriginLab, Northampton, MA) to obtain enzyme kinetics values.

Development of the screening method for the mutagenesis library: Cells expressing recombinant TK_{st} and TK_{eco} were used as samples for the development of a screening method for mutant libraries. *E. coli* BL21(DE3) host cells were used as control. A sample suspension (2 μ L) of each clone was transferred to individual wells in 96-well plates containing lysogeny broth (LB; 150 μ L per well) with kanamycin (Kan; 30 μ g mL⁻¹). The plates were sealed with plastic lids to avoid evaporation, and then incubated overnight (30 °C, 900 rpm). Thereafter, samples (5 μ L) were transferred from each well to 96-well deep-well plates containing LB-Kan (400 μ L per well) supplemented with IPTG (0.1 mM). The plates were covered with plastic lids and incubated overnight (30 °C, 900 rpm). Cells were harvested by centrifugation 3000g, 30 min). The culture medium was removed, and the cell pellets were stored at -80 °C.

For the assay measurement, the cell pellets were resuspended in resuspension buffer (150 μ L, BugBuster solution (10%, Novagen/Merck Millipore), lysozyme (0.5 mg mL⁻¹; Roth), and Benzonase endonuclease (4 U mL⁻¹; Novagen/Merck Millipore)), and incubated in a shaker (0.5–1 h, room temperature). Then, the cell lysate was centrifuged (3000g, 30 min), and a sample of the supernatant (40 μ L) was transferred to a new 96-well plate. Reaction stock solution (140 μ L, TEA (2 mM, pH 7.5), MgCl₂ (9 mM), TPP (2.4 mM), phenol red (28 μ M), and glycolaldehyde (2.5 mM for TK_{eco}, 5 mM for TK_{st})) was added to each well. The reaction was initiated by the addition of LiHPA (50 mM). The OD increase (560 nm) was read by a plate reader.

For the evaluation and validation of this assay method, the Z-factor was calculated from the data of the acceptor specificity measurement according to the formula $Z = 1 - (3\sigma_s + 3\sigma_c) / |\mu_s + \mu_c|$, where σ_s is the sample standard deviation, σ_c is the control standard deviation, μ_s is the sample average, and μ_c is the control average.^[47] A total of 48 samples (half of a 96-well plate) of each TK and host cells were used for the Z-factor calculation.

Acknowledgements

This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant Fe244/9-1 to W.D.F.) and the Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-09-BLAN-0424-CSD3 to L.H.) within the framework of Programme Blanc International, as well as by ESF

project COST CM0701. D.Y. gratefully acknowledges support through a PhD scholarship administered by the DAAD. We thank Dr. Madhura Rale for providing samples of 3-hydroxypropanal and D-glyceraldehyde.

Keywords: biocatalysis · carboligation · high-throughput screening · pH-indicator assay · substrate specificity · transketolases

- [1] a) G. Schenk, R. Layfield, J. M. Candy, R. G. Duggleby, P. F. Nixon, *J. Mol. Evol.* **1997**, *44*, 552–572; b) S. J. Costelloe, J. M. Ward, P. A. Dalby, *J. Mol. Evol.* **2008**, *66*, 36–49.
- [2] a) E. Racker in *The Enzymes*, Vol. 5 (Eds.: P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck), 2nd ed., Academic Press, New York, **1961**, pp. 397–406; b) G. Schenk, R. G. Duggleby, P. F. Nixon, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **1998**, *30*, 1297–1318.
- [3] G. Schneider, Y. Lindqvist, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1998**, *1385*, 387–398.
- [4] W.-D. Fessner, V. Helaine, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 574–586.
- [5] a) U. Schörken, G. A. Sprenger, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1998**, *1385*, 229–243; b) G. A. Sprenger, M. Pohl, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *6*, 145–159; c) N. J. Turner, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 527–531; d) R. Wohlgemuth, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *61*, 23–29; e) P. Hoyos, J.-V. Sinisterra, F. Molinari, A. R. Alcántara, P. Dominguez de María, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 288–299; f) R. Wohlgemuth, M. E. B. Smith, P. A. Dalby, J. M. Woodley in *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, Vol. 7 (Ed.: M. C. Flickinger) Wiley, Hoboken, **2010**, pp. 4746–4752; g) M. Brovetto, D. Gamenara, P. Saenz Méndez, G. A. Seoane, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4346–4403.
- [6] Y. Kobori, D. C. Myles, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5899–5907.
- [7] F. Effenberger, V. Null, T. Ziegler, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5157–5160.
- [8] G. de La Haba, I. G. Leder, E. Racker, *J. Biol. Chem.* **1955**, *214*, 409–426.
- [9] L. Hecquet, C. Demuyneck, G. Schneider, J. Bolte, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 771–776.
- [10] a) G. R. Hobbs, M. D. Lilly, N. J. Turner, J. M. Ward, A. J. Willets, J. M. Woodley, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 165–166; b) A. J. Humphrey, N. J. Turner, R. McCague, S. J. C. Taylor, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 2475–2476; c) E. González-García, V. Helaine, G. Klein, M. Schuermann, G. A. Sprenger, W.-D. Fessner, J.-L. Reymond, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 893–899.
- [11] L. E. Janes, A. C. Löwendahl, R. J. Kazlauskas, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 2324–2331.
- [12] A. M. F. Liu, N. A. Somers, R. J. Kazlauskas, T. S. Brush, F. Zocher, M. M. Enzelberger, U. T. Bornscheuer, G. P. Horsman, A. Mezzetti, C. Schmidt-Dannert, R. D. Schmid, *Tetrahedron Asymmetry* **2001**, *12*, 545–556.
- [13] a) D. Wahler, F. Badalassi, P. Crotti, J.-L. Reymond, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4589–4592; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4457–4460; b) D. Wahler, F. Badalassi, P. Crotti, J.-L. Reymond, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 3211–3228.
- [14] J. Littlechild, N. Turner, G. Hobbs, M. Lilly, A. Rawas, H. Watson, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **1995**, *51*, 1074–1076.
- [15] M. Nikkola, Y. Lindqvist, G. Schneider, *J. Mol. Biol.* **1994**, *238*, 387–404.
- [16] L. Mitschke, C. Parthier, K. Schroeder-Tittmann, J. Coy, S. Lütke, K. Tittmann, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 31559–31570.
- [17] E. G. Hibbert, T. Senussi, S. J. Costelloe, W. Lei, M. E. B. Smith, J. M. Ward, H. C. Hailes, P. A. Dalby, *J. Biotechnol.* **2007**, *131*, 425–432.
- [18] E. G. Hibbert, T. Senussi, M. E. B. Smith, S. J. Costelloe, J. M. Ward, H. C. Hailes, P. A. Dalby, *J. Biotechnol.* **2008**, *134*, 240–245.
- [19] M. E. B. Smith, E. G. Hibbert, A. B. Jones, P. A. Dalby, H. C. Hailes, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2631–2638.
- [20] a) A. Cázares, J. L. Galman, L. G. Crago, M. E. B. Smith, J. Strafford, L. Rios-Solis, G. J. Lye, P. A. Dalby, H. C. Hailes, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1301–1309; b) J. L. Galman, D. Steadman, S. Bacon, P. Morris, M. E. B. Smith, J. M. Ward, P. A. Dalby, H. C. Hailes, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 7608–7610.
- [21] F. T. Zimmermann, A. Schneider, U. Schörken, G. A. Sprenger, W.-D. Fessner, *Tetrahedron Asymmetry* **1999**, *10*, 1643–1646.
- [22] a) B. L. Horecker, P. Z. Smyrniotis, *Methods Enzymol.* **1955**, *1*, 371–375; b) M. X. Du, J. Sim, L. Fang, Y. Zheng, S. Koh, J. Stratton, J. Pons, J. J.-X. Wang, B. Carte, *J. Biomol. Screening* **2004**, *9*, 427–433.
- [23] a) L. Hecquet, J. Bolte, C. Demuyneck, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, *57*, 2174–2176; b) J.-Y. Lee, D.-E. Cheong, G.-J. Kim, *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 899–904; c) C. Naula, V. P. Alibu, J. M. Brock, N. J. Veitch, R. J. S. Burchmore, M. P. Barrett, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2008**, *70*, 1185–1187.
- [24] a) A. Sevestre, V. Hélaïne, G. Guyot, C. Martin, L. Hecquet, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 827–830; b) A. Sevestre, F. Charmantray, V. Hélaïne, A. Lásiková, L. Hecquet, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 3969–3976; c) F. Charmantray, B. Légeret, V. Hélaïne, L. Hecquet, *J. Biotechnol.* **2010**, *145*, 359–366.
- [25] G. A. Kochetov, R. A. Usmanov, A. T. Mevkh, *Anal. Biochem.* **1978**, *88*, 296–301.
- [26] I. A. Sevostyanova, O. N. Solovjeva, G. A. Kochetov, *Biochemistry (Moscow)* **2006**, *71*, 560–562.
- [27] G. A. Kochetov, P. P. Philippov, *Anal. Biochem.* **1972**, *48*, 286–291.
- [28] A. W. Holldorf, *Methods Enzym. Anal. (3rd Ed.)* **1984**, *6*, 578–582.
- [29] a) R. K. Mitra, J. M. Woodley, *Biotechnol. Tech.* **1996**, *10*, 167–172; b) O. J. Miller, E. G. Hibbert, C. U. Ingram, G. J. Lye, P. A. Dalby, *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29*, 1759–1770; A. Ranoux, I. W. C. E. Arends, U. Hanefeld, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 790–793.
- [30] Z. Dische, A. Devi, *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *39*, 140–144.
- [31] M. E. B. Smith, U. Kaulmann, J. M. Ward, H. C. Hailes, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7062–7065.
- [32] a) L. E. Janes, A. Cimpoia, R. J. Kazlauskas, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9019–9029; b) N. A. Somers, R. J. Kazlauskas, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2991–3004.
- [33] E. Chapman, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 551–555.
- [34] N. He, D. Yi, W.-D. Fessner, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2384–2398.
- [35] C. Deng, R. R. Chen, *Anal. Biochem.* **2004**, *330*, 219–226.
- [36] M. Persson, M. M. Palcic, *Anal. Biochem.* **2008**, *378*, 1–7.
- [37] R. M. Rosenberg, R. M. Herreid, G. J. Piazza, M. H. O’Leary, *Anal. Biochem.* **1989**, *181*, 59–65.
- [38] G. Hübner, R. Golbik, L. E. Meshalkina, *Biochem. Int.* **1992**, *26*, 545–550.
- [39] R. J. Kazlauskas in *Enzyme Assays. High-Throughput Screening, Genetic Selection and Fingerprinting* (Ed.: J.-L. Reymond), Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, pp. 17–39.
- [40] A. B. Hastings, J. Sendroy, Jr., *J. Biol. Chem.* **1925**, *65*, 445–455.
- [41] G. A. Sprenger, U. Schörken, G. Sprenger, H. Sahn, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 525–532.
- [42] a) S. Hauptmann, W. Gabler, *Z. Naturforsch.* **1968**, *23*, 111–112; b) J. W. Ogilvie, S. C. Whitaker, *Biochim. Biophys. Acta Enzymol.* **1976**, *445*, 525–536; c) W. A. Bubb, H. A. Berthon, P. W. Kuchel, *Bioorg. Chem.* **1995**, *23*, 119–130.
- [43] a) M. E. B. Smith, K. Smithies, T. Senussi, P. A. Dalby, H. C. Hailes, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 1121–1123; b) K. Rohr, R. Mahrwald, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1878–1880.
- [44] a) G. L. Long, J. D. Winefordner, *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 712A–724A; b) Analytical Methods Committee, *Analyst* **1987**, *112*, 199–204.
- [45] J. Bolte, C. Demuyneck, H. Samaki, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5525–5528.
- [46] K. Linek, R. Sandtnerová, T. Sticzay, V. Kováčik, M. Kulhánek, M. Tadra, *Carbohydr. Res.* **1979**, *76*, 290–294.
- [47] J.-H. Zhang, T. D. Y. Chung, K. R. Oldenburg, *J. Biomol. Screening* **1999**, *4*, 67–73.
- [48] C. R. Schmid, J. D. Bryant, M. Dowlatzedah, J. L. Phillips, D. E. Prather, R. D. Schantz, N. L. Sear, C. S. Vianco, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4056–4058.
- [49] R. H. Hall, E. S. Stern, *J. Chem. Soc.* **1950**, 490–498.
- [50] H. A. Bates, J. Farina, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3843–3845.
- [51] C. André, J. Bolte, C. Demuyneck, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 1359–1367.
- [52] F. Dickens, D. H. Williamson, *Biochem. J.* **1958**, *68*, 74–81.
- [53] M. Sundström, Y. Lindqvist, G. Schneider, U. Hellman, H. Ronne, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24346–24352.

Received: June 1, 2012

Published online on September 24, 2012

Résumé

La transcétolase (TK, EC 2.2.1.1) est une enzyme catalysant la formation de cétooses de configuration *D-thréo* à partir d'aldéhydes α -hydroxylés (*2R*), par formation stéréospécifique d'une liaison C-C. L'objectif de ces travaux est d'inverser l'énantiosélectivité de cette enzyme par ingénierie afin d'obtenir des cétooses *L-érythro* (recherchés pour leurs applications potentielles dans les domaines pharmaceutique et/ou nutritionnel) à partir d'aldéhydes α -hydroxylés (*2S*).

Dans ce but, une TK thermostable (mTK_{gst}) issue de la bactérie thermophile *Geobacillus stearothermophilus* a d'abord été identifiée et produite. L'étude de sa structure tridimensionnelle a permis d'identifier deux résidus du site actif ayant un rôle potentiel dans l'inversion de son énantiosélectivité : Leu382 et Asp470. Des banques de mTK_{gst} mutées ont alors été créées, selon deux stratégies : rationnelle et semi-rationnelle. La première a consisté à muter les deux résidus sélectionnés par mutagenèse par saturation de site, tandis que la seconde a consisté à modifier deux séquences de cinq résidus contigus à aux positions clés, selon la mutagenèse par cassette. Afin d'identifier les mTK_{gst} mutées d'intérêt, un test de criblage à haut-débit a été mis au point, basé sur le suivi pH-métrique de la réaction en présence de rouge de phénol. A l'issue du criblage, le variant mTK_{gst}-L382D/D470S a été mis en évidence. Son activité vis-à-vis d'un aldéhyde modèle de configuration (*2S*) a été augmentée d'un facteur 5 par rapport à l'enzyme sauvage et la perte de l'énantiosélectivité vis-à-vis des aldéhydes (*2R*) a été confirmée.

Mots-clés : Biocatalyse, Transcétolase, Cétooses *L-érythro*, , Enzyme thermostable, Test de criblage, Mutagenèse par saturation de site, Mutagenèse par cassette

Abstract

Transketolase (TK, EC 2.2.1.1) catalyzes the formation of *D-threo* ketoses from (*2R*)- α -hydroxyaldehydes by the stereospecific formation of a C-C bond. Our aim was to invert the enantioselectivity of TK by protein engineering in order to obtain *L-erythro* ketoses (sought after for their potential pharmaceutical and/or nutritional applications) from (*2S*)- α -hydroxyaldehydes.

For that purpose, a thermostable TK from thermophilic bacterium *Geobacillus stearothermophilus* (mTK_{gst}) has been identified and overexpressed. After the study of the 3D-structure of mTK_{gst}, two residues located in its active site (Leu382 and Asp470) were selected as mutation targets for the inversion of the enzyme's enantioselectivity. Both rational and semi-rational approaches were considered for the construction of the mutant mTK_{gst} libraries. In the former, the two residues were modified by site-saturation mutagenesis. In the latter, short sequences of five amino acids, neighboring target ones, were modified using a cassette mutagenesis technique. A novel continuous pH-based assay has been developed for the high-throughput screening of the mTK_{gst} libraries, using phenol red as pH indicator. The screening revealed mTK_{gst}-L382D/D470S as the top mutant, showing a 5-fold activity improvement towards a model (*2S*)-hydroxyaldehyde and the loss of enantioselectivity towards the (*2R*)-aldehyde.

Keywords: Biocatalysis, Transketolase, *L-erythro* Ketoses, Thermostable enzyme, Screening assay, Site-saturation mutagenesis, Cassette mutagenesis