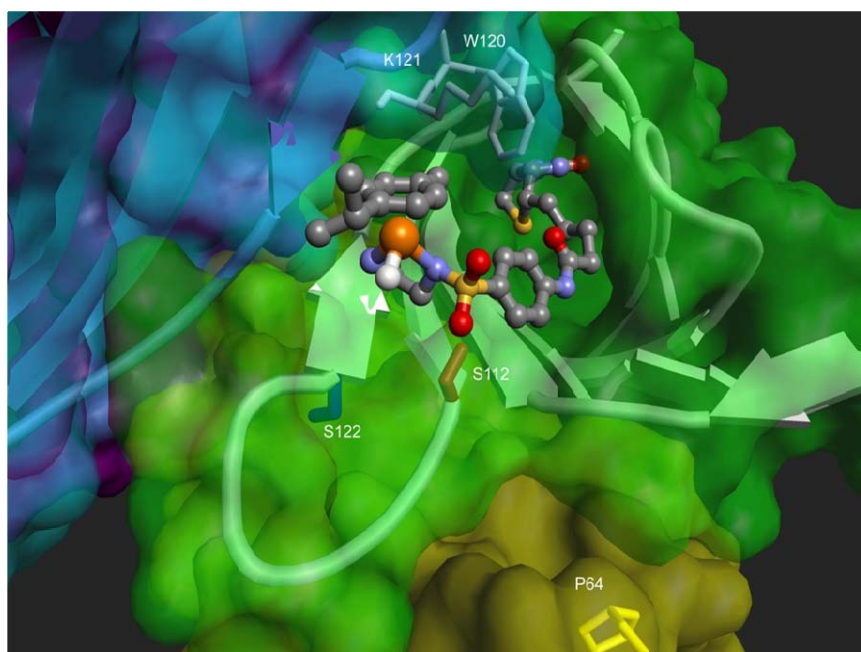


Thèse de doctorat

**Evolution Rationnelle De Metalloenzymes Artificielles Basées Sur la
Technologie Streptavidine-Biotine Pour La Catalyse Enantioselective Par
Transfert Hydrogénant de Dérivés Carbonylés**



Anita Ivanova

Juin 2007

IMPRIMATUR POUR LA THESE

Evolution rationnelle de métalloenzymes
artificielles basées sur la technologie
Streptavidine-Biotine pour la catalyse
énantiosélective par transfert hydrogénéant de
dérivés carbonyles

Anita IVANOVA

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury

MM. T. Ward (directeur de thèse),
J.-M. Neuhaus, M. Creus et
F. Taran (CEA, Saclay F)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 26 novembre 2007

Le doyen :
T. Ward

UNIVERSITE DE NEUCHATEL
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat-Décanat de la faculté
Rue Emile-Argand 11 - CP 158
CH-2009 Neuchâtel

*A ma grand-mère Sara qui m'a élevée, aimée, soutenue et encouragée
avec ma profonde reconnaissanc*

Thèse soutenue le 13 Juin 2007 devant le jury composé par :

Prof. Thomas R. Ward, Directeur de thèse, Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Suisse

Prof. Jean Marc Neuhaus, Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Suisse

Dr. Frédéric Taran, CEA/Saclay, Paris, France

Dr. Marc Creus, Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Suisse

Mots Clés : métalloenzymes artificielles, catalyse asymétrique, mutagenèse, biotine-streptavidine, immobilisation du catalyseur, diversité.

Keywords : artificial metalloenzymes, asymmetric catalysis, mutagenesis, biotin-streptavidin, catalyst's immobilization, diversity.

- Faculté des sciences
- Rue Emile Argand 11, CP158, CH-2009 Neuchâtel
- Téléphone: +41 32 718 21 00; Fax: +41 32 718 21 03
- Email: secretariat.sciences@unine.ch; web page: www.unine.ch

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans le laboratoire des métalloenzymes artificielles sous la direction du Professeur Thomas R. Ward que je remercie pour m'avoir accueilli dans son équipe, pour la confiance qu'il m'a accordée et surtout pour la grande motivation qu'il a su m'insuffler tout au long de cette thèse. Je tiens à le faire parce qu'il m'a permis de découvrir ce vaste domaine charnière entre la chimie et la biologie moléculaire.

Je remercie également les membres du jury d'avoir accepté de lire ce manuscrit et d'avoir évalué mon travail. Je remercie le Dr. Nicolas Humbert pour m'avoir transmis les connaissances de base pour l'obtention de la streptavidine recombinante et le Dr. Marc Creus pour ses innombrables conseils lors de l'avancement de cette thèse.

Mes remerciements vont aussi aux groupes de collaboration et particulièrement à Dr. Sylwester Mazurek de l'Institut de Chimie à Ljublyana, Dr. Daniel Häussinger de « Biozentrum », Basel et Prof. Ronald Stankamp de l'Université de Washington.

J'exprime également ma gratitude à l'égard de Mlle Alessia Sardo, Mlle Anca Pordea et Monsieur Thibaud Rossel qui à travers leurs activités ont largement contribué à l'ensemble de ce travail.

Je voudrais adresser une mention spéciale aux membres du groupe des métalloenzymes artificielles et du laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire (anciens ou toujours

présents) pour les moments passés ensemble que ce soit dans le cadre du travail ou dans un cadre privé.

Mes hommages aux membres de ma famille pour leur soutien et la patience dont ils ont su faire preuve malgré la distance qui nous a séparé. Leur confiance en moi, m'a donné une force infinie.

Enfin, je souhaiterais que tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près pendant cette thèse et que j'ai oubliés de mentionner ici trouvent toute ma reconnaissance.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	5
ABREVIATIONS.....	13
SUMMARY.....	16
RESUME.....	18
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	
1.1. Préambule.....	20
1.2. La catalyse asymétrique et la chiralité	20
1.3. Les catalyseurs chiraux.....	22
1.3.1. Les catalyseurs organométalliques.....	22
1.3.2. Les enzymes en tant que catalyseurs chirales.....	29
1.3.2.1. Optimisation des enzymes.....	32
1.3.2.2. Optimisation des enzymes par la mutagenèse dirigée.....	33
1.3.2.3. Optimisation des enzymes par l'évolution dirigée.....	35
1.3.2.3.1. Méthodes de diversification des gènes.....	36
1.3.2.3.2. Sélection et criblage des protéines diversifiées.....	39
1.3.2.4. Enzymes immobilisées.....	39
1.3.3. Comparaison de la catalyse enzymatique et la catalyse organométallique.....	40
1.3.4. Génération de métalloenzymes artificielles.....	42
1.3.4.1. Ancrage covalent entre un complexe organométallique et une protéine.....	42
1.3.4.2. Incorporation non covalente d'un catalyseur dans une protéine.....	44
1.4. Le système streptavidine-biotine.....	46
1.4.1. La biotine.....	46
1.4.2. L'avidine et la streptavidine.....	47
1.4.2.1. L'avidine.....	47

1.4.2.2. La streptavidine.....	48
1.4.2.3. Comparaison de l'avidine et de la streptavidine.....	49
1.4.3. Ancrage de la biotine dans la streptavidine. Rationalisation.....	50
1.5. Objectifs du travail de thèse.....	53
CHAPITRE 2: MATERIELS ET METHODES	
2.1. Matériels.....	54
2.1.1. Matériel ADN.....	54
2.1.1.1. Le plasmide pET11b-Sav.....	54
2.1.1.2. Les amorces.....	55
➤ Amorces pour la saturation S112X.....	55
➤ Amorces pour l'exploration de de la boucle 7-8.....	57
➤ Amorces pour la saturation K121X.....	58
➤ Amorces pour la saturation L124X.....	60
➤ Amorces pour le « redesign » du gène streptavidine.....	62
➤ Amorces pour l'obtention de la streptavidine chimérique.....	62
➤ Amorces pour l'amplification du gène de la streptavidine	63
2.1.2. Souches bactériennes.....	63
2.1.3. Appareillage.....	63
2.1.3.1. Appareillage associé à la manipulation d'ADN.....	63
2.1.3.2. Appareillage associé à la production à grande et à petite échelle.....	64
2.1.3.3. Appareillage associé à l'analyse des protéines exprimées.....	64
2.2. Mélanges réactionnels ADN.....	65
2.2.1. Mélanges réactionnels d'amplification.....	65
2.2.1.1. Mélange réactionnel pour les amplifications de type mutagenèse dirigée.....	65
2.2.1.2. Mélange réactionnel pour l'amplification du gène de la streptavidine.....	66

2.2.1.3. Mélange réactionnel pour l'amplification de la streptavidine chimérique.....	67
2.2.2. Mélange réactionnel de digestion en vue de l'analyse de la mutation silencieuse.....	67
2.2.3. Mélange réactionnel de ligation du produit PCR de la streptavidine chimérique.....	67
2.3. Programmes d'amplification ADN.....	68
2.3.1. Amplification du type mutagenèse dirigée.....	68
2.3.2. Amplification du gène de la streptavidine.....	69
2.4. Obtention des bactéries « heat-chock » compétentes <i>Escherichia coli</i> XL1-blue et BL21 (DE3) pLysS.....	69
2.4.1. Obtention par traitement au RbCl.....	69
2.4.2. Obtention par traitement au DMSO.....	70
2.4.3. Transformation des bactéries avec les plasmides recombinants.....	71
2.5. Propagation des plasmides dans les bactéries XL1-blue.....	72
2.6. Procédures de production des protéines obtenues.....	72
2.6.1. Production des protéines à grande échelle.....	72
2.6.1.1. Production de la streptavidine recombinante dans un fermenteur de 10 l.....	72
2.6.1.2. Production de la streptavidine dans un fermenteur de 2 l.....	73
2.6.2. Production des protéines à petite échelle.....	76
2.7. Procédures de purification des protéines obtenues.....	76
2.7.1. Purification des protéines à grande échelle.....	76
2.7.1.1. Purification de type streptavidine sauvage.....	76
2.7.1.2. Purification alternative de type « S112P ».....	78
2.7.2. Traitement des protéines exprimées à petite échelle	79
2.8. Procédures d'analyse des protéines.....	80

2.8.1. Analyse des protéines exprimées à grande échelle.....	80
2.8.1.1. SDS-PAGE et SDS-B ₄ F.....	80
2.8.1.2. « ESI-MS ».....	81
2.8.1.3. Détermination des sites actifs libres.....	82
2.8.1.3.1. Par exclusion de HABA par la biotine.....	82
2.8.1.3.2. Par le « quenching » de la fluorescence de laB ₄ F.....	83
2.8.2. Analyse des protéines exprimées à petite échelle.....	85
2.8.2.1. SDS-PAGE et SDS-B ₄ F.....	85
2.8.2.2. Quantification des rendements des protéines à petite échelle en plaques ELISA.....	85

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Préambule.....	89
3.2. Diversification de la streptavidine fondée sur des bases rationnelles.....	95
3.2.1. Optimisation génétique par mutagenèse associée au « docking ».....	95
3.2.1.1. Saturation S112X.....	95
3.2.1.2. Exploration de la boucle 7-8.....	98
3.2.2. Optimisation génétique par mutagenèse associée à la structure cristallographique....	101
3.2.3. Optimisation génétique par « Designed Evolution » associée au « docking » et à la structure cristallographique.....	102
3.3. « Redesign » du gène de la streptavidine.....	108
3.4. Nouvelle fonctionnalité pour les métalloenzymes artificielles.....	114
3.4.1. Description de la streptavidine chimérique.....	114
3.4.2. Obtention du gène de la streptavidine chimérique.....	115
3.5. Expression et purification de la diversité protéique obtenue à grande échelle.	117
3.5.1. Expression à grande échelle	118

3.5.1.1 Expression en milieu riche.....	118
3.5.1.2 Expression en milieu minimal	118
3.5.2. Purification de la streptavidine recombinante, issue d'une expression à grande échelle.....	120
3.5.3. Analyse des protéines issues d'une expression à grande échelle.....	120
3.5.3.1. Gel SDS-PAGE.....	120
3.5.3.2. Gel SDS-B ₄ F.....	123
3.5.4. Le cas des mutants exprimés exclusivement sous forme de corps d'inclusions	124
3.5.5. Spectre de masse « ESI-MS » des protéines issues d'une expression à grande échelle.....	127
3.5.6. Détermination de l'activité des protéines issues d'une expression à grande échelle.....	128
3.5.7. Rendements de production à grande échelle.....	131
3.6. Expression et purification de la streptavidine à petite échelle.....	133
3.6.1. Etudes des paramètres de l'expression.....	133
3.6.1.1. Définition du volume.....	133
3.6.1.2. Définition de l'aération et de l'agitation orbitaliaire.....	134
3.6.1.3. Criblage des milieux.....	135
3.6.1.4. Optimisation de la température.....	138
3.6.1.5. Analyse des extractions.....	140
3.6.2. Transférabilité du volume de l'expression « Scale up ».....	142
3.6.3. Immobilisation de la streptavidine sur la biotine agarose.....	143
3.6.4. Rendements de production à petite échelle.....	145
3.7. Comparaison de l'expression à petite et à grande échelle.....	149
3.8. Diversité chimique et protéique par rapport au transfert hydrogénéant des cétones.....	151

3.8.1. Stratégie de l'optimisation.....	151
3.8.2. Tendances d' énantiosélectivité.....	152
3.8.2.1. Tendances S112X.....	152
3.8.2.2. Tendances K121X, L124X, S112AK121X, S112KK121X, S112AL124X, S112KL124X.....	154
CHAPITRE 4: CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	157
REFERENCES.....	160
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	169

ABREVIATIONS

Å : Angström

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADH : Alcool déshydrogénase

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

APS: Persulfate d'ammonium

B₄F: Biotine 4-fluorescéine

BBP. Bleu de bromophénole

BET : Bromure d'éthidium

BSA. Albumine de sérum bovin

C : Concentration

°C : Degré Celsius

D : Conditions dénaturantes

Da : Dalton

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate

DO : Densité optique

EDTA : Acide éthylènediamine tétracétique

ee : Excès énantiomérique

« ESI-MS »: « Electrospray ionisation mass spectrometry»

ET : Etat de transition

g: Gramme

Glu : Acide glutamique

GC : « Gaz chromatography »

h: Heure

HABA: 2-(4'-hydroxyazobenzène) acide benzoïque

HPLC: « High performance liquid chromatography »

IPTG: Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside

K121X: Lysine à la position 121 remplacé par les 19 acides aminés naturels

kDa: Kilo Dalton

L-Litre

L124X-Leucine à la position 124 remplacée par l'un des autres 19 acides aminés naturels

LB-5X: Tampon de chargement concentré 5 fois

M : Molaire

mL : Millilitre

μl: Microlitre

μg : Microgramme

μM : Micromolaire

M : Masse molaire

mM : Millimolaire

mg : Milligramme

Min : Minute

MOPS : Acide 3-(N-morpholino) propanesulfonique

NAD⁺/NADH : NAD oxydé/réduit

ND : Conditions non-dénaturantes

Pb : Paires de bases

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PMSF : Fluorure de phénylméthylsulfonyl

Rpm : Rotations par minute

« rms »: « root mean square error »

Rdt : Rendement

Sav : Streptavidine (gène ou protéine)

S112AK121X : Sérine à la position 112 remplacé par alanine et lysine à la position 121
remplacé par l'un des 19 acides aminés avec les 19 acides aminés

S112KK121X : Sérine à la position 112 remplacé par lysine et lysine à la position 121
remplacé par l'un des 19 acides aminés avec les 19 acides aminés

S112AL124X : Sérine à la position 112 remplacé par alanine et leucine à la position 121
remplacé par l'un des 19 acides aminés avec les 19 acides aminés

S112KL124X : Sérine à la position 112 remplacé par lysine et leucine à la position 121
remplacé par l'un des 19 acides aminés avec les 19 acides aminés

S112X : Sérine à la position 112 remplacée par les 19 acides aminés naturels

SDS : Sodium dodecyl sulphate

SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel électrophoresis

SDS-B₄F : SDS-polyacrylamide gel électrophoresis exploitant la fluorescence de la B₄F

Ser : Serine

TAE : Tris-Acétate EDTA

TEMED : Tris (hydroxyméthyl) aminométhane

« TON » : « Turnover number » (mole de produit/mole de catalyseur)

« TOF » : « Turnover frequency » (mole de produit/mole de catalyseur/temps de réaction)

Tyr : Tyrosine

UV: Ultraviolet

v/v : Volume sur volume

Wt : Gène ou protéine de la streptavidine type sauvage

w/v : Masse sur volume

SUMMARY

The production of enantiopure compounds is of increasing importance for applications in the domains of pharmaceutical and food-processing industries, as in material sciences. Production of enantiopure compounds has been boosted with the construction of artificial metalloenzymes. Such catalysts combine the protein environment (bringing some selectivity) and the catalytic activity of metals incorporated into the chiral cavity of a protein.

In this work, the system streptavidin-biotin has been used as tool for the generation of new artificial metalloenzymes. To exploit in an intensive way the diversification of streptavidin, nearly 150 mutants (from single and double mutations) have been designed by site-directed and saturation mutagenesis at positions near to the catalytic site. About thirty mutants S112X and those exploiting the loop 7-8 have been produced on a large scale (10 l) whereas the mutants of saturation K121X and L124X (single and double) have been obtained by a new fast method (expression in reduced volumes of 50 ml). The advantage of this small volume of expression (50 ml), associated to a short and one stage immobilisation system, is to make possible the simultaneous expression of about thirty different proteins per day. This is to compare with one protein per day on a large scale. This method required the study of parameters such as the temperature, agitation, aeration and extraction, which are known to influence the protein output. This new system constitutes a method of reference for the screening of protein diversity of streptavidin for the evolution of artificial metalloenzymes.

The asymmetric reduction of ketones by transfer hydrogenation in the presence of these mutants made it possible to obtain in certain cases chiral alcohols with an optical degree

of purity going up to 97 % *ee* in favour of the enantiomer (*R*) and 84 % *ee* in favour of the enantiomer (*S*).

The strong point of the system streptavidin-biotin lies in its potential evolution. The dissociation selectivity-activity has also the advantage of considering several other possible reactions (oxidation, epoxidation, CC coupling) by changing simply the organometallic residue for the designed mutants. The development of these reactions is also an ongoing activity within the group, for which the new mutants and expression protocol described in this thesis will prove useful.

Key words: artificial métalloenzymes, asymmetric catalysis, mutagenesis, biotin-streptavidin, catalyst's immobilization, diversity.

RESUME

La production de substances énantiomériquement pures est de plus en plus demandée pour des applications dans les domaines de la pharmacie, de l'agro-alimentaire et de la science des matériaux. Cette production a connu un nouvel essor avec la construction de métalloenzymes artificielles. Ce type de catalyseurs exploite l'environnement protéique (apportant de la sélectivité) et l'activité catalytique des métaux incorporés dans la cavité chirale de la protéine.

Dans ce travail, le système streptavidine-biotine a été utilisé comme outil en vue de la génération de nouvelles métalloenzymes artificielles. Pour exploiter d'une manière intensive la diversification de la streptavidine, près de 150 mutants (issus de mutations uniques et doubles) ont été obtenus par mutagenèse dirigée et de saturation à des positions proches du site catalytique. La trentaine de mutants S112X et ceux flexibilisant la boucle 7-8 ont été produits à grande échelle (10 l) alors que les mutants de saturation K121X et L124X (uniques et doubles) ont été obtenus par une nouvelle méthode rapide (expression en volumes réduits de 50 ml). L'avantage de ce petit volume d'expression (50 ml) couplé à un système d'immobilisation réduite en une seule étape, est de rendre possible l'expression simultanée d'une trentaine d'isoformes protéiques par jour contre 1 seul par jour à grande échelle. Cette méthode a nécessité une étude des paramètres (la température, l'agitation, l'aération, l'extraction) connus pour influencer les rendements protéiques. Au final ce système constitue une méthode de référence pour le criblage de la diversité protéique à débit élevé.

La réduction asymétrique de cétones par transfert hydrogénéant en présence de ces mutants a permis d'obtenir dans certains cas des alcools chiraux avec un degré de pureté

optique allant jusqu'à 97 % *ee* en faveur de l'énantiomère (*R*) et 84 % *ee* en faveur de l'énantiomère (*S*).

Le point fort du système streptavidine-biotine réside dans son potentiel d'évolution. La dissociation sélectivité-activité présente aussi l'avantage de permettre d'obtenir plusieurs autres réactions (oxydation, époxydation, couplage CC) simplement en changeant le résidu organométallique pour les mutants développés. Le développement de ces réactions est aussi une activité en progrès au sein du groupe pour laquelle les nouveaux mutants et le protocole d'expression décrits dans cette thèse vont être utiles.

Mots Clés : métalloenzymes artificielles, catalyse asymétrique, mutagenèse, biotine-streptavidine, immobilisation du catalyseur, diversité.

1. INTRODUCTION

1. 1. Préambule

La présence d'un catalyseur permet d'accélérer une transformation thermodynamiquement possible en modifiant son aspect cinétique. Dans le domaine de l'obtention de substances optiquement pures, on peut distinguer la catalyse enzymatique¹, la catalyse homogène² et l'organocatalyse³⁻⁵.

Récemment, une nouvelle direction dans le domaine de la synthèse énantiosélective a été engagée : la construction de métalloenzymes artificielles⁶⁻⁸. Ce type de catalyseurs exploite l'activité catalytique des métaux incorporés dans la cavité chirale de la protéine. Leur avantage porte sur la complémentarité de la sélectivité due à la protéine et de l'activité apportée par le métal en vue de la création de catalyseurs énantiosélectifs⁹. Cette thèse porte sur l'aspect biologique des métalloenzymes artificielles basées sur le système streptavidine-biotine.

1.2. La catalyse asymétrique et la chiralité

La chiralité est la propriété que possède une molécule de ne pas être superposable à son image dans un miroir. La condition de chiralité d'une molécule est sa disymétrie. De plus, des molécules ou des groupements fonctionnels plans peuvent par addition d'un substituant différent des substituants déjà présents conduire à des composés chiraux. C'est le cas des cétones aromatiques qui possèdent deux faces prochirales. Les deux faces prochirales peuvent être repérées selon les règles séquentielles, en *Re* ou *Si*, selon le sens dans lequel un

observateur voit la séquence décroissante des trois substituants du carbone sp^2 (Fig.1.1). La réduction de ces cétones peut conduire à des alcools chiraux possédant un centre asymétrique.

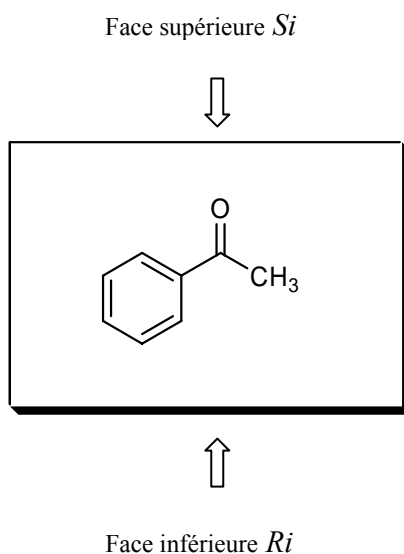


Figure 1.1. Prochiralité des cétones

Le mélange équimolaire de deux énantiomères constitue le mélange racémique. Les énantiomères qui sont les images non-superposables dans un miroir diffèrent par leurs effets physiologiques. Par exemple, le propoxyphène exerce un effet dépendant de la pureté énantiomérique : la forme (S, S) est un médicament anti-toux, tandis que la forme (R, R) de la même molécule est un analgésique administré afin d'apaiser des douleurs post-opérationnelles (Fig.1.2). Il apparaît donc que l'obtention de molécules énantiomériquement pures revêt une importance capitale dans des domaines comme la pharmacologie¹⁰. En 2005, sur les dix médicaments les plus vendus dans le monde, neuf étaient chiraux. Pour quatre d'entre eux, un seul des deux énantiomères était actif¹¹.



Figure 1.2. Les énantiomères du propoxyphène

Le besoin de disposer de principes actifs purs a abouti au « racemic switch »¹⁰ qui vise à remplacer un produit commercialisé en racémique par sa forme énantiomériquement pure. L'obtention de molécules énantiomériquement pures est devenue un domaine de recherche en pleine effervescence et une des démarches poursuivies est le développement des réactions catalysées par des inducteurs de sélectivité, dont la caractéristique commune est de favoriser l'obtention préférentielle d'un énantiomère par rapport à l'autre. Ces inducteurs asymétriques peuvent être des catalyseurs organométalliques, des enzymes ou des métalloenzymes artificielles. Une rétrospective des percées majeures dans la catalyse asymétrique va être présentée, les points forts des enzymes en tant que catalyseurs chiraux vont être développés et enfin nous allons nous focaliser sur les approches récentes de création des métalloenzymes artificielles en tant que catalyseurs chiraux puissants.

1.3. Les catalyseurs chiraux

1.3.1. Les catalyseurs organométalliques

L'utilisation de complexes de métaux de transition en chimie organométallique a permis de développer de nouvelles méthodes de synthèse très efficaces, principalement en catalyse asymétrique. La recherche dans ce domaine a été récompensée en 2001 par le Prix Nobel de chimie qui a été décerné à Ryoji Noyori¹² et Williams Knowles¹³ pour leur travail sur l'hydrogénation asymétrique, et à Barry Sharpless¹⁴ pour son travail sur l'oxydation asymétrique. Dans les années 70, Knowles a démontré qu'un complexe de Rhodium (Rh) contenant des ligands phosphines chiraux (*R*)-CAMP dont la structure est représentée dans la

figure 1.3 est capable de catalyser l'addition énantiosélective de l'Hydrogène moléculaire (hydrogénation asymétrique) sur l'une des faces prochirales d'une oléfine, générant ainsi un centre de chiralité avec une bonne énantiosélectivité¹⁵. L'énantiosélectivité d'une réaction est mesurée par l'excès énantiomérique (en pourcentage) qui se définit comme le rapport de la différence en quantité entre les formes (*R*) ou (*S*) sur la somme des deux (Fig. 1.4).

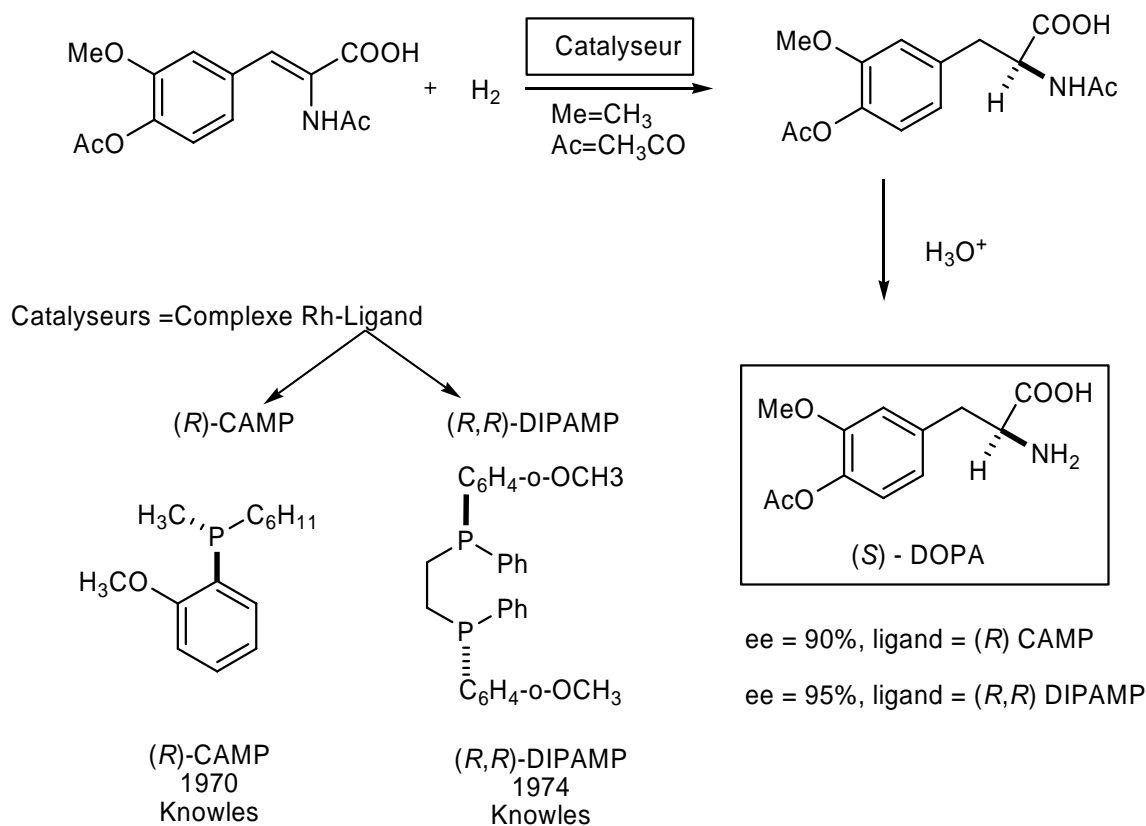


Figure 1.3. Obtention de la (*S*)-DOPA par le (*R*) CAMP¹⁵ et le (*R,R*)-DIPAMP^{16,17}

Le (*R*) CAMP, ligand chiral introduit par Knowles, catalyse une des étapes de la synthèse de la (*S*)-DOPA (principe actif dans un médicament à effet anti-Parkinson) avec un excès énantiomérique de 90 % en faveur de son énantiomère (*S*)¹⁵. En 1974, Knowles a créé un ligand analogue bis-phosphine, (DIPAMP)¹⁶, qui s'est révélé supérieur au CAMP pour la

préparation de la (*S*)-DOPA. Le DIPAMP, en catalysant l'obtention de la (*S*)-DOPA avec 95 % *ee*, a finalement remplacé le CAMP. Ces deux ligands représentent la première génération de ligands chiraux dont la chiralité est portée par les Phosphores (P). Les étapes de la synthèse de la (*S*)-DOPA ainsi que la structure de (*R*) CAMP et de (*R, R*) DIPAMP sont représentés dans la figure 1.4.

$$ee = \frac{\left| \left[R \right] - \left[S \right] \right|}{\left[R \right] + \left[S \right]} \times 100$$

Figure 1.4. Définition de l'excès énantiomérique

Dans la même période où Knowles a mis au point le CAMP, H. B. Kagan a créé le ligand chiral (*R, R*)-DIOP^{17, 18}. Ce ligand a donné naissance à une nouvelle génération de catalyseurs où la chiralité n'est pas portée sur les atomes de Phosphore (P), mais sur le squelette carboné du complexe. Le (*R, R*)-DIOP permet d'obtenir des résultats voisins de ceux du CAMP pour les mêmes réactions catalytiques réalisées par Knowles.

Un exemple d'hydrogénation asymétrique de l'acide *N*- α -acétamidocinnamique avec le (*R, R*)-DIOP permettant la formation de *N*-acétylphénylanine avec une pureté optique de 72 % en faveur de l'énantiomère (*R*) est représenté dans la figure 1.5¹⁷.

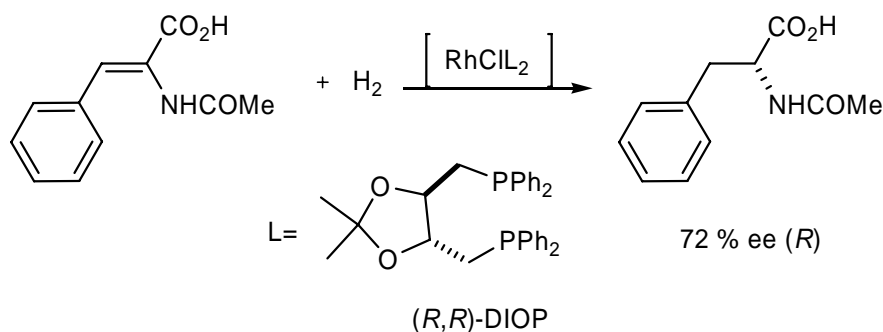


Figure 1.5. Hydrogénation de l'acide *N*- α -acétamidocinnamique avec le DIOP¹⁷

Par la suite (dans les années 80), Noyori et Takaya¹⁹ ont introduit en catalyse un ligand portant une chiralité axiale (le BINAP) dont la structure est présentée dans la figure.1.6. Ce ligand a permis la préparation de nouveaux complexes de Ruthénium (Ru) pour l'hydrogénation de divers alcènes et de cétones avec d'excellents excès énantiomériques. Le BINAP et ses dérivés ont marqué un tournant dans l'hydrogénation asymétrique de cétones fonctionnalisés²⁰.

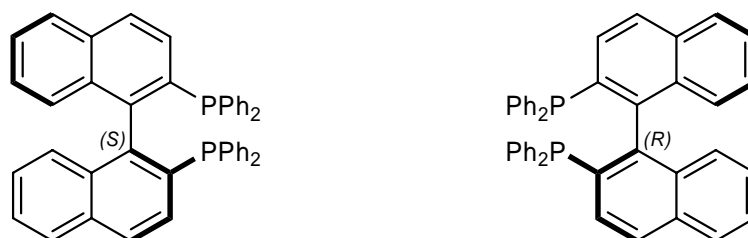


Figure 1.6. Structure de (*S*) et (*R*) BINAP¹⁹

Les catalyseurs de type [RuL₂-BINAP] sont actifs et hautement sélectifs pour des cétones possédant un groupe fonctionnel ou un hétéroatome proche (de type β-cétoester α-hydroxycétones), capable de se fixer sur le centre métallique. Par exemple, le 4-chloro-3-hydroxyester chiral, précurseur du GABOB²¹ (effet anti-épileptique), est obtenu en bonne quantité (rendement de 97%) et très sélectivement (97% *ee*) en 4 minutes par le catalyseur [RuL₂-BINAP]. Pour des cétones ne possédant pas de groupes fonctionnels, le couplage du BINAP à un deuxième ligand chiral de type diamine (mis au point en 1995 par Noyori) est efficace pour leur réduction en alcools optiquement actifs²². Un exemple d'hydrogénation asymétrique de l'acétophénone (dérivé carbonyle non fonctionnalisé) est présenté dans la

figure 1.7. Le BINAP représente aujourd'hui un enjeu commercial certain puisqu'il est utilisé lors de la fabrication des motifs présents dans certains antibiotiques comme les carbapénèmes et l'obtention de diverses fragrances comme le menthol^{23, 24}.

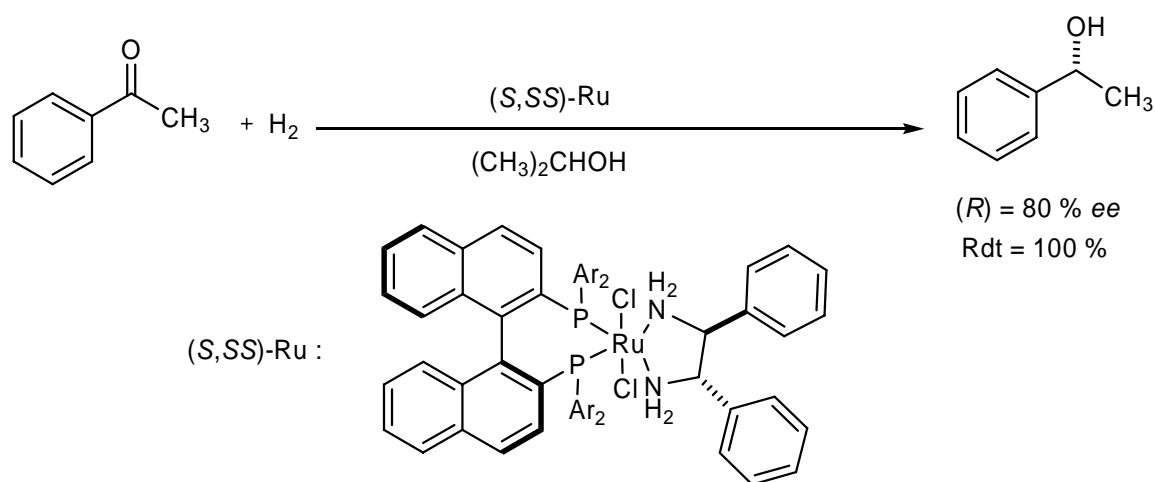
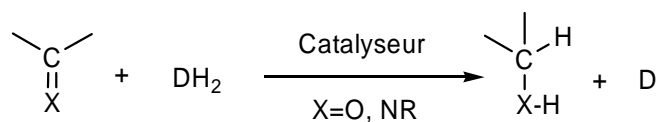


Figure 1.7. Hydrogénation de l'acétophénone par le complexe BINAP/Diamine¹²

La réduction des liaisons doubles de type (C=O) peut être effectuée par une réaction alternative à l'hydrogénation asymétrique. Il s'agit du transfert hydrogérant. Tandis que l'hydrogénation consiste en l'activation de l'Hydrogène moléculaire (H₂) qui est ajouté au métal, le transfert hydrogérant, lui se réfère à une réaction où une molécule organique stable (DH₂=donneur de l'Hydrogène) transfère formellement H₂ sur un substrat (accepteur) en présence d'un catalyseur. Le principe général de cette réaction est présenté dans la figure 1.8. Le 2- propanol et l'acide formique, sous forme d'azéotrope avec la triéthylamine, sont les donneurs d'hydrures les plus couramment utilisés²⁵.



DH₂ = donneur d'Hydrogène

Figure 1.8. Principe général de transfert hydrogérant²⁵

Le transfert hydrogérant est une technique de réduction douce, peu onéreuse et qui présente l'avantage d'utiliser une source d'Hydrogène moins dangereuse que l'Hydrogène moléculaire (gaz explosif). A la différence de l'hydrogénation, elle est efficace pour une échelle de production limitée car ses « TON » et « TOF » demeurent bas. Toutes ces caractéristiques font du transfert hydrogérant une technique toute indiquée pour des expériences dans un environnement académique. Généralement le transfert hydrogérant peut être effectué par deux mécanismes différents entre le donneur d'Hydrogène (DH₂) et l'accepteur (le plus souvent une cétone). Le premier type implique un transfert d'Hydrogène (H₂) directement sur l'accepteur si les deux (l'Hydrogène et l'accepteur) sont à proximité du centre métallique. C'est un mécanisme concerté, mettant en jeu un état de transition à six centres pour le 2-propanole comme donneur d'Hydrogène. Il est appelé aussi le transfert hydrogérant direct de type « Meerwein-Ponndorf-Verley » (MPV)²⁶. La deuxième voie du transfert hydrogérant passe par la formation d'un complexe intermédiaire hydrure. C'est pourquoi ce type de mécanisme est appelé transfert hydrogérant indirect. L'intermédiaire (l'hydrure) réduit le dérivé carbonyle prochiral. Avec les métaux de transition, principalement le Ruthénium (Ru), le Rhodium (Rh) et l'Iridium (Ir), c'est la formation de l'hydrure qui est favorisée²⁷. Parmi les complexes performants de transfert hydrogérant indirect, ce sont ceux du Ruthénium (Ru) en tabouret de Piano qui sont les plus efficaces. Le transfert de l'Hydrogène par l'intermédiaire (l'hydrure) sur une cétone au cours du transfert hydrogérant est représenté dans la figure 1.9.

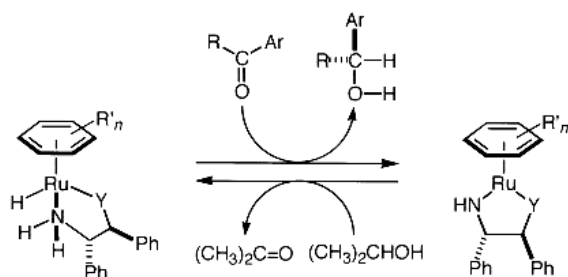


Figure 1.9. Transfert hydrogénant des cétones par des complexes de Ruthénium (II) en tabouret de Piano^{28, 29}

Le transfert hydrogénant indirect comprend un mécanisme catalytique à 5 étapes. Tous les intermédiaires ont été isolés par Noyori et son équipe ce qui a permis de mieux comprendre le mécanisme catalytique^{28, 29} : le complexe catalytiquement actif est le Ruthénium (Ru (II)) à 18 électrons qui oriente et active le substrat dans l'état de la transition (ET). L'approche du substrat (cétone prochiral) par sa face *Si* ou *Re* par rapport à ce complexe intermédiaire détermine la configuration du produit libéré³⁰. La stabilisation de l'état de transition (ET) *Si* s'explique par des interactions entre les électrons π du noyau aromatique du substrat et le proton CH du η^6 arène du ligand. L'approche du substrat par sa face *Re*, positionne le proton CH et le groupement -CH₃ en face l'un de l'autre (*Ri*). Cet état de la transition est défavorable car l'emplacement stérique n'implique pas des interactions stabilisantes³¹. Les deux états de transitions sont présentés dans la figure 1.10.

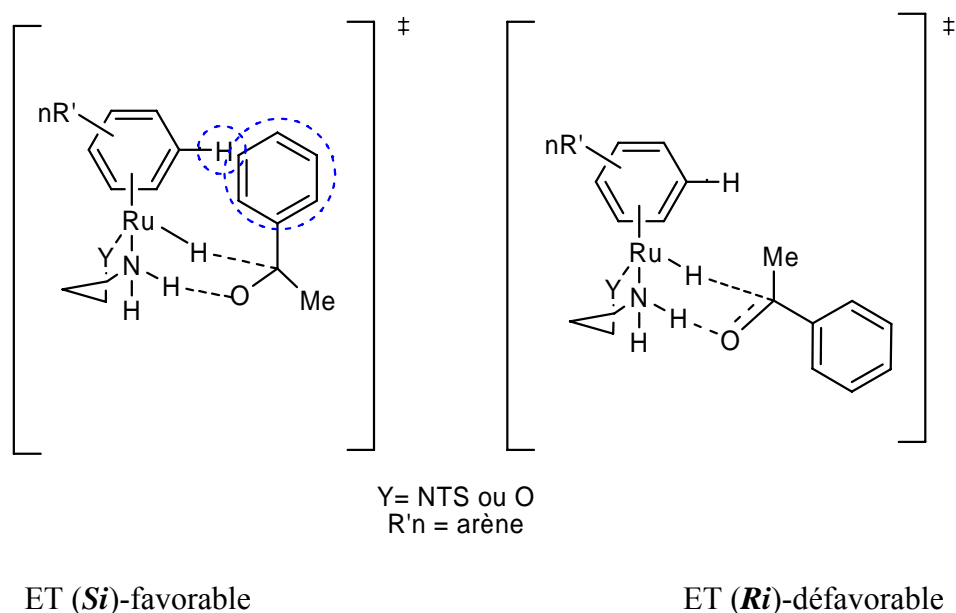


Figure 1.10. Etats de transitions impliqués dans le mécanisme énantiodiscriminatif des cétones aromatiques³⁰

1.3.2. Les enzymes en tant que catalyseurs chiraux

L'analogie des organocatalyseurs pour la réduction asymétrique des liaisons insaturées de type (C=O) dans le monde vivant est la famille des alcools déshydrogénases³². Les alcools déshydrogénases catalysent le transfert hydrogénéant des dérivés carbonylés en alcools par l'intermédiaire de leur cofacteur NADH ou NADPH qui se retrouve oxydé à la fin de la réaction. Des réactions biochimiques de ce type sont hautement stéréosélectives. Une réduction asymétrique par des biocatalyseurs (alcools déshydrogénases) est représentée dans la figure 1.11.

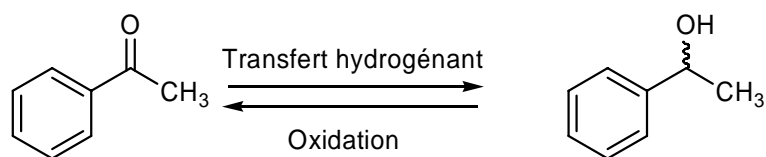


Figure 1.11. Réduction énantiosélective des cétones par des alcools déshydrogénases³²

La majorité des alcools déshydrogénases (ADHs)³² nécessite la présence du cofacteur NAD(P)⁺ qui est assez instable et cher employé en quantités molaires. C'est pourquoi, plusieurs voies de régénération du cofacteur ont été proposées (Fig.1.12). Les deux méthodes de régénération sont la méthode du substrat couplé (co-substrat) et la méthode de la deuxième enzyme couplée (co-enzyme) dont la caractéristique commune est de mener une réaction en parallèle régénérant le NAD(P)⁺ à partir le NADPH. Le NAD(P)⁺ régénéré alimente l'activité de l'alcool déshydrogénase dans la réaction principale^{32, 33}.

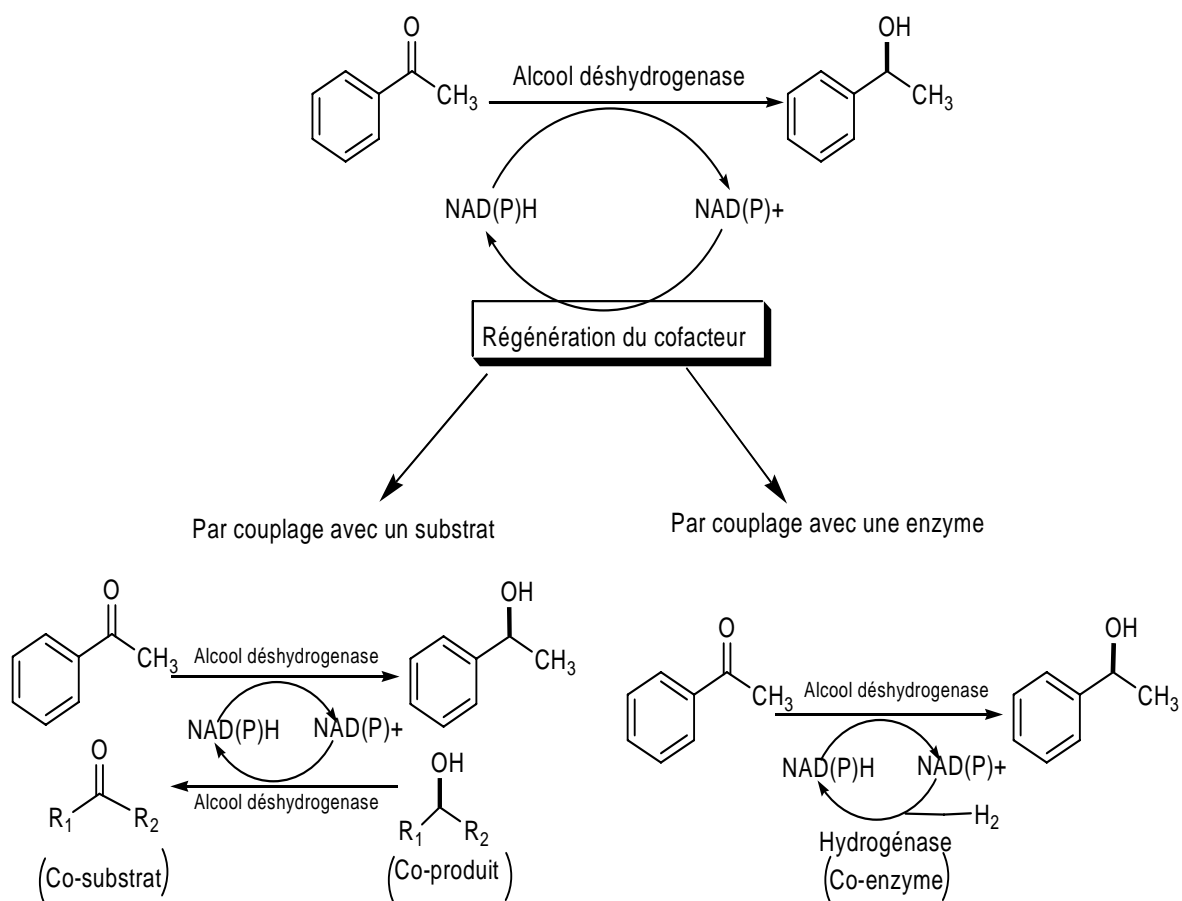


Figure 1.12. Recyclage du cofacteur des alcools déshydrogénases³³

Dans les années 80, une nouvelle approche de la catalyse enzymatique a profité d'un certain développement : l'utilisation des microorganismes, exprimant des enzymes recombinantes (Fig.1.13) comme catalyseurs. L'intérêt clé de ce type de catalyse est dans le gain de temps car les microorganismes ne nécessitent pas l'utilisation d'Hydrogène gazeux, ce qui rend son application aisée à l'échelle industrielle. Un schéma simplifié d'un procédé industriel avec des bactéries *E.coli* exprimant l'alcool déshydrogénase recombinante est présenté dans la figure 1.13. La sélectivité de l'alcool déshydrogénase exprimée (*S*) ou (*R*) détermine la configuration absolue de l'alcool obtenu : (*S*) ou (*R*)^{34, 35}.

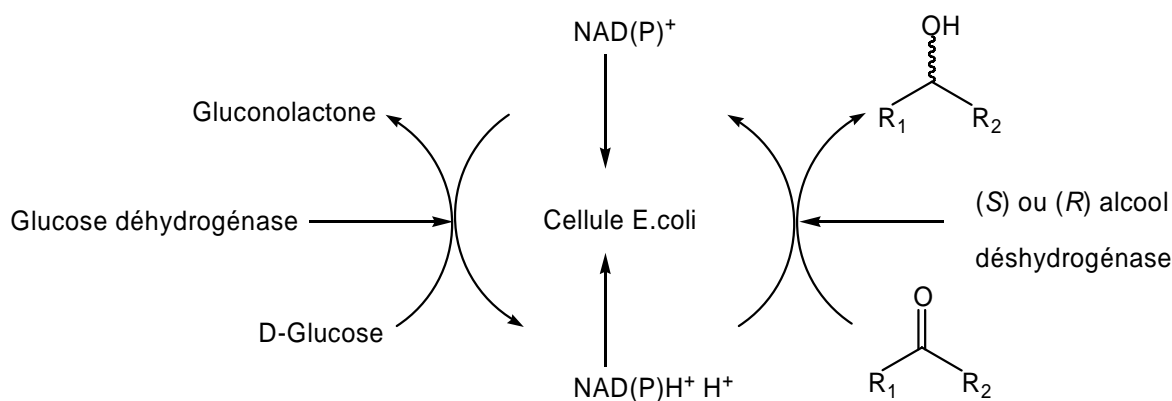


Figure 1.13. Hydrogénation asymétrique par des microorganismes ³⁵

1.3.2.1. Optimisation des enzymes

Les enzymes naturelles présentent plusieurs inconvénients tels que l'instabilité, la haute spécificité pour un seul substrat, le manque de flexibilité par rapport aux conditions opérationnelles (pH, température, etc...). L'optimisation des enzymes est donc une étape importante et fait l'objet de nombreuses recherches visant à améliorer les performances catalytiques³⁶⁻³⁸. Les améliorations peuvent toucher diverses caractéristiques indispensables pour le procédé industriel à savoir: la résistance thermique, la tolérance par rapport aux solvants organiques, une sélectivité accrue, une gamme de substrats plus importante. A part quelques exemples d'enzymes naturelles implémentées à des fins industrielles comme les protéases (par exemple la thermolysine impliquée dans la synthèse de l'aspartame), ce groupe de biocatalyseurs demeure modeste par rapport aux enzymes issues d'une optimisation génétique³⁹.

Nous allons donc développer dans les paragraphes suivants les méthodes de biologie moléculaire permettant l'optimisation des enzymes.

1.3.2.2. Optimisation des enzymes par la mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée est une technique de biologie moléculaire moderne qui permet la création d'une mutation à un endroit précis au sein de la molécule d'ADN⁴⁰. Cette méthode, mise au point par Michael Smith, rend possible la prédétermination d'un changement au niveau du gène qui se répercute sur le produit (la protéine). La mutagenèse dirigée a été précédée par des études modèles de la stabilité et de la spécificité des oligonucléotides duplex pour des séquences définies. Le but a été d'étudier la possibilité par des oligonucléotides spécifiques d'identifier des séquences ciblées grâce à la règle de la complémentarité entre les bases de Watson-Crick.

Le potentiel de la mutagenèse dirigée touche la science des protéines en permettant des études sur la relation structure-fonction. Comme la mutagenèse dirigée vise un changement spécifique, elle nécessite la connaissance de la séquence précise du gène. C'est pourquoi cette approche rationnelle est le plus souvent précédée par des connaissances structurales. L'impact de cette méthode dans le domaine du génie génétique a été d'une telle importance qu'en 1993 son auteur, Michael Smith, a partagé le Prix Nobel en chimie avec Kary Mullis qui a conçu la PCR^{40, 41}.

La figure 1.14 présente les étapes-clés dans le « design » d'une séquence mutée par mutagenèse dirigée. Le point de départ est un gène cloné dans un plasmide. Connaissant la séquence du gène codant la protéine, des amorces porteuses de la mutation au niveau du codon d'intérêt sont dessinées (Fig. 1.14 B). Après la dénaturation (Fig. 1.14 A) du plasmide lors de la PCR, les amorces s'hybrident avec la matrice en permettant ainsi la synthèse du brin complémentaire par la polymérase. Les plasmides obtenus par PCR portent la mutation et sont utilisés pour la transformation de bactéries qui plus tard expriment la protéine mutée. Plusieurs modifications du principe de la mutagenèse dirigée ont été publiées⁴²⁻⁴⁵. Une

optimisation de la mutagenèse dirigée a été mise au point dans le laboratoire de Dr. Jean-Louis Raymond à l'Université de Berne en Suisse. Lui et son équipe ont démontré que des amorces partiellement chevauchantes permettent une mutagenèse dirigée plus fiable car l'efficacité de l'hybridation des amorces mutagènes avec la matrice est plus importante ce qui réduit la formation de dimères d'amorces. En plus, ils ont introduit l'idée de l'insertion parallèle d'une mutation silencieuse, générant un site de restriction permettant ainsi une analyse fiable des séquences mutées obtenues⁴⁶. Un profil de digestion positif par rapport à cette mutation silencieuse suggère l'insertion de la mutation d'intérêt car les deux mutations sont apportées par la même paire d'amorce⁴⁶.

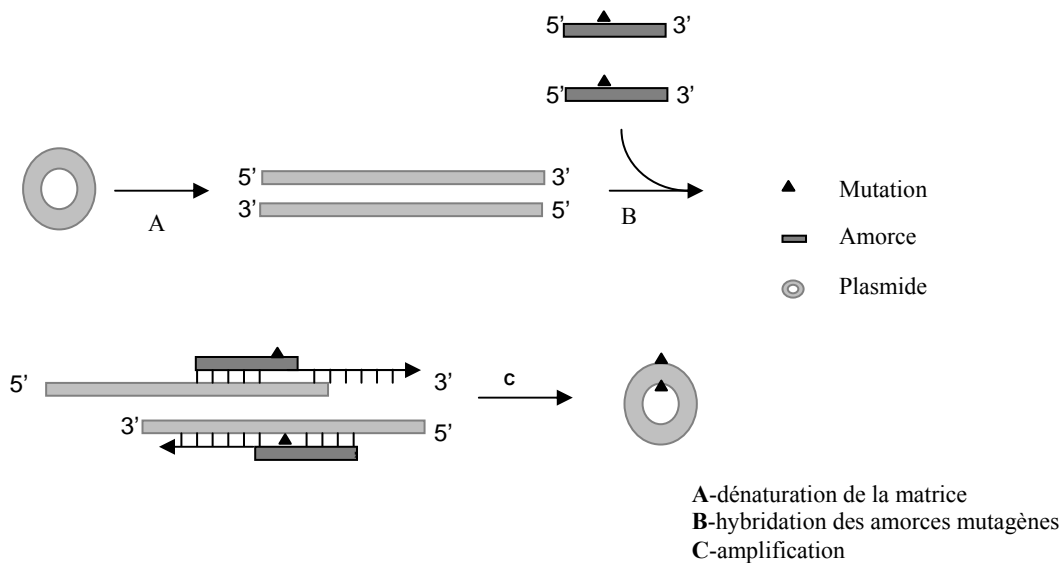


Figure 1.14. Etapes dans la mutagenèse dirigée⁴⁷

La liste des succès dans l'optimisation des enzymes par la mutagenèse dirigée est longue⁴⁸⁻⁵⁰.

Des caractéristiques enzymatiques améliorées comme l'augmentation du nombre de substrats,

le changement du mécanisme enzymatique, l'augmentation de la stabilité, ainsi que la compréhension des mécanismes enzymatiques ont été rapportés⁵¹. Par exemple :

- L'élimination du résidu asparagine dans l' α -amylase et l'introduction d'un acide aminé plus rigide comme la proline a amélioré la thermostabilité de cette enzyme. L'ajout des contacts hydrophobes additionnels chez la 3-isopropylmalate déshydrogenase et la formiate déshydrogenase de *Pseudomonas sp.* s'est révélé bénéfique pour la thermostabilité⁵¹.
- La création de ponts disulfures dans le lysozyme par l'introduction de cystéines par mutagenèse dirigée a amélioré sa stabilité thermique. Un bon exemple de compréhension des bases moléculaires de la stéréosélectivité a été publié⁵¹. L'étude de deux différentes lipases par mutagenèse dirigée a abouti à des stéréosélectivités inversées.

1.3.2.3. Optimisation des enzymes par l'évolution dirigée⁵²⁻⁶⁰

L'évolution dirigée est une méthode qui exploite la puissance de la sélection darwinienne, pour développer des protéines avec des propriétés désirables. Cette méthode intègre deux étapes. La première consiste à diversifier la séquence génétique codant la protéine à améliorer. Les séquences diversifiées forment une librairie codant des protéines différentes qu'il faut alors dans la deuxième étape soumettre à un criblage ou à une sélection à haut débit, qui identifie des formes supérieures, pour une propriété d'intérêt par rapport à la protéine sauvage.

1.3.2.3.1. Méthodes de diversification des gènes

Les avancées récentes de la biologie moléculaire ont permis l'apport de mutations au sein des séquences génétiques d'intérêt. Afin de randomiser des séquences, plusieurs techniques ont été mises au point comme la PCR aléatoire, la mutagenèse de saturation, le DNA-shuffling, le RACHITT, le RPR et le StEP. Chacune de ces méthodes va être présentée avec la référence associée dans les paragraphes suivants.

A la fin des années 1980 et au début des années 1990, Leung, Chen et Goeddel proposent la PCR aléatoire⁶¹. Par variation de la concentration en Magnésium du milieu réactionnel, ajout de sels ou utilisation d'un excès d'un des quatre désoxyribonucléotides, la fiabilité de la polymérase est diminuée. Ceci se traduit par l'apport des mutations aléatoires dans les copies amplifiées. Plusieurs optimisations d'enzymes ont été rapportées après randomisation de leurs gènes par la PCR aléatoire⁶². Par exemple, l'apport de diversité au gène de la lipase par cette technique a permis la hausse de la sélectivité de l'enzyme correspondante à 81 % *ee* pour le produit (*S*) contre 2 % de sélectivité (*S*) pour l'enzyme sauvage⁵⁹. L'introduction de diversité par la PCR aléatoire s'est révélée aussi bénéfique pour l'augmentation du nombre de substrats pour les enzymes. Par exemple, l'enzyme KDPG (D-2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate) aldolase type sauvage catalyse une réaction hautement spécifique pour une réaction réversible sur le (*R*) KDPG comme substrat. Après plusieurs cycles de PCR aléatoire et sélection, Wong et collaborateurs ont obtenu une KDPG aldolase optimisée capable de transformer aussi bien le (*S*) que le (*R*) KDPG⁵³.

La PCR aléatoire introduit des mutations à plusieurs positions, mais elle ne permet pas d'obtenir l'ensemble des nucléotides codant les vingt acides aminés à une seule position. Pour

cette raison, des expériences de PCR aléatoire sont complétées par la mutagenèse de saturation.

La mutagenèse de saturation permet la création d'une librairie de mutants contenant toutes les mutations possibles à une ou à plusieurs positions cibles dans la séquence du gène. En combinaison avec un criblage à haut débit, la mutagenèse de saturation a été utilisée avec succès pour l'amélioration de caractéristiques comme la thermostabilité^{63, 64} et l'énantiosélectivité⁶⁵.

Le développement des techniques d'apport de diversité a continué son essor en cherchant non seulement à diversifier des gènes isolés, mais à pouvoir aussi recombinaison plusieurs séquences génétiques (dites parentales). En 1994, Stemmer a conçu le brassage moléculaire (DNA-shuffling)⁶⁶. En digérant une librairie de plusieurs gènes homologues par la DnaseI, il est possible de générer des fragments de longueur différente. Ces fragments sont ensuite soumis à une PCR sans amorces, où ils s'hybrident entre eux, grâce à l'homologie des séquences de départ. Les gènes sont reconstitués avec des différences séquentielles. Stemmer a appliqué cette technique sur le gène de la céphalosporinase de 4 espèces différentes de microorganismes. La diversité accrue au niveau génétique explique le changement dramatique des caractéristiques observées après le brassage moléculaire : plusieurs clones obtenus induisent une résistance élevée d'*E.coli* au moxalactame (antibiotique). Deux clones ont acquis une résistance à plusieurs antibiotiques de la famille des antibiotiques β - lactames.

Comme cette méthode est basée sur la nécessité d'homologie séquentielle elle n'est donc pas appropriée pour le croisement de gènes phylogénétiquement éloignés. En 2001 Wayne M. Coco enlève cette contrainte par l'introduction de RACHITT^{67, 68} (« random chimeragenesis on transient templates », une technique dérivée de DNA-shuffling. Elle permet plus de recombinaisons qui se traduisent par une grande diversité des séquences obtenues. Sa puissance a été démontrée à travers l'optimisation de la famille des gènes DBT-MO

(dibenzothiophène monooxygénase) qui catalysent la première étape limitante dans la biodesulfurization⁶⁸. Cette voie biochimique est utilisée pour la production des sulfoxides chiraux et des intermédiaires des alkyl sulfonates. Les recombinants possèdent une vitesse de réaction plus élevée que celle déterminée par les produits des gènes de départ.

Plus récemment (1998-1999), Arnold a introduit deux nouvelles techniques de recombinaisons génétiques : le StEP⁶⁹ (« staggered extension of the template during PCR ») et le RPR⁷⁰ (« random hexamer oligonucleotide primers ») :

- Le StEP est basé sur l'emploi de temps raccourcis pour l'hybridation et l'extension des amorces utilisées pour l'amplification des séquences à randomiser. Les produits tronqués sont dissociés de la matrice et réhybridés d'une façon aléatoire aux gènes parentaux ce qui se traduit par des recombinaisons.
- Le RPR utilise des amorces de six nucléotides aléatoirement choisis pour la polymérisation. Le produit d'une telle amplification fournit une collection d'oligomères. Leurs séquences sont diversifiées par l'amplification avec une polymérase à faible fiabilité. Les oligomères s'hybrident entre eux ou avec des séquences d'intérêt.

L'enjeu majeur dans l'évolution dirigée est la reconnaissance du mutant optimisé issu de la diversification de la séquence génétique. L'identification de l'enzyme supérieure à l'enzyme de type sauvage est effectuée par la sélection et le criblage des protéines diversifiées.

1.3.2.3.2. Sélection et criblage des protéines diversifiées^{55, 71, 72}

En général, la sélection est liée à la survie ou au développement accéléré des clones ayant acquis la propriété désirée alors que le criblage s'impose comme la seule option pour identifier une enzyme mutée au cas où la propriété d'intérêt ne peut être liée à la survie. Des enzymes diversifiées peuvent être criblées en terme d'énantiosélectivité à travers la séparation chirale des produits obtenus avec des techniques chromatographiques comme la « HPLC » et la « GC »⁷³.

Plusieurs systèmes de criblage de l'énantiosélectivité des enzymes sont présentés dans la référence associée⁵².

1.3.2.4. Enzymes immobilisées⁷⁴⁻⁷⁸

Après l'optimisation des enzymes par mutagenèse ou évolution dirigée elles sont implémentées dans des procédés industriels. En vue d'accroître leur performance, l'immobilisation des enzymes sur des supports solides peut se révéler bénéfique par rapport à leur régénération, modulation de l'énantiosélectivité ou purification après expression⁷⁴. D'une façon générale, les enzymes immobilisées sont composées de deux partenaires : partie noncatalytique (« carrier ») et partie catalytique compatible avec le contexte du procédé industriel.

Parmi les facteurs influençant directement les performances de l'enzyme immobilisée, on peut citer: les dimensions des pores de support déterminant la surface accessible, le microenvironnement, les agents stabilisants hydrophiles, leur encapsulation⁷⁴. Par exemple, l'immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* a été effectuée par plusieurs techniques : adsorption ionique, adsorption sur « PEI-coated » supports, immobilisation covalente sur des

supports glycéraldehydes, adsorption interfaciale sur des supports hydrophobes⁷⁹. Ces conditions différentes déterminent diverses orientations et microenvironnements. Les propriétés catalytiques (activité, spécificité, et énantiosélectivité) des différents types de lipases immobilisées diffèrent dramatiquement. La lipase immobilisée⁷⁶ par adsorption interfaciale sur des supports hydrophobes a démontré plus grande affinité pour le substrat éthyle butyrate, tandis que la même lipase, immobilisée sur « PEI-coated » support par une adsorption ionique est plus active par rapport à l'hydrolyse des substrats ioniques comme la méthyle mandelate. La lipase immobilisée d'une façon covalente sur le support présente une tendance d' énantiosélectivité (*R*). La même lipase, immobilisée par adsorption interfaciale sur des supports hydrophobes manifeste une tendance d' énantiosélectivité (*S*) pour l'hydrolyse du même substrat⁸⁰. En plus, il a été démontré qu'une enzyme non sélective comme la chloroperoxydase se transforme en enzyme stéréosélective après son immobilisation⁸¹. L'enzyme immobilisée est robuste si les parties non catalytiques et catalytiques répondent aux besoins de l'application spécifique⁷⁴.

1.3.3. Comparaison de la catalyse enzymatique et la catalyse organométallique

Dans les paragraphes précédents (§1.2 et §1.3), le potentiel de la catalyse organométallique et enzymatique comme des outils d'obtention de produits énantiomériquement purs à haute valeur ajoutée a été présentée. Il faut aussi préciser que bien qu'ayant évolués de manière indépendante, ces deux types de catalyse sont traditionnellement considérés comme complémentaires en termes d'éventail de substrats, de conditions opérationnelles, de mécanisme énantiosélectif. Leurs avantages et désavantages sont présentés dans le tableau 1.1.

Critère de comparaison	Catalyse organométallique	Catalyse enzymatique
Nombre de substrats	Elevé	Faible
Sélectivité	Faible	Elevée
Efficacité (« TON », « TOF »)	Faible	Elevée
Tolérance aux solvants	Elevée	Faible
Discrimination des groupements fonctionnels	Faible	Elevée
Répertoire de réactions	Elevé	Faible
Deuxième sphère de coordination	Mal définie	Bien définie
Optimisation	Chimique	Génétique

Tableau 1.1. Avantages et désavantages de la catalyse homogène et enzymatique⁷

Une observation du tableau comparatif de la catalyse organométallique homogène et de la catalyse enzymatique permet de noter que les deux systèmes présentent des avantages ainsi que des inconvénients et présentent des complémentarités par rapport aux performances catalytiques.

1.3.4. Génération de métalloenzymes artificielles

Cette méthode consiste à introduire un complexe organométallique, qui assure l'activité catalytique, dans une protéine qui apporte la sélectivité par son environnement chiral structuré⁸³⁻⁸⁷. Ces catalyseurs hybrides semblent intégrer des caractéristiques bénéfiques provenant des deux systèmes catalytiques que nous avons décrits plus haut.

Plusieurs approches vers la création de métalloenzymes artificielles ont été publiées par Sheldon⁸⁸, Watanabe⁸⁹, Lu⁹⁰, Reetz⁹¹, Gross⁹², Kazlauskas⁹³, Roelfes et Feringa^{94,95}.

Deux options pour la création des métalloenzymes artificielles peuvent être mises en œuvre : l'ancrage covalent entre un complexe organométallique et une protéine et l'incorporation supramoléculaire d'une entité catalytique au sein d'une protéine.

1.3.4.1. Ancrage covalent entre un complexe organométallique et une protéine

C'est E.T. Kaiser⁹⁶ qui, le premier, a modifié chimiquement le site actif d'une protéine (la papaïne) pour y accrocher un analogue de coenzyme (une flavine). De cette manière il lui a conféré une fonctionnalité nouvelle, celle d'oxydoréductase⁹⁶⁻⁹⁸. Après l'implémentation de la mutagenèse dirigée, il a été possible de substituer des acides aminés naturels du site actif par une lysine ou une cystéine, ces deux acides aminés permettant l'accrochage covalent du complexe organométallique. Par exemple, la mutagenèse dirigée de la subtilisine a permis l'obtention d'un résidu cystéine dont le groupement SH est utilisé pour l'accrochage d'un motif chimique via un pont disulfure. L'introduction d'une cystéine au sein de la subtilisine, (une protéase) a permis d'y accrocher un motif chimique (CO₂-CH₂-C₆H₅). La subtilisine

modifiée manifeste une nouvelle activité (ligase peptidique) et insère des acides aminés sur des acides aminés estérifiés⁹⁹.

Avec une démarche similaire, Distefano a accroché un complexe de Cuivre(II)-1,10 phénanthroline à la protéine « ALBP » (« Adipocyte lipid binding protein ») qui possède une unique cystéine dans le site actif¹⁰⁰. La métalloenzyme obtenue hydrolyse énantiosélectivement les esters activés. Le complexe accroché et la réaction catalysée sont présentés dans la figure 1.15.

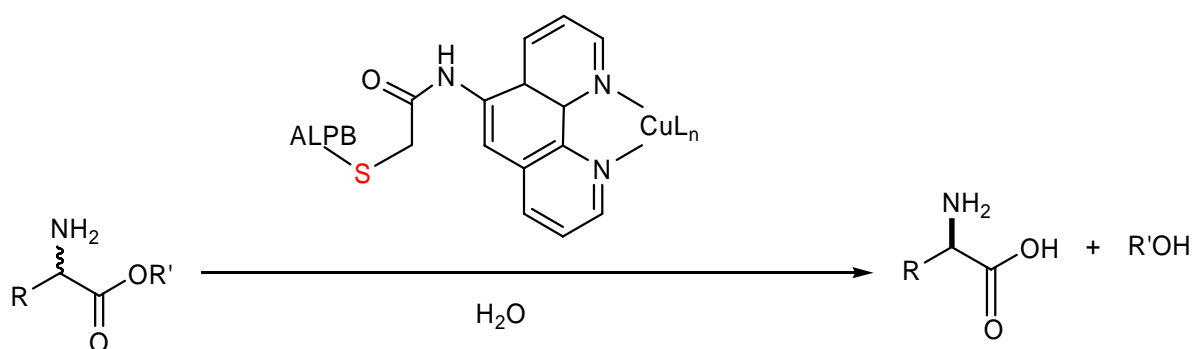


Figure 1.15. Résolution cinétique d'ester d'acide aminé à l'aide de Cuivre (II) accroché dans l'« ALBP »

Il est évident que l'ancrage covalent est une stratégie permettant d'exploiter la cavité protéique afin d'y introduire n'importe quel motif catalytique non naturel compatible avec sa taille. Cependant, cette stratégie nécessite le choix d'une protéine possédant naturellement un acide aminé capable de former une liaison covalente ou bien le cas échéant de la créer via la mutagenèse dirigée. Il faut noter également que la modification chimique de macromolécules n'est pas triviale car une protéine peut posséder plusieurs sites d'ancrage, rendant difficile le contrôle de la réactivité du motif à insérer.

Une deuxième approche permettant la création des métalloenzymes artificielles enlève cette contrainte car elle exploite des interactions non covalentes permettant un ancrage supramoléculaire.

1.3.4.2. Incorporation non covalente d'un catalyseur dans une protéine

C'est en 1978, que Whitesides¹⁰¹ propose pour une première fois l'incorporation non covalente d'une entité catalytique dans une protéine. Il s'agit de l'exploitation de l'affinité naturelle entre l'avidine et la biotine. En dérivatisant la biotine par un ligand diphosphine achiral, il a incorporé le complexe biotinylé du Rhodium (Rh) dans l'avidine. Ce catalyseur supramoléculaire catalyse l'hydrogénation de l'acide N- α -acétamidoacrylique avec un excès énantiomérique de 44 % en faveur de l'énantiomère (*S*)¹⁰¹. La réaction est présentée dans la figure 1.16.

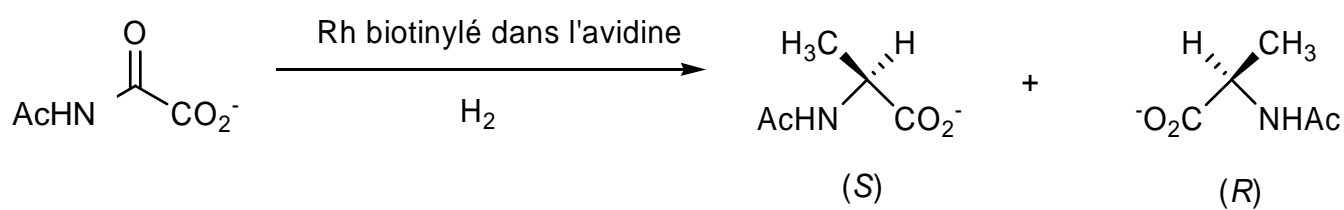


Figure 1.16. Hydrogénation catalytique de l'acide N- α -acétamidoacrylique par un complexe de Rhodium (Rh) inséré dans l'avidine¹⁰¹

Sur cette base, Chan¹⁰² a proposé un système similaire pour l'hydrogénation de l'acide itaconique en introduisant un complexe chiral Rh-pyrphos dans l'avidine. Ces résultats ont montré que l'hydrogénation asymétrique de l'acide itaconique est significativement influencée par la présence de protéines. Il a démontré également que la modification de la température de 22 °C à 40 °C change la configuration absolue du produit majoritaire en passant de 48% (*R*) à 20 % (*S*).

Y. Watanabe utilise la cavité chirale de l' apo myoglobine pour y introduire différents cofacteurs non naturels de type base de Schiff (Mn ou Cr)⁸⁹: Il part de la holo myoglobine

(l'enzyme naturelle) qui contient le Fer (Fe) comme cofacteur. Après l'élimination du Fer (le cofacteur naturel), il réintroduit dans la cavité chirale de l'apo myoglobine des cofacteurs non naturels de type base de Schiff (Mn, Cr ou Fe) en créant ainsi une myoglobine artificielle. Le principe général de ce mécanisme est schématisé dans la figure 1.17.

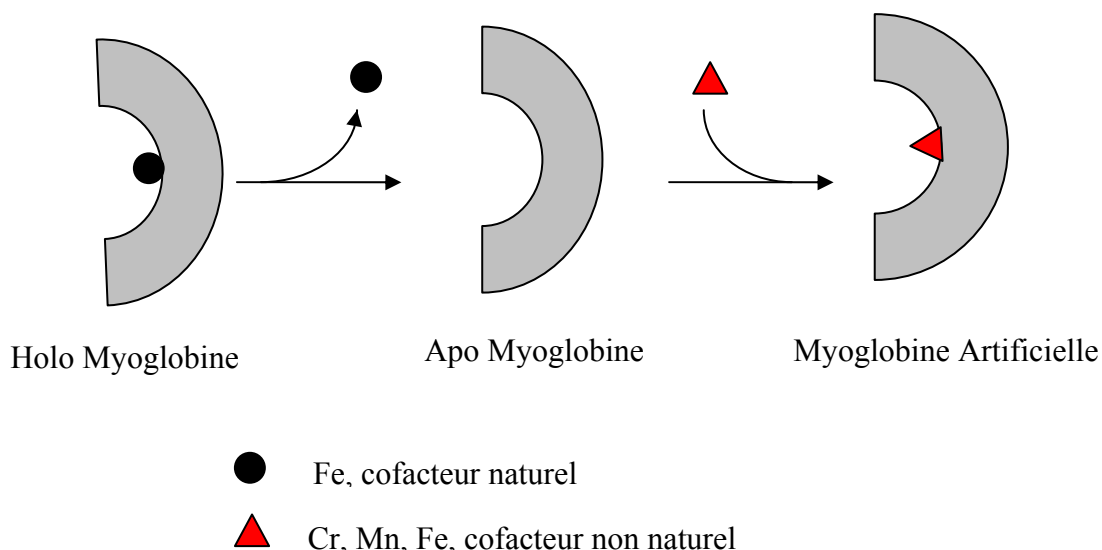


Figure 1.17. Création de métalloenzymes artificielles à la base de la myoglobine⁸⁹

Après l'introduction d'un complexe non naturel (3-3-Salen-Mn (III)) dans la cavité de la myoglobine, le métal est coordonné avec la Histidine 93 (His 93) de la myoglobine. Cette métalloenzyme semi-synthétique est alors utilisée pour la sulfoxydation du thioanisole⁸⁹. Les résultats obtenus montrent que ces métalloenzymes manifestent une sélectivité, même si c'est avec des excès énantiomériques modestes 33 % (*S*) à 17 % (*R*). Toujours dans le but d'exploiter la cavité protéique, Yi Lu⁸² a récemment inséré un catalyseur de type Mn-Salen de manière covalente via des ponts disulfures au sein de l'apo myoglobine mutée. Pour cet accrochage covalent il exploite un double ancrage⁹⁰ du catalyseur dans la cavité de la protéine. Les métalloenzymes obtenus sont utilisées pour la sulfoxydation du thioanisole. Les

excès énantiomériques obtenus sont plus importants que ceux de Watanabe laissant à penser que le double ancrage aboutit à un meilleur contrôle sur la position du complexe organométallique dans la cavité protéique d'où une sélectivité plus importante.

Z. Gross⁹² utilise la BSA, la HSA, et la PSA (albumine de sérum bovine, humaine et porcine) comme protéine hôte pour fixer des complexes de corolles amphiphiles afin de former des catalyseurs énantiosélectifs en sulfoxydation du thioanisole. Ces métalloenzymes artificielles catalysent avec de bons excès énantiomériques : 74 % ee (*S*) et 16 % de conversion avec la BSA et 65 % ee (*S*) et 98 % de conversion avec la PSA.

Comparé à l'ancrage covalent, l'ancrage supramoléculaire s'avère plus rapide (pas besoin de modifier la protéine), et donc mieux adaptée pour une approche d'optimisation chimio-génétique à débit élevé.

1.4. Le système streptavidine-biotine

1.4.1. La biotine¹⁰³

La biotine, ou la vitamine H est une molécule hydrosoluble de masse molaire 244 Da. Sa structure chimique est présentée dans la figure. 1.18. Elle est constituée d'un noyau imidazolidone et d'un cycle tetrahydrothiophène porteur d'une chaîne latérale à cinq atomes de Carbones. Elle possède trois centres de chiralité présentés dans la figure 1.18.

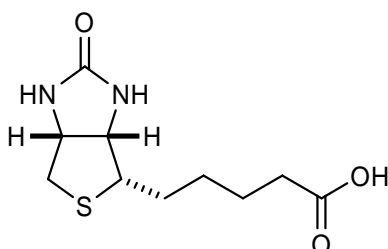


Figure 1.18. Structure de la biotine

Une des premières fonctions étudiées de la biotine est son implication dans le métabolisme des acides gras insaturés, des acides aminés (et notamment la synthèse de l'aspartate) et des sucres. Elle est le cofacteur des carboxylases qui catalysent l'addition d'un groupe CO_2 à différents substrats¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. La biotine joue un rôle clef dans le métabolisme des protéines, des graisses et des glucides. La biotine se fixe avec une très grande affinité à l'avidine ($K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$), glycoprotéine que l'on trouve dans le blanc d'œuf¹⁰⁷. Cette affinité ne baisse pas de façon significative quand le groupement carboxylique de la biotine est dérivatisé¹⁰⁸.

L'affinité entre la biotine et l'avidine et son homologue bactérien, la streptavidine ($K_a = 10^{13} \text{ M}^{-1}$) est considérée comme l'affinité protéine ligand naturelle la plus forte¹⁰⁹. Ce fait est à la base de l'ingénierie développée autour du système (strept) avidine biotine depuis une trentaine d'années¹⁰⁸. Les applications générales de ce système, dans le domaine biotechnologique et catalytique, vont être détaillées dans les prochains paragraphes, après la description de l'avidine et la streptavidine en tant que protéines.

1.4.2. L'avidine et la streptavidine¹¹⁰

L'avidine¹⁰⁷ et la streptavidine¹¹⁰ sont deux protéines étudiées en parallèle car malgré leur similitude, elles présentent quelques différences, notamment par leur origine différente.

1.4.2.1 L'avidine¹¹¹

Découverte en 1927 et isolée en 1941, l'avidine est une glycoprotéine homotétramérique d'environ 62 400 Da. Elle appartient à la famille des « biotin-binding protéines ». Chaque monomère étant capable de fixer une biotine, l'avidine accommode au total quatre biotines. C'est une protéine sécrétée de 4 x 128 acides aminés riche en résidus lysine et arginine qui lui confèrent un point isoélectrique élevé ($\text{pI} = 10.4$) et la propriété de fixer non spécifiquement

l'ADN et certaines cellules. Elle possède aussi un pont disulfure intra monomérique entre les deux seuls résidus cystéines de la séquence (C₄-C₈₃). De nombreuses études ont été menées sur les propriétés de l'avidine de l'œuf de la poule représentant 0.05 % de la masse totale de protéine de l'œuf. Plus récemment, les isoformes présentes dans l'œuf d'autres oiseaux ont été caractérisées¹¹⁰. L'analyse du génome de la poule a montré que le gène de l'avidine est unique, toutefois il est situé dans une région où se trouvent 7 gènes codants des protéines très proches d'elle. Ces protéines sont appelées « AVR » (« Avidine-Related Proteins »)¹¹². Certains types d'infections bactériennes provoquent la biosynthèse de leur ARNm, mais aucun d'entre eux n'est traduit en protéines¹¹³. Leur rôle n'est pas connu, mais leur clonage a permis d'isoler un variant d'entre eux capable de fixer la biotine avec une affinité de 10¹⁴M⁻¹. Les « AVR » diffèrent de l'avidine par des points isoélectriques différents (plus faibles), des formes de glycosylation différentes ou des ponts disulfures intermonomériques. La glycosylation de l'avidine est de type N-glycosylation portée par l'asparagine 17 (N17). La chaîne saccharique est constituée de 4 à 5 résidus mannose et de trois résidus N-glucosamine et représente environ 10 % de la masse molaire de la protéine. L'avidine est soluble à 50 mg/ml à pH neutre. Elle est peu sensible à la protéase K et devient pratiquement insensible en présence de biotine. En cas de dénaturation, elle peut être renaturée en présence de biotine¹⁰⁷.

¹¹¹.

1.4.2.2 La streptavidine

La streptavidine est l'équivalent bactérien de l'avidine, elle est produite naturellement par *Streptomyces avidinii*. Comme l'avidine, il s'agit d'une protéine homotétramérique, sécrétée, tétravalente¹¹⁴. Sa séquence protéique révèle 30 % d'identité (41 % d'homologie) avec celle de l'avidine. Six zones présentent une identité de 64 % (74 % d'homologie). Ces zones correspondent aux motifs structuraux conservés entre les deux protéines. Sur le reste de la

séquence, on ne note que 7 % d'identité et 17 % d'homologie¹⁰⁸. La masse molaire de la streptavidine est d'environ 60 000 Da et son point isoélectrique est de 6,4. Contrairement à l'avidine, elle n'est pas glycosylée et ne possède pas de pont disulfure. Le gène de la streptavidine a été cloné et séquencé en 1986¹¹⁵. La séquence protéique correspondante est constituée d'un peptide signal de 24 acides aminés clivé lors de sa sécrétion, suivi d'une séquence de 159 résidus appelée streptavidine mature. Le peptide signal porte les signaux d'adressage de sécrétion, mais il inhibe également la fixation de la biotine. Une fois sécrétée, la protéine est clivée aux extrémités « N » et « C » pour générer des « cores » streptavidine dont la longueur n'est pas homogène (de 125 à 127 acides aminés). Le propeptide « C » terminal, clivé dans les « cores »¹¹⁶, diminue l'accessibilité du site actif de fixation de la biotine dans la streptavidine mature par effet stérique et contribue à l'oligotétramérisation de la protéine. Comme l'avidine, la streptavidine est relativement stable¹¹⁷ dans des conditions drastiques (hautes températures, pH extrêmes).

1.4.2.3 Comparaison de l'avidine et de la streptavidine¹¹⁰

Les deux protéines sont des homotétramères avec une structure tertiaire et quaternaire tout à fait comparable. Chaque unité est constituée de 8 brins β antiparallèles avec une torsion hélicoïdale de type main droite, reliés entre eux par des boucles. La forme générale des monomères est celle d'un tonneau β (« β -barrel ») dont la cavité est hydrophobe. Il n'y a pas réellement de différences entre le monomère de l'avidine et celui de la streptavidine si ce n'est l'agencement des boucles reliant les brins β . Les dimensions du tétramère de l'avidine sont 56 x 50 x 40 Å et celles du tétramère de la streptavidine sont de 54 x 58 x 48 Å.

Le point commun essentiel est leur très grande affinité pour leur substrat, la biotine (vitamine H). L'avidine est naturellement présente dans le blanc d'œuf des oiseaux, des amphibiens et

certaines reptiles, alors que la streptavidine est sécrétée hors du microorganisme *Streptomyces avidinii*. La masse de l'avidine est d'environ 65 000 Da (128 acides aminés par monomère) et 62 500 Da pour la streptavidine (130 acides aminés par monomère). Les deux protéines sont très robustes car elles résistent aux hautes températures, surtout en présence de la biotine, cette dernière exerçant un effet stabilisant. Elles sont également résistantes à la dénaturation dans une gamme de pH allant de 2 à 13.

Bon nombre d'interactions polaires ou de type Van der Waals stabilisent les interactions monomères–monomères. Toutefois, la mutation du résidu tryptophane 110 de l'avidine (120 pour la streptavidine) est capable d'inhiber l'interaction 1-2 de manière à ne générer que des dimères de type 1-4. Par ailleurs, ce résidu intervient dans l'interaction (strept) avidine-biotine.

1.4.3. Ancrage de la biotine dans la streptavidine. Rationalisation

L'affinité (strept) avidine-biotine occupe une place remarquable dans le classement d'affinité entre des combinaisons protéines ligands : elle est à la tête de la liste suivie par l'affinité protéase-inhibiteur (10^{10} - 10^{13}), récepteur-ligand (10^9 - 10^{12}), anticorps-antigène (10^7 - 10^{11}), enzyme-substrat (10^3 - 10^5).

Bon nombre d'études cristallographiques en présence de biotine¹¹⁸, d'analogues¹¹⁹ ou de peptides¹²⁰, le plus souvent complétées par des expériences de mutagenèse dirigée^{120, 121} et de permutation circulaire^{110, 122}, de simulation informatique, analyses thermodynamiques¹²³ ont permis de discerner les supports physiques de l'affinité entre la (strept) avidine et la biotine. Cette interaction est basée sur deux types d'interactions (hydrogènes et hydrophobes) ainsi qu'au repliement de la boucle 3-4 (L 3-4) sur la biotine:

- Les interactions hydrophobes font, quant à elles, principalement intervenir les résidus aromatiques des protéines avec le cycle tétrahydrothiophène et la chaîne aliphatique de la biotine. Les interactions hydrophobes sont assurées par des résidus tryptophane et phénylalanines pour l'avidine (W70, F72, F79, W97, W110) et par quatre tryptophanes de la streptavidine (W70, W92, W108, W120). Le tryptophane 110 de l'avidine ou 120 pour la streptavidine interagissant avec la biotine provenant d'un monomère adjacent. La mutation dirigée des tryptophanes W110 dans l'avidine et W120 dans la streptavidine a révélée que c'est un résidu clé critique pour l'affinité entre la (strept) avidine et la biotine.
- Les liaisons hydrogènes stabilisent le site oxyanion (Fig. 1.19) de l'urée de la biotine et sont grandement responsables de l'affinité alors que les interactions au niveau du carboxylate sont secondaires. Il existe des différences notables dans les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogènes entre les deux protéines. Elles sont plus nombreuses dans le cas de l'avidine, ce qui explique une constante d'affinité plus forte pour le complexe biotine avidine ($K_a=10^{15} \text{ M}^{-1}$) que pour le complexe biotine streptavidine ($K_a=10^{13} \text{ M}^{-1}$).
- La conformation fermée de la boucle 3,4 (L 3-4) ¹¹⁹ résulte de la formation des ponts hydrogènes entre la biotine et les résidus acides aminés présents sur cette boucle (Tyr43, Ser45, Glu49) dans le cas de la streptavidine. Différents analogues de la biotine dont la fonction carboxylique a été modifiée, comme le Bcap¹²⁴, se fixent parfaitement dans la cavité, car les liaisons hydrophobes et hydrogènes autour de l'urée sont préservés. A l'inverse, une déstabilisation du réseau de liaisons hydrogènes abaissent fortement l'affinité. C'est le cas de l'iminobiotine qui possède un groupement NH à la place d l'Oxygène au niveau de l'urée. Ce dérivé de biotine se fixe avec une bonne affinité dans la streptavidine à un pH

basique. Cette protonation réversible est exploitée pour purifier ces deux protéines par chromatographie d'affinité en utilisant une phase stationnaire d'imminobiotine greffée sur agarose.

La stabilité de ces protéines, l'aptitude de modifier chimiquement le motif carboxylate de la chaîne valérique, tout en protégeant l'ancrage entre eux, a donné naissance au développement de nouvelles technologies. Les applications qui en ont découlées touchent des domaines variées : la nanotechnologie (fixation sur support), le criblage de principes actifs, la mise au point de biosenseurs, des techniques biologiques (amplification du signal) et la catalyse énantiosélective par des métalloenzymes artificielles¹²⁵⁻¹²⁸.

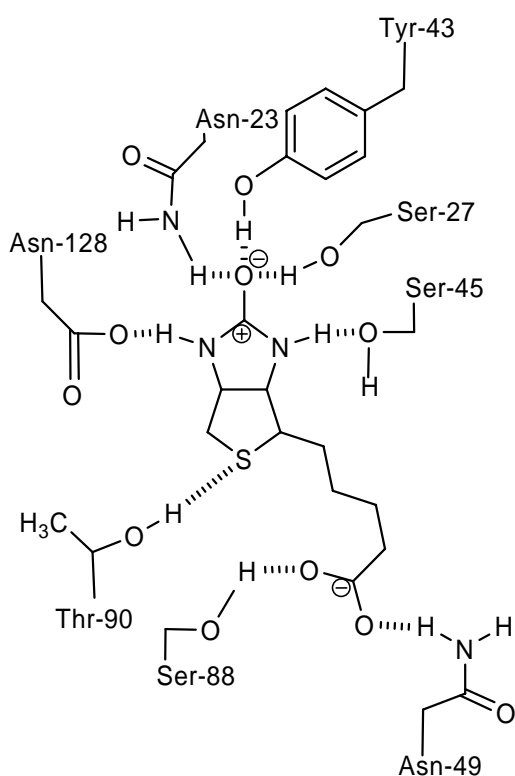


Figure 1.19. Représentation des liaisons hydrogènes dans la streptavidine

1.5. Objectifs du travail de thèse

Comme nous l'avons vu, le développement de catalyseurs énantiosélectifs à travers l'exploitation de la cavité protéique chirale et les métaux catalytiquement actifs est un domaine en voie de développement. Ces catalyseurs doivent être facilement optimisables afin de s'inscrire dans une approche combinatoire à haut débit. Le but de ce travail de thèse a été d'exploiter d'une manière intensive des voies existantes de diversification du gène de la streptavidine (mutagenèse dirigée et mutagenèse de saturation) et de créer un système de diversification compatible avec l'exploitation de la diversité de la streptavidine à plus haut débit (voix innovante) en vue de l'augmentation de la sélectivité. Une fois la diversité obtenue, l'objectif a été d'exprimer d'une manière systématique et rapide des mutants déjà existants ainsi que des mutants nouveaux afin d'en sélectionner les plus importants en terme de sélectivité. Enfin, les performances catalytiques des protéines diversifiées seront évaluées en termes d'énantiosélectivité. Cette dernière étape se fera en collaboration avec les chimistes du groupe du laboratoire de métalloenzymes artificielles sous la direction du professeur T.Ward de l'Institut de Chimie, Université de Neuchâtel.

CHAPITRE 2: MATERIELS ET METHODES

2.1. Matériels

2.1.1. Matériel ADN

2.1.1.1. Le plasmide pET11b-Sav

Le plasmide pET11b-SAV (gène type sauvage de la streptavidine mature cloné dans le vecteur pET11b)¹²⁹ a été fourni par le Professeur Paolo Santambrogio (Université de Milan) et le plasmide pET11b-vide par Novagen–Juro, Lucerne, Suisse. La figure 2.1 présente la séquence du gène et la séquence protéique correspondante de la streptavidine. En bleu est représenté le T7-tag, destiné à la solubilisation de la streptavidine.

M	A	S	M	T	G	G	Q	Q	M	G	R	D	Q
<u>ATG</u>	GCT	AGC	ATG	ACT	GGT	GGA	CAG	CAA	ATG	GGT	CGG	GAT	CAG
A	G	I	T	G	T	W	Y	N	Q	L	G	S	T
GCC	GGC	ATC	ACC	GGC	ACC	TGG	TAC	AAC	CAG	CTC	GGC	TCG	ACC
F	I	V	T	A	G	A	D	G	A	L	T	G	T
TTC	ATC	GTG	ACC	GCG	GGC	GCC	GAC	GGC	GCC	CTG	ACC	GGA	ACC
Y	E	S	A	V	G	N	A	E	S	R	Y	V	L
TAC	CAG	TCG	GCC	GTC	GGC	AAC	GCC	GAG	AGC	CGC	TAC	GTC	CTG
T	G	R	Y	D	S	S	A	P	A	T	D	G	S
CTG	ACC	GGT	CGT	TAC	CAC	AGC	GCC	CCG	GCC	ACC	GAC	GGC	AGC
G	T	A	L	G	W	T	V	A	W	K	N	N	Y
GGC	ACC	GCC	CTC	GGT	TGG	ACG	CTC	GCC	TCC	AAC	AAT	AAC	TAC
R	N	A	H	S	A	T	T	W	S	G	Q	Y	V
CGC	AAC	GCC	CAC	TCC	GCG	ACC	ACG	TGG	AGC	GGC	CAG	TAC	GTC
G	G	A	E	A	R	I	N	T	Q	W	L	L	T
GGC	GGC	GCC	CAG	GCG	AGG	ATC	AAC	ACC	CAG	TGG	CTG	CTG	ACC
S	G	T	T	E	A	N	A	W	K	S	T	L	V
TCC	GGC	ACC	ACC	GAG	GCC	AAC	GCC	TGG	AAG	TCC	ACG	CTG	GTC
G	H	D	T	F	T	K	V	K	P	S	A	A	S
GGC	CAC	GAC	ACC	TTC	ACC	AAG	GTG	AAG	CCG	TCC	GCC	GCC	TCC
I	D	A	A	K	K	A	G	V	N	N	G	N	P
ATC	GAC	GCG	GCG	AAG	AAG	GCC	GGC	CTC	AAC	AAC	GGC	AAC	CCG
L	D	A	V	Q	Q	STOP							
CTC	GAC	GCC	GTT	CAG	CAQ	TAG							

Figure 2.1. Séquence de la streptavidine mature

2.1.1.2. Les amorces

Les amorces utilisées proviennent de Microsynth (Balgach, Suisse).

➤ Amorces pour la saturation S112X

Plusieurs stratégies de saturation sont envisageables. On peut remplacer le codon désiré par la séquence NNN (N=A, C, G ou T), mais il est préférable d'utiliser une séquence type NNS (S=C ou G) ou NNK (K=G ou T). En effet, la stratégie «NNN» est parfaitement efficace, mais la probabilité d'obtenir une méthionine ou un tryptophane est de 1/64, quant au codon stop, il apparaît avec une fréquence de 3/64. En utilisant les codons NNS ou NNK, la méthionine et le tryptophane apparaissent avec une fréquence de 1/32 et il ne subsiste qu'une possibilité sur 32 d'obtenir un stop (Tableau 2.1).

	NNN	NNS	NNK		NNN	NNS	NNK		NNN	NNS	NNK
A	4/64	2/32	2/32	I	3/64	1/32	1/32	R	6/64	3/32	3/32
C	2/64	1/32	1/32	K	2/64	1/32	1/32	S	6/64	3/32	3/32
D	2/64	1/32	1/32	L	6/64	3/32	3/32	T	4/64	2/32	2/32
E	2/64	1/32	1/32	M	1/64	1/32	1/32	V	4/64	2/32	2/32
F	2/64	1/32	1/32	N	2/64	1/32	1/32	W	1/64	1/32	1/32
G	4/64	2/32	2/32	P	4/64	2/32	2/32	Y	2/64	1/32	1/32
H	2/64	1/32	1/32	Q	2/64	1/32	1/32	STOP	3/64	3/64	1/32

Tableau 2.1. Probabilités d'obtention des différents acides aminés par les différentes stratégies de mutagenèse de saturation.

La technique « NNS » a été choisie en tablant sur le fait que la présence d'un G ou d'un C en 3-ème position permet une hybridation plus forte des deux amorces¹³⁰.

Initialement, onze mutants sont obtenus par des amorces dégénérées (nns). Pour compléter la saturation, les huit mutants manquants après le criblage de la librairie issue de la saturation (nns) sont obtenus avec des amorces spécifiques (tableau 2.2). Tous les mutants S112X sont dessinés avec la mutation silencieuse KpnI en vue du criblage des positifs¹³⁰.

Mutation	Amorces (5'-3')	Mutation silencieuse
Saturation S112X	<p>Amorce supérieure GCTGACCNNSGGTACCACCGAGGCCAACGCCTGG</p> <p>Amorce inférieure GGTGGTACCSNNGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG</p>	KpnI
S112H	<p>Amorce supérieure GCTGACCCATGGTACCACCGAGGCCAACGCCTGG</p> <p>Amorce inférieure GGTGGTACCATGGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG</p>	KpnI
S112I	<p>Amorce supérieure GCTGACCATTGGTACCACCGAGGCCAACGCCTGG</p> <p>Amorce inférieure GGTGGTACCATGGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG</p>	KpnI
S112M	<p>Amorce supérieure GCTGACCATGGGTACCACCGAGGCCAACGCCTGG</p> <p>Amorce inférieure GGTGGTACCATGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG</p>	KpnI
S112N	<p>Amorce supérieure GCTGACCAACGGTACCACCGAGGCCAACGCCTGG</p> <p>Amorce inférieure GGTGGTACCGTTGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG</p>	KpnI
S112Q	<p>Amorce supérieure GCTGACCCAGGGTACCACCGAGGCCAACGCCTGG</p> <p>Amorce inférieure GGTGGTACCCTGGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG</p>	KpnI
S112T	<p>Amorce supérieure GCTGACCACCGGTACCACCGAGGCCAACGCCTGG</p> <p>Amorce inférieure GGTGGTACCGGTGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG</p>	KpnI
S112W	<p>Amorce supérieure GCTGACCTGGGGTACCACCGAGGCCAACGCCTGG</p> <p>Amorce inférieure GGTGGTACCCAGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG</p>	KpnI
S112Y	<p>Amorce supérieure GCTGACCTATGGTACCACCGAGGCCAACGCCTGG</p> <p>Amorce inférieure GGTGGTACCATAGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG</p>	KpnI

Tableau 2.2. Amorces pour la saturation S112X (amorces dégénérées nns) et amorces spécifiques (S112X)

➤ **Amorces pour l'exploration de la boucle 7-8**

Les mutations en vue de l'exploration de la boucle 7-8 sont obtenues par des amorces spécifiques présentées dans le tableau 2.3. Toutes les amorces portent la mutation silencieuse KpnI pour le criblage des positifs.

Mutation	Amorces (5'-3')	Mutation silencieuse
T114G	Supérieure CCTCCGGCGGTACCGAGGCCAACGCCTGGAAGTCC Inférieure GGGTCACCGACGACTGGAGGCCCGCCATGGCTCGG	KpnI
T115A	Supérieure CCTCCGGTACCGCTGAGGCCAACGCCTGGAAGTCC Inférieure GGCCTCAGCGGTACCGGAGGTCAGCAGCCACTGGG	KpnI
E116A	Supérieure CCTCCGGTACCACCGCGGCCAACGCCTGGAAGTCC Inférieure GGCCGCGGTGGTGGTACCGGAGGTCAGCAGCCACTGGG	KpnI
N118A	Supérieure CCGGTACCACCGAGGCCCGCCCTGGAAGTCCACGCTGG Inférieure GGCGGCGGCGGCCTCGGTGGTACCGGAGGTCAGCAGCCA CTGG	KpnI

Tableau 2.3. Amorces pour la l'exploration de la boucle 7-8.

➤ **Amorces pour la saturation K121X**

Les mutations en vue de la saturation K121X sont obtenues par des amorces spécifiques présentées dans le tableau 2.4. La majorité d'entre eux portent le site de restriction ScaI.

Mutation	Amorces (5'-3')	Mutation silencieuse
K121A	Supérieure GCCTGGGCGTCCACGCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure CGTGGACGCCAGGCGTTGGCCTCGGTGGTGCC	aucune
K121E	Supérieure GCCTGGGAGTCCACGCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure CGTGGACTCCCAGGCCTTGGCCTCGGTGGTGCC	aucune
K121Y	Supérieure GCCTGGTATTCCACGCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure CGTGGAATACCAGGCGTTGGCCTCGGTGGTGCC	aucune
K121G	Supérieure CGCCTGGGGGAGTACTCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure GCCGACCAGAGTACTCCCCAGGCGTTGGCCTCGG	aucune
K121T	Supérieure CGCCTGGACGAGTACTCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure GCCGACCAGAGTACTCGTCCAGGCGTTGGCCTCGG	ScaI
K121V	Supérieure CGCCTGGGTGAGTACTCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure GCCGACCAGAGTACTCAGCCAGGCGTTGGCCTCGG	ScaI
K121W	Supérieure CGCCTGGTGGAGTACTCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure GCCGACCAGAGTACTCCACCAGGCGTTGGCCTCGG	ScaI
K121M	Supérieure CGCCTGGATGAGTACTCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure GCCGACCAGAGTACTCATCCAGGCGTTGGCCTCGG	ScaI
K121Q	Supérieure CGCCTGGCAGAGTACTCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure GCCGACCAGAGTACTCTGCCAGGCGTTGGCCTCGG	ScaI
K121R	Supérieure CGCCTGGAGGAGTACTCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure	ScaI

	GCCGACCAGAGTACTCCTCCAGGCGTTGGCCTCGG	
K121C	Supérieure CGCCTGGTGCAGTACTCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure GCCGACCAGAGTACTGCACCAGGCGTTGGCCTCG	Scal
K121H	Supérieure CGCCTGGCACAGTACTCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure GCCGACCAGAGTACTGTGCCAGGCGTTGGCCTCG	Scal
K121I	Supérieure CGCCTGGATCAGTACTCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure CCAGAGTACTGATCCAGGCGTTGGCCTCGGTGG	Scal
K121P	Supérieure CGCCTGGCCGAGTACTCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure GCCGACCAGAGTACTCGGCCAGGCGTTGGCCTCG	Scal
K121D	Supérieure CGCCTGGGACAGTACTCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure GCCGACCAGAGTACTGTCCCAGGCGTTGGCCTCG	Scal
K121N	Supérieure CGCCTGGAACAGTACTCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure GCCGACCAGAGTACTGTTCCAGGCGTTGGCCTCG	Scal
K121L	Supérieure CGCCTGGTTGAGTACTCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure GCCGACCAGAGTACTCAACCAGGCGTTGGCCTCG	Scal
K121S	Supérieure CGCCTGGTCGAGTACTCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure GCCGACCAGAGTACTCGACCAGGCGTTGGCCTCG	Scal
K121F	Supérieure CGCCTGGTTCAGTACTCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure GCCGACCAGAGTACTGAACCAGGCGTTGGCCTCG	Scal

Tableau 2.4. Amorces pour la saturation K121X.

➤ **Amorces pour la saturation L124X**

Les mutations en vue de la saturation K121X sont obtenues par des amorces spécifiques présentées dans le tableau 2.5. La majorité d'entre eux portent le site de restriction ScaI.

Mutation	Amorces (5'-3')	Mutation silencieuse
L124Q	Supérieure GGAAGAGTACTCAGGTCGGCCACGACACCTTCACC Inférieure CCGACCTGAGTACTCTTCCAGGCGTTGGCCTCGGTG	ScaI
L124S	Supérieure GGAAGAGTACTTTCGGTCGGCCACGACACCTTCACC Inférieure CCGACCGAAGTACTCTTCCAGGCGTTGGCCTCGGTG	ScaI
L124T	Supérieure GGAAGAGTACTACGGTCGGCCACGACACCTTCACC Inférieure CCGACCGTAGTACTCTTCCAGGCGTTGGCCTCGGTG	ScaI
L124V	Supérieure GGAAGAGTACTGTGGTCGGCCACGACACCTTCACC Inférieure CCGACCACAGTACTCTTCCAGGCGTTGGCCTCGGTG	ScaI
L124W	Supérieure GGAAGAGTACTTGGGTCGGCCACGACACCTTCACC Inférieure CCGACCCAAGTACTCTTCCAGGCGTTGGCCTCGGTG	ScaI
L124I	Supérieure GGAAGAGTACTATCGTCGGCCACGACACCTTCACC Inférieure CCGACGATAGTACTCTTCCAGGCGTTGGCCTCGGTG	ScaI
L124M	Supérieure GGAAGAGTACTATGGTCGGCCACGACACCTTCACC Inférieure GGCCGACCATAGTACTCTTCCAGGCGTTGGCCTCGG	ScaI
L124N	Supérieure CTGGAAGAGTACTAACGTTCGGCCACGACACCTTCACC Inférieure GGCCGACGTTAGTACTCTTCCAGGCGTTGGCCTCGGCG	ScaI
L124R	Supérieure GGAAGAGTACTCGGGTCGGCCACGACACCTTCACC Inférieure CCGACCCGAGTACTCTTCCAGGCGTTGGCCTCGGTG	ScaI

L124C	Supérieure GGAAGAGTACTTTCGTCGGCCACGACACCTTCACC Inférieure CCGACGCAAGTACTCTTCCAGGCGTTGGCCTCGGTG	Scal
L124D	Supérieure GGAAGAGTACTGACGTCGGCCACGACACCTTCACC Inférieure CCGACGTCAGTACTCTTCCAGGCGTTGGCCTCGGTG	Scal
L124F	Supérieure GGAAGAGTACTTTCGTCGGCCACGACACCTTCACC Inférieure CCGACGAAAGTACTCTTCCAGGCGTTGGCCTCGGTG	Scal
L124H	Supérieure GGAAGAGTACTCACGTCGGCCACGACACCTTCACC Inférieure CCGACGTGAGTACTCTTCCAGGCGTTGGCCTCGGTG	Scal
L124A	Supérieure GCCTGGGCGTCCACGCTGGTCGGCCACGACACC Inférieure CAGCGTGGACGCCAGGCGTTGGCCTCGGTGG	aucune
L124G	Supérieure GGAAGTCCACGGGGTTCGGCCACGACACCTTCACC Inférieure CGTGGCCGACCCCGTGGACTTCCAGGCGTTGGCC	aucune
L124P	Supérieure GGAAGAGTACTCCGGTTCGGCCACGACACCTTCACC Inférieure GCCGACCGGAGTACTCTTCCAGGCGTTGGCCTCGG	Scal
L124K	Supérieure CCAACGCCTGGAAGAGTACCAAGTTCGGCCACGACACC Inférieure GCCGACCTTGGTACTCTTCCAGGCGTTGGCCTCGGTGG	Scal
L124Y	Supérieure GGAAGTCCACGTATGTCGGCCACGACACCTTCACC Inférieure CGTGGCCGACATACGTGGACTTCCAGGCGTTGGCC	aucune
L124E	Supérieure GGAAGTCCACGGAGGTCGGCCACGACACCTTCACC Inférieure GGCCGACCTCCGTGGACTTCCAGGCGTTGGCCTCGG	aucune

Tableau 2.5. Amorces pour la saturation L124X.

Remarque : Les amorces K121X et L124X ont été utilisées aussi pour les doubles saturations S112AK121X, S112KK121X, S112AL124X, S112KL124X.

➤ **Amorces pour le « redesign » du gène de la streptavidine**

Les mutations en vue de l'obtention de la séquence « redesignée » du gène de la streptavidine sont présentées dans le tableau 2.6. Ce sont des amorces de type mutagenèse dirigée. Les plasmides obtenus sont analysés par les sites de restriction introduits.

Site de restriction artificielle	Amorces (5'-3')
AvrII	Supérieure GGCACCGCCCTAGGTTGGACGGTGGCCTGG Inférieure CGTCCAACCTAGGGCGGTGCCGCTGCCGTCGG
SunI	Supérieure CCGGAACGTACGAGTCGGCCGTCGGCAACGCC Inférieure GGCCGACTCGTACGTTCCGGTCAGGGCGCCGTCGGC
MunI	Supérieure GCCGCCTCAATTGACGCGGCGAAGAAGGCCGGC Inférieure CGCCGCGTCAATTGAGGCGGCGGACGGCTTCACC

Tableau 2.6. Amorces pour le « redesign » du gène de la streptavidine

➤ **Amorces pour l'obtention de la streptavidine chimérique**

La séquence de la streptavidine chimérique a été obtenue par des amorces mutagènes présentées dans le tableau 2.7. Comme le produit de l'amplification est soumis à une ligation, les extrémités 5' sont phosphorylées.

Amorces	Séquences (5'-3')
Helix supérieure	Phosphate (5') CCAAATTTTAATCTGCGCTTCGTTTCAGGCCGGAGGCCGGCGGACGGCT TCACCTTG
Helix inférieure	Phosphate(5') TTCCAGAACAACGTCGCAAAAATTAATAAATAGGATCCGGCTGCTAA CAAAGCCCG

Tableau 2.7. Amorces pour la streptavidine chimérique

➤ Amorces pour l'amplification du gène de la streptavidine

Afin de disposer de la séquence du gène de la streptavidine muté, une PCR avec des amorces délimitantes ses extrémités est effectuée. Ces amorces sont présentées dans le tableau 2.8.

Amorces	Séquence (5'-3')
Sav EcoF	CAAGAATTCGCTAGCATGACTGGT
Sav BamR	CATGGATCCCTACTGCTGAACGGCGTC

Tableau 2.8. Amorces pour l'amplification du gène de la streptavidine

2.1.2. Souches bactériennes

La souche de bactéries *Escherichia coli* XL1-blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZ ΔM15 Tn10* (Tet^R)]]) provient de Stratagène (La Jolla CA, EU).

La souche BL21 (DE3) pLysS (F- *ompT hsdSB* (rB-mB-) *gal dcm* (DE3) pLysS (CmR)) provient de Novagen (Juro Lucerne Suisse).

2.1.3. Appareillage

2.1.3.1. Appareillage associé à la manipulation d'ADN

- Electrophorèse d'ADN : Bio Rad (Reinach, Suisse)
- Transilluminateur pour la visualisation des gels d'ADN : Gel Doc 1000 (Bio Rad, Reinach, Suisse), implémenté par le logiciel Multi Analyst.
- Thermocycleurs pour l'amplification ADN : type T- Gradient (Biométra, Bio labo Scientific Instruments, Châtel St Denis, Suisse) et PTC-110 (MJ Research-BioConcept, Allschwil, Suisse).
- Les séquenceurs d'ADN supplémentés avec les logiciels Geospiza Inc, Applied Biosystems, Inc and Staden Package se trouvent dans les locaux des sociétés

Synergene Biotech GmbH Suisse ou à Microsynth (accrédité ISO 17025, 2000)
Suisse.

- Le lyophilisateur est de la marque « LSL SECFROIO » produit par la société « Blanc Labo » SA, Lonay.

2.1.3.2. Appareillage associé à la production à grande et à petite échelle

- L'incubateur stationnaire à 37 °C pour le développement des transformants sur boîtes de Pétri est de modèle WTB (Binder Faust, Schaffhouse, Suisse)
- L'incubateur agité utilisé pour le développement des cultures liquides à 37 °C est de type Aquatron Infors-Blanc Labo, Morges, Suisse. Avec le même succès a été utilisé l'incubateur New Brunswick Scientific Edison N.J. USA.
- Fermenteur 10 l provient de Bioengineering AG, Wald, Suisse
- Fermenteur 2 l est de type Minifors, Infors HT (HT)
- La colonne de chromatographie d'affinité (2-imminobiotine) est de la marque Affiland (Belgique).
- L'autoclave est de type « Tecnoclav » de la société VITARIS AG.

2.1.3.3. Appareillage associé à l'analyse des protéines exprimées

- « ESI-MS » spectromètre de type VG platform Manchester, (UK) dans les locaux du service analytique de spectrométrie de masse du professeur Schaller à l'Université de Berne, Suisse. .
- Spectrophotomètre pour la lecture des plaques ELISA Tecan Reader, Crailsheim, (Allemagne).
- Electrophorèse de protéines

L'appareil pour la migration des gels SDS-PAGE et SDS-B4F est de type « Power Par 1000 » de Bio-Rad. Le gel est photographié dans un transilluminateur de type Gel-Doc 1000 (Bio-Rad, Reinach, Suisse) supplémenté d'un écran de type Conversion Screen (Bio-Rad, Reinach, Suisse).

2.2. Mélanges réactionnels ADN

2.2.1. Mélanges réactionnels d'amplification

2.2.1.1. Mélange réactionnel pour les amplifications de type mutagenèse dirigée

Toutes les amplifications de types mutagenèse dirigée ont été obtenues dans les conditions présentées dans le tableau 2.9.

Composant	Quantité
Eau	36,8 µl
Tampon 10 X	5 µl
Amorce supérieure 12,5 µM	1 µl
Amorce inférieure 12,5 µM	1 µl
DMSO 100 %	2,5 µl
ADN 15 µg/ml	1,7 µl
Turbo Pfu "Stratagène"	1 µl
dNTPs 50 X	1 µl
Volume final	50 µl

Tableau 2.9. Mélange réactionnel pour les amplifications de type mutagenèse dirigée

Remarque :

Toutes les amplifications issues de la mutagenèse dirigée S112X, K121X, L124X, S112AK121X, S112AL124X, S112KK121X, S112KL124X et les amplifications pour le « redesign » de la streptavidine ainsi que la streptavidine chimérique ont été traitées par la DpnI, fournie avec le kit de l'amplification pour la mutagenèse dirigée en vue de la digestion de la matrice. Cette enzyme est active dans le même tampon que le tampon de l'amplification et est ajoutée à raison de 1 µl pour une réaction d'amplification de 50 µl. La DpnI fait partie du kit de mutagenèse dirigée « QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis » de Stratagene.

2.2.1.2. Mélange réactionnel pour l'amplification du gène de la streptavidine

Deux possibilités d'amplification du gène de la streptavidine sont exploitées: PCR sur des colonies (voir tableau 2.10) et PCR sur le plasmide (voir tableau 2.11). Ces amplifications sont utilisées en vue de l'analyse de la mutation silencieuse (pour les amplifications de type mutagenèse dirigée) et le séquençage pour l'ensemble des séquences génétiquement modifiées.

➤ A l'échelle de la colonie

Composant	Quantité
Eau	13.2 µl
Tampon 10 X	2 µl
Sav EcoF 12.5 µM	1 µl
Sav BamR 12.5 µM	1 µl
Une colonie dissoute dans l'eau	1 µl
Taq Polymerase 5U / µl Promega	1 µl
dNTPs 2 mM	1 µl
Volume final	20 µl

Tableau 2.10. Conditions d'amplification de la streptavidine à l'échelle de la colonie

➤ **A l'échelle du plasmide**

Composant	Quantité
Eau	33 μ l
Tampon 5X	10 μ l
Sav EcoF 12.5 μ M	1.5 μ l
Sav BamR 12.5 μ M	1.5 μ l
ADN 150 μ g/ml	0.5 μ l
Taq Polymerase 5U / μ l Promega	1 μ l
dNTP 2 mM	2.5 μ l
Volume final	50 μ l

Tableau 2.11. Conditions d'amplification de la streptavidine à l'échelle du plasmide

2.2.1.3. Mélange réactionnel pour l'amplification de la streptavidine chimérique

Le mélange réactionnel pour l'amplification de la streptavidine chimérique est identique au mélange présenté dans le tableau 2.8.

2.2.2. Mélanges réactionnels de digestion en vue de l'analyse de la mutation silencieuse

Cette analyse porte sur le gène de la streptavidine amplifié après l'étape de la mutagenèse. 5 μ l du fragment amplifié après sa purification sont digérés par l'enzyme de restriction dont le site est apporté lors de la mutagenèse dirigée. La digestion est analysée sur gel (2% w/v agarose ; 1XTBE ; 0.00004% w/v BET). Les positifs sont envoyés à séquencer (15 μ l du fragment amplifié+1 μ l amorce Sav EcoF ou Sav BamR) à Synergène (Suisse) ou à Microsynth (Suisse).

2.2.3. Mélanges réactionnels de ligation du produit PCR de la streptavidine chimérique

Le tableau 2.12 présente les conditions de ligation du produit linéaire de la PCR de la streptavidine chimérique. Le produit obtenu est le pET11bSav-chimérique (streptavidine chimérique dans le vecteur pET11b).

Component	Quantité
PCR streptavidine chimérique	30 µl
Tampon ligase*	30 µl
Ligase*	3 µl
Durée de la réaction	Une nuit à température ambiante
* Les réactifs utilisés font partie du kit « Rapid DNA Ligation Kit », la Roche	

Tableau 2.12. Conditions de ligation de la PCR de la streptavidine chimérique

2.3. Programmes d'amplification ADN

2.3.1. Amplification du type mutagenèse dirigée

La mutagenèse de saturation : S112X, K121X, L124X, S112AK121X, S112AL124X, S112KK121X, S112KL124X et le « redesign » du gène de la streptavidine ainsi que la streptavidine chimérique ont été obtenus avec le programme d'amplification décrit dans le tableau 2.13.

Etape	Température	Durée
1. Dénaturation initiale	95 °C	5 min
2. Dénaturation	95 °C	1 min
3. Hybridation	65 °C	1 min
4. Extension	68 °C	15 min
5. Extension finale	68 °C	60 min
Cycles 15 d'étape 2 à 4	-	-
Fin de la réaction	10 °C	-

Tableau 2.13. Programme PCR pour toutes les amplifications de type mutagenèse dirigée

2.3.2. Amplification du gène de la streptavidine

Le programme d'amplification présenté dans le tableau 2.14 permet l'amplification du gène de la streptavidine (respectivement son amplification du vecteur pET11b). Le gène amplifié peut être analysé par la mutation silencieuse et/ou envoyé à séquencer.

Etape	Température	Durée
1. Dénaturation initiale	95 °C	5 min
2. Dénaturation	95 °C	0.40 sec
3. Hybridation	56 °C	0.45 sec
4. Extension	72 °C	0.30 sec
5. Extension finale	72 °C	10 min
Cycles 30 d'étape 2 à 4		-
Fin de la réaction	10 °C	-

Tableau 2.14. Programme PCR pour l'amplification du gène de la streptavidine cloné dans le pET11b

2.4. Obtention des bactéries « heat-chock » compétentes *Escherichia coli* XL1-blue et BL21 (DE3) pLysS

2.4.1. Obtention par traitement au RbCl

Les bactéries non transformées d'un stock glycérol ou d'un aliquot de cellules compétentes sont étalées sur boîte de Pétri LB modifié (10 g/l bactotryptone ; 5 g/l bacto yeast-extract; 5 g/l NaCl ; 15 g/l bacto agar) contenant les antibiotiques appropriés (50 µg/ml Tétracycline pour XL1-blue ; 34 µg/ml Chloramphénicol pour BL21 (DE3) pLysS), puis sont incubées une nuit à 37 °C. Une colonie isolée de taille moyenne est sélectionnée pour inoculer une préculture

de milieu LB modifié (3 ml ; 10 g/l bactotryptone ; 5 g/ bacto yeast extract ; 5 g/l NaCl) contenant les antibiotiques précités à la même concentration. Cette préculture est incubée une nuit à 37 °C sous agitation orbitale (250 rpm).

La préculture est versée dans le milieu LB modifié (250 ml) contenant les antibiotiques adéquats (mêmes concentrations). Les bactéries sont incubées à 37 °C sous agitation orbitale (250 rpm) jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm atteigne 0,400-0,600 (~ 2h30), puis sont centrifugées (4 500 g ; 5 min; 4 °C). Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans la solution TFB (1) (100 ml ; 30 mM acétate de potassium pH=5,8 ; 100 mM CaCl₂ ; 50 mM MnCl₂ ; 100 mM RbCl et 15 % v/v glycérol). Les cellules sont incubées dans la glace (5 min), puis sont centrifugées à nouveau (4 500 g ; 5 min 4 °C). Le surnageant est éliminé et les cellules sont suspendues dans la solution TFB (2) (10 mM MOPS ; pH 6,5 ; 75 mM CaCl₂ ; 10 mM RbCl et 15% glycérol). Les bactéries sont alors incubées 15-60 minutes dans la glace puis sont aliquotées (50-80 µl), congelées à l'azote liquide et stockées à -80 °C.

2.4.2. Obtention par traitement au DMSO

Les bactéries non transformées d'un stock glycérol ou d'un aliquot de cellules compétentes sont étalées sur des boîtes de Pétri LB modifié (10 g/l bactotryptone ; 5 g/l bacto yeast-extract; 5 g/l NaCl ; 15 g/l bactoagar) contenant les antibiotiques appropriés (50 µg/ml Tétracycline pour XL1-blue ; 34 µg/ml Chloramphénicol pour BL21 (DE3) pLysS, puis sont incubées une nuit à 37 °C. Une colonie isolée de taille moyenne est sélectionnée pour inoculer une préculture de milieu LB modifié 3 ml : (10 g/l bactotryptone ; 5 g/l bacto yeast extract ; 5 g/l NaCl) contenant les antibiotiques précités à la même concentration. Cette préculture est incubée une nuit sous agitation orbitale (250 rpm). Elle est utilisée pour l'innoculation de

LB modifié 250 ml (avec les mêmes concentrations que dans le volume de 3 ml). Elle est suivie jusqu'à $DO_{600}=0.6$. La culture est centrifugée sous conditions stériles. Le culot de cellules est laissé dans la glace pour 10 minutes. Ces cellules sont reprises dans 80 ml TB préalablement refroidi à 4 °C (Le TB pour 200 ml est composé de : 605 mg PIPES, 441 mg $CaCl_2$, 3.7 g KCl, 2,17 g $MnCl_2$, la solution ajustée à pH=6.7). La suspension de cellules reprises dans cette solution est centrifugée à 2500g et le culot est laissé pour 10 minutes dans la glace. Une deuxième reprise de ce culot dans 20 ml TB (composition précitée) refroidi à 4°C est faite. Les cellules sont gentiment reprises dans cette solution. Du DMSO (1.4 ml) est ajouté gentiment. La suspension est laissée pour 10 minutes dans la glace. Stérilement, elle est aliquotée en volume de 50-80 μ l dans des éppendorfs, congelés par un passage rapide dans l'azote liquide et gardé à -70 °C.

2.4.3. Transformation des bactéries avec les plasmides recombinants

Les cellules de clonage *Escherichia coli* XL1-blue « heat-shock » compétentes et celles d'expression BL21 (DE3) pLysS, aliquotées en 50-80 μ l sont mises en contact avec 5 μ l du produit PCR (pour l'ensemble des amplifications de type mutagenèse dirigée).

Les bactéries sont incubées dans la glace (30 min), puis choquées à 42 °C (1 min 30 secondes) et enfin refroidies dans la glace (5 min). La totalité de la transformation est ensuite étalée sur les boîtes de Pétri contenant du milieu LB modifié et les antibiotiques appropriés : 60 μ g/ml Ampicilline pour les souches XL1-blue et 60 μ g/ml Ampicilline; 34 μ g/ml Chloramphénicol ; 1 % w/v glucose pour la souche BL21 (DE3) pLysS. Les cellules sont incubées une nuit à 37 °C.

2.5. Propagation des plasmides dans les bactéries *E.coli* « XL1-blue ».

4 à 8 clones par mutant sont sélectionnés et analysés par PCR sur colonie. Une colonie isolée de taille moyenne est piquée stérilement, repiquée sur une boîte de Pétri avec de milieu sélectif (modifié + 60 µg/ml Ampicilline qui est incubée une nuit à 37 °C) puis est utilisée pour l'amplification de la streptavidine en vue des analyses. L'amplification du gène de la streptavidine peut être effectuée à l'échelle de la colonie ou à l'échelle du plasmide déjà extrait. Le produit PCR est purifié par le kit « PCR Clean Up System » (Promega – Catalyst, Wallisellen, Suisse) et élué avec 30 µl d'eau MilliQ stérile à 65 °C. 5 µl du fragment purifié sont digérés par l'enzyme de restriction dont le site est apporté par la mutagenèse selon le protocole du fournisseur (Promega, Wallisellen, Suisse). La digestion est analysée sur gel (2 % w/v agarose ; 1X TAE ; 0,000 04 % w/v BET). Les positifs sont envoyés à séquencer (15 µl de fragment PCR + 1 µl d'amorce Sav EcoF ou Sav BamR à 10 µM) à Synergene (Schlieren, Suisse) ou à Microsynth Suisse. Les colonies positives par la digestion de la mutation silencieuse et le séquençage sont utilisées pour l'innoculation des cultures liquide (10 ml LB modifié, Ampicilline à concentration précitée, 37 °C, une nuit, agitation (250 rpm)). Ces cultures sont utilisées pour l'extraction du plasmide qui est plus tard introduit dans les bactéries d'expression BL21 (DE3) pLysS et finalement exprimé en protéine.

2.6. Procédures de production

2.6.1. Production des protéines à grande échelle

2.6.1.1. Production de la streptavidine recombinante dans un fermenteur de 10 l

Les cellules BL21 (DE3) pLysS « heat-shock » compétentes sont transformées par le plasmide pET11b-Sav et étalées sur milieu LACG (milieu LB modifié; 60 µg/ml Ampicilline; 34 µg/ml Chloramphénicol et 1 % w/v glucose). Après une nuit d'incubation (37 °C), une colonie isolée de taille moyenne est utilisée pour inoculer 150 ml (soit 1/75 du volume final de la culture) de milieu MTP (20 g/l bactotryptone ; 1,3 g/l Na₂HPO₄, 1 g/l KH₂PO₄ ; 8g/l

NaCl ; 15 g/l bacto yeast extract) en présence des antibiotiques appropriés (60 µg/ml Ampicilline ; 34 µg/ml Chloramphénicol) et de glucose (1 % w/v). Cette préculture est alors incubée une nuit sous agitation (37 °C ; 250 rpm) puis est mélangée à 200 ml de glucose (20 % w/v) puis est déversée dans 10 l de milieu MTP (Ampicilline 60 µg/ml ; Chloramphénicol 34 µg/ml ; concentration finale de glucose : 0,4 % w/v).

La culture est effectuée à 37 °C sous agitation (600 rpm) et aération (1 bar d'air) constante en présence d'antimousse A (SIGMA-Fluka, Buchs, Suisse). Lorsque l'absorbance (DO₆₀₀) atteint ~ 2,500, les cellules sont induites avec l'IPTG (concentration finale 0,4 mM).

Un aliquote de culture (1 ml) est prélevé à ce moment, puis toutes les heures. Cet échantillon est centrifugé (16 000 g ; 5 min, température ambiante), le milieu est éliminé et le culot est conservé à -20 °C jusqu'à son analyse par SDS-PAGE.

Trois heures après l'induction, la culture est arrêtée et centrifugée (3 600 g ; 10 min, 4 °C). Les culots sont lavés dans la solution de resuspension (100 ml ; 20 mM Tris-HCl pH=7,4 ; 0,02 % w/v NaN₃ ; 10 mM MgCl₂) et centrifugés (3600 g ; 20 min. 4 °C). Le surnageant est alors éliminé et le culot de bactéries est stocké à -20 °C, jusqu'à son utilisation.

2.6.1.2. Production de la streptavidine dans un fermenter de 2 l. Marquage isotopique

Le marquage isotopique de la streptavidine a été effectué en collaboration avec le département de Biologie Structurale et Biophysique du « Biozentrum », de Bâle, Suisse, le groupe de recherche du Professeur Stephan Grzesiek avec l'assistance directe de Dr. Daniel Häussinger.

Solutions « stocks » pour la production en milieu minimal isotopique :

- 10x PO₄: (13g KH₂PO₄), 10g (K₂HPO₄), 9g Na₂HPO₄, 2.4g K₂SO₄, ²H₂O jusqu'à 100 ml (pH=7.2 avec 10M NaOH)

- 100x $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$: 10.0g NH_4Cl (^{15}N), $^2\text{H}_2\text{O}$ jusqu'à 100 ml, pH=7.2 ajusté avec 5M NaOH dans $^2\text{H}_2\text{O}$)
- Solution des éléments présents en traces (dans environ 750 ml H_2O sont ajoutés : 6g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.15g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.8g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.7g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02g H_3BO_3 , 0.25g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5g EDTA. Le volume est complété jusqu'à 1 l avec H_2O . La solution est laissée sous agitation 2-3 jours.

Précultures :

Préculture 1 (30% $^2\text{H}_2\text{O}$ dans 20 ml volume final) (PCM_1)

- 2 ml $10 \times \text{PO}_4$ ($^2\text{H}_2\text{O}$) (Solution « stock » concentrée 10 fois)
- 3.7 ml $^2\text{H}_2\text{O}$
- 13.6 ml $^2\text{H}_2\text{O}$
- 0.2 ml 100x $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$
- 0.2 ml MgCl_2 (1M) dans $^2\text{H}_2\text{O}$
- 0.1 ml solution des éléments en trace
- 0.3 ml glucose (25 % w/w)
- Ampicilline (100 mg/ml) et Chloramphénicol (34 mg/ml) préparés dans $^2\text{H}_2\text{O}$

La préculture 1 (PCM_1) est développée pour 11-13h, à 28 °C, jusqu'à $\text{DO}_{600}=1.5$.

0.5 ml de la première préculture (PCM_1) sont utilisés pour inoculer la préculture 2 (PCM_2).

Préculture 2 (70% $^2\text{H}_2\text{O}$ dans 20 ml volume final) (PCM_2)

- 2.0 ml $10 \times \text{PO}_4$ ($^2\text{H}_2\text{O}$)
- 11.7 ml $^2\text{H}_2\text{O}$
- 5.6 ml H_2O
- 0.2 ml 100x NH_4Cl ($^2\text{H}_2\text{O}$)

- 0.1 ml MCl (1M) dans ($^2\text{H}_2\text{O}$)
- 0.1 ml solution d'éléments en trace
- 0.3 ml glucose (25% w/w)
- Ampicilline (100 mg/ml) et Chloramphénicol (34 mg/ml) préparés dans $^2\text{H}_2\text{O}$.

La préculture 2 est laissée pousser à 37 °C pour 5-7 h jusqu'à $\text{DO}_{600}=1.5$.

0.5 ml de cette préculture sont utilisés pour l'innoculation de la dernière préculture (PCM₃).

Préculture 3 (99 % $^2\text{H}_2\text{O}$ dans 50 ml) (PCM₃)

- 5 ml 10X (PO₄)
- 43.3 ml $^2\text{H}_2\text{O}$
- 0.5 ml 100X NH₄Cl ($^2\text{H}_2\text{O}$)
- 0.25 ml MgCl₂ (1 M) dans $^2\text{H}_2\text{O}$
- 0.25 ml solution des éléments en trace
- 0.7 ml glucose (25% w/w) dans $^2\text{H}_2\text{O}$

Cette préculture est laissée se développer à 28 °C jusqu'à $\text{DO}_{600}= 1.5$ (11-13h). La totalité est utilisée pour l'innoculation de la fermentation.

Culture minimale pour la fermentation (CMF)

- 95 ml PO₄
- 833 ml $^2\text{H}_2\text{O}$
- 9.5 ml 100x NH₄Cl ($^2\text{H}_2\text{O}$)
- 4.75 ml solution des éléments en trace

Fermentation (^{15}N - ^2H)

- 950 ml CMF
- 60 ml 25% glucose (1.5 % concentration finale)

- 24 ml 25 % glucose pour la consommation totale
- 100 µg/ml Ampicilline finale
- 40 µg/ml Chloramphénicol final
- IPTG $C_{\text{finale}} = 1 \text{ mM}$

Fermentation (^{15}N , ^2H , ^{13}C)

La fermentation (^{15}N , ^2H , ^{13}C) est effectuée avec le même protocole que celle (^{15}N , ^2H). Dans la composition des précultures le glucose utilisé est de type ^{13}C . Le glucose marqué pour la culture en fermentation (CMF) est à raison de 1% concentration finale. Le volume de travail de la fermentation est réduit à 0.6 l.

2.6.2. Production des protéines à petite échelle

- Préculture 7.5 ml de milieu supplémenté avec 7.5µl Ampicilline « stock » à 60 µg/ml ; 7.5 µl Chloramphénicol « stock » à 34 µg/ml ; 600 µl glucose « stock » 20% w/w, inoculée avec une colonie isolée de taille moyenne ou 10 µl de glycérol stock. Croissance une nuit à 37 °C sous agitation (250 rpm).
- Culture 50 ml de milieu supplémenté avec 50 µl Ampicilline « stock » à 60 mg/ml ; 50 µl Chloramphénicol « stock » à 34 mg/ml, inoculée avec la totalité de la préculture. Phase préinductive 3 heures, induction avec 75 µl IPTG « stock » à 0.8 M, phase postinductive 3 heures. Croissance à 34.5 °C sous agitation (400 rpm).

2.7. Procédures de purification des protéines obtenues

2.7.1. Purification des protéines à grande échelle

2.7.1.1. Purification de la streptavidine de type sauvage

Le culot de bactéries est décongelé puis resuspendu dans la solution de resuspension (100 ml). Quelques milligrammes de DNaseI (Roche, Rotkreuz, Suisse) sont alors ajoutés et

l'échantillon est incubé sous légère agitation à température ambiante (3-4 h). Le volume est complété à 400 ml avec le chlorure de guanidine (6 M ; pH=1,5) puis est dialysé (membrane de type Spectra/por MWCO : 6-8,000 de provenance Spectrum laboratories, Inc.) contre la même solution pour dénaturer la protéine (15 l ; 24 h ; température ambiante). On poursuit avec une dialyse de renaturation contre du Tris-HCl (20 mM ; pH=7,4 ; 10 l ; 24 h ; température ambiante), une centrifugation (20 000 g ; 30 min ; 4 °C), une concentration (jusqu'à ~ 100 ml ; 4 °C) et une diafiltration contre le tampon pH=9,8 en utilisant le système vivaflow 200. L'échantillon est alors centrifugé (47000 g ; 30 min. 4 °C), filtré (filtres GF53 et GF52, Schleicher & Schuell, Dassel, Allemagne) puis chargé sur la colonne de 2-aminobiotine équilibrée dans le même tampon. L'étape de la concentration et l'échange en vue du transfert de la solution protéique dans le tampon pH=9,8 peut être effectué par une dialyse de la solution dans le tampon pH=9.8 (plus souvent pratiqué). L'extrait protéique, après centrifugation (20 000 g ; 30 min ; 4 °C) est chargé sur la colonne de chromatographie d'affinité 2-aminobiotine. Après lavage jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm soit égale à 0, la protéine est éluée avec l'acide acétique (pH=2,9). L'éluât est ensuite dialysé une fois contre du Tris-HCl (10 mM ; pH=7,4 ; 8 l ; 24 h ; 4 °C), puis contre de l'eau distillée (8 l ; 24 h ; 4 °C) et enfin contre de l'eau MilliQ (5 l ; 24 h ; 4 °C). La protéine purifiée est alors congelée à -80 °C, lyophilisée puis stockée à 4 °C jusqu'à son utilisation. Le tableau 2.15 présente la composition des solutions impliquées dans la purification à grande échelle.

Tampon pH=9,8 1X		
(pH ajusté à la soude ou l'acide chloridrique)		
Produit	Concentration finale	Volume l l
NaHCO ₃ 1M	0.05	50 ml
NaCl 5M	0.5	100 ml
H ₂ O		850 ml
Acide acétique pH=2.9 1X		
(pH ajusté à la soude)		
Produit	Concentration finale	Volume l l
Acide acétique 5M	0.1 M	20 ml
H ₂ O		980 ml
Chlorure de guanidium 6M		
(pH ajusté à 1.5 avec HCl 36%)		
Produit	MM (g/mol)	Volime l l
Chlorure de guanidium	95.53	573.18 g
H ₂ O		Jusqu'à 1l

Tableau 2.15. Composition des solutions pour la purification de la streptavidine

2.7.1.2. Purification alternative de type « S112P »

Le mutant S112P a été purifié par une méthode alternative¹³⁰. Le culot de bactéries est décongelé puis repris dans la solution de resuspension (100 ml). Quelques milligrammes de

DNaseI sont alors ajoutés et l'échantillon est incubé sous légère agitation à température ambiante (3-4 h). L'échantillon est dilué 10 fois dans le tampon pH=9,8 (volume final ~ 2 l). Après centrifugation (20 000 g ; 30 min. 4 °C) et filtration (filtres GF53 et GF52, Schleicher & Schuell, Dassel, Allemagne), l'extrait protéique est chargé sur la colonne et traité comme décrit précédemment jusqu'à l'élution. Le volume d'élution est ensuite ramené à 400 ml avec du chlorure de guanidine (6 M ; pH=1,5), puis dialysé contre le même tampon (15 l ; 24 h ; température ambiante). S'en suivent 4 dialyses : deux contre du Tris-HCl (20 mM pH 7,4 ; 8 l ; 24 h ; température ambiante et 10 mM pH=7,4 ; 10 l ; 24 h ; 4 °C), une contre de l'eau distillée (8 l ; 24 h ; 4 °C) et une contre l'eau MilliQ (5 l ; 24 h ; 4 °C). L'échantillon est ensuite filtré, lyophilisé et conservé à 4 °C.

2.7.2. Traitement des protéines exprimées à petite échelle

Les culots de cellules de chaque expression en 50 ml est décongelé et resuspendu dans 1 ml de solution de resuspension (Tris/HCl 20 mM pH=7.4 ; NaCl 100 mM, PMSF 1 mM). 10 µl de DNAase (« stock » de 10 mg/ml) sont ajoutés. Une incubation sous agitation s'en suit jusqu'à digestion complète des acides nucléiques. Une centrifugation à 14 000 rpm (5min) sépare la fraction soluble de la fraction insoluble. La fraction soluble est gardée, la fraction insoluble est reprise dans 0.5 ml de solution de la resuspension. Une centrifugation à 14 000 rpm (5min) sépare la deuxième fraction soluble de la fraction insoluble. Les deux fractions solubles sont réunies. De la streptavidine est présente dans la troisième et quatrième fraction et peut être extraite si nécessaire.

2.8. Procédures d'analyse des protéines

2.8.1. Analyse des protéines exprimées à grande échelle

2.8.1.1. SDS-PAGE et SDS-B₄F

La majorité des gels de protéines issues d'une production à grande échelle sont de type SDS-PAGE (0,375 M Tris-HCl pH=8,8 ; 16 % acrylamide–bis-acrylamide 37,5 : 1 ; 0,1 % w/v SDS ; 0,034 % w/v APS ; 0,05 % v/v TEMED) supplémenté d'un gel de concentration (0,125 M Tris-HCl pH=6,8 ; 5% acrylamide–bisacrylamide 37,5 ; 0,1 % w/v SDS ; 0,1 % w/v APS ; 0,15 % v/v TEMED) . L'aliquote de cellules congelé en vue des analyses (au moment de l'induction, première, deuxième et troisième heure de la phase postinductive) est décongelé. Les cellules décongelées sont reprises dans un volume (en microlitres) d'H₂O 40X l'absorbance mesurée à 600 nm au moment de prélèvement de l'échantillon. 1 µl de DNAase est ajoutée (« stock » 10 mg/ml) et les cellules sont incubées 30 min à température ambiante sous légère agitation. Elles sont ensuite vortexées, puis centrifugées (5 min ; 14 000 g ; température ambiante). Le surnagent est transféré dans un nouveau tube. C'est la fraction soluble. Le culot est ensuite repris dans le même volume que le volume de reprise des cellules congelées (40xAbsorbance à 600 nm) µl. C'est la fraction insoluble. Des aliquotes nouveaux sont faits en y ajoutant 12 µl d'échantillon, 3 µl de bleu de charge 5X. Le témoin positif est composé de 2 µl de la streptavidine type sauvage lyophilisée (« stock » à 10 mg/ml), 10 µl H₂O et 3 µl bleu de charge 5X.

Le gel est immergé dans le tampon de la migration (25 mM Tris-HCl ; 0,192 M glycine ; 0,1 % w/v SDS) et les échantillons sont chargés accompagnés d'un marqueur de protéines. Le gel migre à 200 V jusqu'à ce que le bleu de bromophénol présent dans le tampon de charge 5X sorte du gel (environ 40 min). Le gel est ensuite incubé dans la solution de fixation (50-100 ml ; 25 % v/v isopropanol ; 10 % v/v acide acétique) durant 5 minutes dans le four à micro-

ondes (position médium), coloré au bleu de coomassie (100 ml ; 0,25 % w/v coomassie brilliant blue ; 45 % v/v méthanol ; 10 % v/v acide acétique) pendant 5 minutes dans un four à micro-ondes et décoloré (deux fois 20 minutes dans 50-100 ml de 5 % v/v méthanol ; 7 % v/v acide acétique dans le four à micro-ondes position médium). Le gel est ensuite laissé une nuit dans la solution de décoloration (100 ml ; température ambiante), puis photographié dans un transilluminateur de type Gel-Doc 1000 (Bio-Rad, Reinach, Suisse) supplémenté d'un écran de type Conversion Screen (Bio-Rad, Reinach, Suisse).

L'activité des mutants de la streptavidine présents dans des extraits est détectable par l'exploitation de la fluorescence de la biotine-4-fluoresceine. Pour cet objectif, les conditions de SDS-PAGE ont été adaptées permettant la détection des streptavidines fonctionnelles par gel SDS-B₄F¹³¹. 1 µl de B₄F (0.6 mM) est ajouté à 12 µl de la streptavidine exprimée. Les échantillons sont incubés pendant 15 minutes sous une agitation douce et chargés en SDS-PAGE. Le gel est photographié dans un transilluminateur de type Gel-Doc 1000 (Bio-Rad, Reinach, Suisse) supplémenté d'un écran de type Conversion Screen (Bio-Rad, Reinach, Suisse).

2.8.1.2. « ESI-MS »

La détermination des masses molaires de la streptavidine type sauvage et des différents mutants par « ESI-MS » a été effectuée au sein du groupe du professeur Johann Schaller (Université de Berne). L'appareil utilisé est de type VG Platform Mass Spectrometer (Micro mass instruments, Manchester, UK).

2.8.1.3. Détermination des sites actifs libres

2.8.1.3.1. Par exclusion de HABA¹³² par la biotine

Le HABA (acide 2-(4'-hydroxybenzeneazo) benzoïque), dont la structure est présentée dans la figure 2.2, forme un complexe coloré avec la streptavidine dont l'absorbance est déterminable par spectrophotométrie à 506 nm. Cependant, la constante d'affinité du complexe HABA-streptavidine est beaucoup plus faible que celle du complexe biotine-streptavidine. Si de la biotine est ajoutée à la solution contenant le complexe HABA-streptavidine, l'absorbance diminue dû à l'expulsion du HABA des sites actifs, dès lors occupés par la biotine.

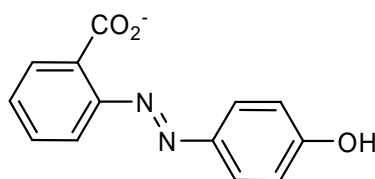


Figure 2.2 : Structure de HABA

Les solutions de biotine et de HABA sont préparées dans le tampon phosphate du titrage (2.4 ml ; 26 mM KH₂PO₄ ; 41 mM : Na₃PO₄ pH=7 ; Merck Suisse). La solution de HABA (300 µl, 9.6 mM dans le tampon de titrage) et la solution de biotine (0.096 µM dilué dans le tampon de titrage). La streptavidine est préparée en solution « stock » avec une concentration égale à 152 µM ($M_{sav} = 16'423 \text{ g/mol} \times 4$). La solution « stock » est utilisée pour la solution de travail de 8 µM pour un volume de travail de 2.4 ml.

La concentration de la streptavidine est estimée par pesée et par absorbance ($\epsilon = 167\,280 \text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1})$) ceci permettant d'estimer l'activité de la protéine.

300 µl de HABA (voir concentration ci-dessus) sont ajoutés dans la cuve contenant la streptavidine (voir solution et volume de travail). La cuve est retournée 4-5 fois et laissée 5 minutes. Cette quantité de HABA (300 µl) assure un excès (tous les sites actifs de la streptavidine sont saturés en HABA).

La biotine (à la concentration de travail) est ajoutée par incréments de 10 µl et l'absorbance est notée après ajout de chaque incrément.

Au moment de la saturation des sites actifs libres de la streptavidine par la biotine l'absorbance reste constante.

$$\text{Nb sites actifs} = C_{\text{biot}} \times V_{\text{biot}} / C_{\text{SAV}} \times V_{\text{SAV}}$$

Avec V_{biot} = Volume de solution biotine ajouté au point d'équivalence, C_{SAV} = concentration de la streptavidine déterminée par pesée et par absorbance et V_{SAV} = volume de la streptavidine (2,4 ml).

Remarque :

Le calcul des sites actifs utilisant la concentration de la streptavidine déterminée par pesée (concentration plus grande que réelle) fausse le nombre de sites actifs en les diminuant. Lorsque le calcul est fait en utilisant la concentration de la streptavidine déterminée par absorbance, la valeur des sites actifs est plus élevée puisque la concentration de la streptavidine est plus basse. En effet, par cette méthode, les sels et les autres impuretés ne sont pas pris en compte dans le calcul.

2.8.1.3.2. Par le « quenching » de la fluorescence de la B₄F¹³³

La biotine-4-fluoresceine (B₄F), dont la structure est présentée sur la figure 2.3, est une molécule fluorescente dont l'intensité de la fluorescence est diminuée par le « quenching » dans la cavité hydrophobe de la streptavidine.

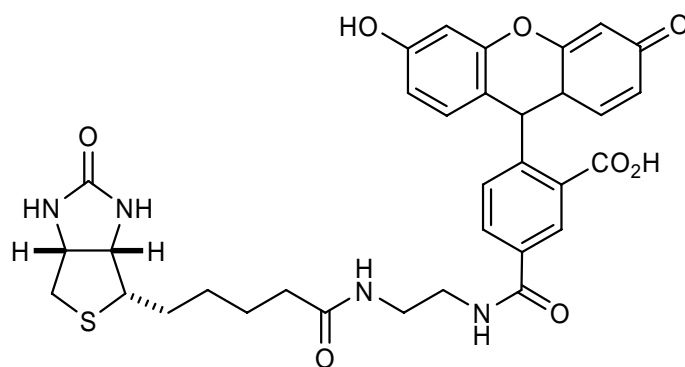


Figure 2.3. Structure de la biotine-4-fluorescéine

Cette fluorescence augmente d'une façon linéaire lors de la saturation de la streptavidine en B₄F. La détermination de l'intensité de la fluorescence « quenchée » et la fluorescence libre « non quenchée » permet la quantification des sites actifs libres de la streptavidine purifiée ou sa quantité dans des extraits protéiques. Ceci est possible par un titrage direct entre une solution de la streptavidine et la solution de B₄F à une concentration connue.

Préparation des solutions et des réactifs :

Afin de travailler avec la concentration réelle de la B₄F la détermination de sa concentration réelle par absorbance est conseillée (ϵ_0 Biotine-4-Fluorescéine = $71\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

La B₄F utilisée pour le titrage doit être égale à 15 μM (solution de travail).

Une solution « stock » de protéine (la streptavidine) dissoute dans de l'eau milliQ (10 mg/ml \sim 152 μM) est diluée 75 fois (133 $\mu\text{g/ml}$ \sim 2 μM). La concentration exacte de l'échantillon est déterminée par spectrophotométrie à $\lambda = 280\text{ nm}$. Afin de quantifier la quantité de sels (activité par absorbance / activité par pesée), cette concentration est calculée à partir de la masse pesée.

50 μl de la solution diluée de la protéine est transférée dans la cuvette de mesure contenant de la solution de titration (2.45 ml). La B₄F (15 μM) est ajoutée par incréments de 2.5 μl par minute. L'intensité de la fluorescence mesurée est rapportée en fonction de volume B₄F.

Le nombre de sites actifs est donné par le calcul :

$$n_{\text{sites}} = 4[\text{Sav}_{\text{mes}}] / [\text{Sav}_{\text{th}}] = [4n\text{B}_4\text{F} / 4\text{VSav}] / [\text{Sav}_{\text{th}}]$$

n_{sites} : nombre de sites actifs libre, Sav_{mes} : la concentration de la streptavidine par masse et par absorbance, $n\text{B}_4\text{F}$: nombre de moles de biotine-4-fluoresceine ajoutés au point de l'équivalence, V_{SAV} : le volume de protéine titré (50 μl).

2.8.2. Analyses des protéines exprimées à petite échelle

2.8.2.1. SDS-PAGE et SDS-B₄F

Au moment de l'arrêt de la croissance 500 μl sont prélevées et centrifugées. Le culot à la fin de la centrifugation est congelé. Après séparation des fractions soluble et insoluble (la solution de resuspension est précitée dans §.2.7.2 et la préparation des échantillons dans §.2.8.1.1) : 12 μl de chaque fraction sont déposés sur gel avec 3 μl 5X tampon de charge pour analyse sur SDS-PAGE ou SDS-B₄F.

2.8.2.2. Quantification des rendements en plaque ELISA

Ce type de titrage est aussi de type direct exploitant le principe de « quenching » de la fluorescence de la biotine-4-fluoresceine présenté dans § 2.8.1.3.2. Ce paragraphe présente le titrage direct de la streptavidine en plaques ELISA qui permet l'analyse simultanée de 7 échantillons contre 1 échantillon pour le titrage en cuve (§ 2.8.1.3.2). Il a été mis au point par Monsieur Thibaud Rossel en vue de la quantification de la streptavidine exprimée en erlenmeyers de 250 ml (production en 50 ml de milieu).

Préparation des solutions et des réactifs :

Tampon (1.09887 Tritisol pH=7 prêt à l'emploi (provenant de Merck) + 0,1 mg/ml de BSA (« bovin » sérum albumine) en poudre. Solution «stock» de B₄F (Sigma-Aldrich).

12.926 ml de DMSO dans 5 mg de B₄F (0.6 mM). La concentration réelle de la solution « stock » est déterminée comme expliqué dans §2.8.1.3.2. La solution est aliquotée en 0.5 ml dans des eppendorfs recouverts de papier aluminium et les aliquots sont conservés à -80 °C.

Les solutions de travail de B₄F (solution de 10 µM et 40 µM) sont préparées à partir de la solution « stock » dans du tampon Merck prêt à l'emploi (Tritisol) avec BSA (tableau 2.16).

Remarque :

Ces concentrations couvrent l'intervalle des rendements pour les protéines exprimées en erlenmeyers de 250 ml (K121X, L124X, S112AK121X, S112KK121X, S112AL124X, S112KL124X), mais peuvent être adaptées à d'autres niveaux d'expression.

Stock B ₄ F 10mM (2 ml)		Stock B ₄ F 40mM (2 ml)	
Volume total	2000 µl	Volume total	2000 µl
Volume B ₄ F («stock»)	33.3 µl	Volume B ₄ F («stock»)	133.2 µl
Volume tampon	1966.7 µl	Volume tampon	1866.8 µl

Tableau 2.16. Quantités de B₄F pour le titrage en microplaques

Solution de protéine à environ 2 µM (dépend de l'extrait). Préparation de 1.5 ml (marge) de protéine pour une ligne (12 puits) de plaque à 96 puits. Une dilution d'un facteur 23 est effectuée pour l'extrait à titrer:

Volume total (12 puits)	1500 µl
Volume d'extrait	65.21 µl
Volume de tampon BSA	1434.79 µl
Concentration finale protéine	2 µM

Tableau 2.17. Quantité de protéine pour le titrage en microplaques

Les mesures sont effectuées en microplaques de 96 puits en PS (corning life sciences). Chaque puit contient 100 µl de protéine à environ 2 µM. L'appareil de mesure est un

fluorimètre (Tecan Reader) avec comme caractéristiques de Fluorescence (Ex: 485, Em: 528, Gain: 50).

Les puits de la plaque sont remplis avec 100 μ l de protéine à 2 μ M. Le blanc est fait (première ligne de chaque plaque). A chaque puit sont ajoutés les incréments de B₄F en pipetant (8; 10; 12; 14; 16; 18; 20; 22; 24; 26; 28; 30 μ l) par une micropipette multicanal. Les plaques sont centrifugées (1000 rpm, 1 min) et laissées 10 min à l'abri de la lumière. La mesure est prise avec le spectrophotomètre (Tecan Reader). Les mesures sont rapportées comme intensité relative de fluorescence par rapport au volume B₄F ajouté. A titre d'exemple la quantification d'un extrait de streptavidine est présentée dans la figure 2.4. Le point de saturation permettant le calcul de la quantité de streptavidine est indiqué par une flèche sur la figure 2.2.

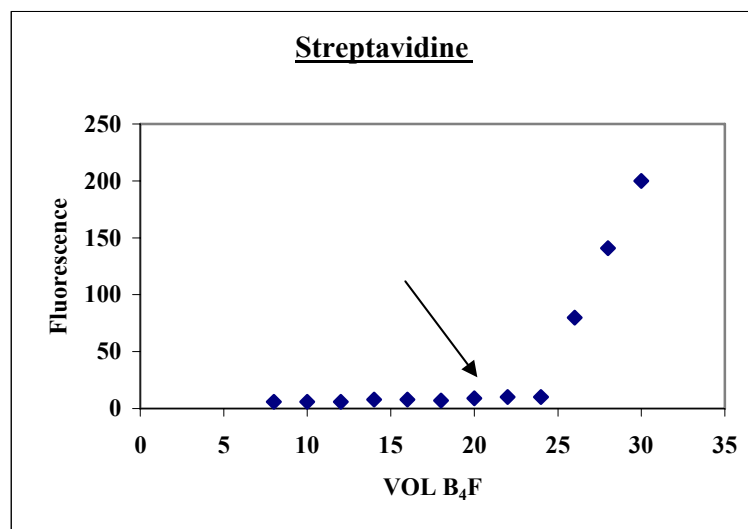


Figure 2.4. Courbe de titrage permettant la quantification de la streptavidine en microplaques

La concentration de la protéine dans l'extrait est calculée d'après les équations présentées dans le tableau 2.18.

A=Mole de protéine pour 100 μl	= Volume equivalence x concentration B ₄ F
B= Nombre de mole de protéine par ml	= (Facteur de dilution x A x 10)/4
C= Concentration protéine (mg/ml)	= B x M protéine X 1000

Tableau 2.18. Détermination de la concentration de la streptavidine en extrait

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Préambule

Les métalloenzymes artificielles basées sur la technologie streptavidine-biotine permettent de dissocier l'activité catalytique exercée par le métal, de la sélectivité due aux interactions critiques avec la deuxième sphère de coordination (la protéine)⁸⁵. Une optimisation chimio-génétique vise à moduler ces deux composants de façon à ce que les métalloenzymes artificielles soient hautement énantiosélectives^{52, 56, 57, 134}. Bien que l'éventail des réactions, évaluées par les chimistes du groupe, en présence des protéines développées touche l'hydrogénation d'oléfines^{86, 135} ou des oxidations énantiosélectives¹³⁶, l'accent dans la présentation des résultats obtenus est porté sur le transfert hydrogénant de dérivés carbonyles¹³⁷.

La diversité protéique nécessaire pour la catalyse asymétrique, but de ce travail, a porté sur plusieurs paramètres : la mutagenèse des résidus proches du métal catalytique (§3.2.1, § 3.2.2), l'exploration de la boucle 7-8 (§3.2.2.2), et le « redesign » du gène de la streptavidine (§3.3).

Le choix des mutations a été basé sur des études structurales (simulations « docking » et co-cristallisation) de la streptavidine en présence des complexes catalytiques biotinylés. Au début de ce projet, des simulations de « docking » (effectuées par une collaboration avec l'Institut National de Chimie de Ljubljana et notamment par le Dr. S. Mazurek) entre la streptavidine et des complexes biotinylés ont été une alternative instructive à la structure réelle de la streptavidine contenant un complexe biotinylé, renseignant sur des acides aminés proches du Ruthénium (Ru). Une mutagenèse de saturation S112X⁸⁷ et l'exploration de la

boucle 7-8 de la streptavidine ont été privilégiées à cause de leur proximité du métal catalytique.

La localisation du catalyseur $[\eta^6\text{-(arène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ (arène = *p*-cymène, benzène) a été estimée par des simulations « docking » avec un modèle de la streptavidine rigide en utilisant « Auto Dock 3.0.5 ». Le principe consiste à simuler les possibilités d'ancrage d'une petite molécule (ici le complexe biotinylé) dans une macromolécule hôte (ici la streptavidine). Lors du processus de minimisation énergétique, seules certaines liaisons du complexe biotinylé sont optimisées tandis que la streptavidine est maintenue rigide (sans degré de liberté)^{138, 139}. Pour cette raison, cette étude est strictement qualitative. Comme l'identification d'un minimum énergétique global est difficile (le choix du meilleur ligand « docké » est arbitraire), plusieurs simulations de « docking » ont été réalisées. Toutefois, la position de la biotine dans la protéine étant parfaitement définie, grâce à la structure cristallographique de la biotine incorporée dans la streptavidine, il est facile d'exclure les résultats aberrants par l'application du paramètre statistique « rms » (« root mean square error »). Le paramètre statistique « rms » évalue la qualité des simulations docking par la comparaison de l'emplacement du bicyclic de la biotine (connu exactement par la structure aux Rayons-X) avec l'emplacement du bicyclic de la biotine du ligand docké. Seules les structures de qualité dont le « rms » est inférieur à 1 Å sont retenues pour les futures analyses. En d'autres termes cela signifie que ce sont des structures pour lesquelles la biotine du ligand docké est presque identique à la biotine de la structure aux rayons X pour une biotine co-cristallisée avec la streptavidine. Ces structures sont gardées pour le calcul des distances entre le Ruthénium (Ru) catalytique et les acides aminés de la streptavidine.

Un minimum de simulations est nécessaire pour que le calcul des distances entre le complexe biotinylé et les acides aminés qui l'entourent soit statistiquement valable. Les deux meilleurs complexes, issus de l'optimisation chimique ($[\eta^6\text{-(arène)Ru(Biot-}p\text{-L)H}]$ arène=*p*-cymène,

benzène) sont préparés (sur Hyperchem 7.5) à partir des structures cristallographiques du complexe $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{TsDPEN})\text{Cl}]$. Il faut noter que pour la minimisation énergétique, certaines liaisons du complexe ont été figées. La configuration du Ruthénium (Ru) a été fixée soit (*R*) soit (*S*). Ces conditions accomplies, cinquante simulations ont été réalisées pour les 4 isomères différents, soit 200 simulations au total pour chacun des complexes¹⁴⁰. Sur les 200 résultats obtenus pour le complexe ($[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\mathbf{Biot}\text{-}p\text{-}\mathbf{L})\text{H}]$), 135 sont retenus (« rms » < 1 Å). Les distances entre le Carbone C α (carbone asymétrique de chaque résidu d'acide aminé du monomère A) et le Ruthénium (Ru) ont été calculées et la valeur moyenne est reportée sur la figure 3.1A issue de l'article de Letondor⁸⁷. La figure 3.1B présente un agrandissement de la boucle 7-8.

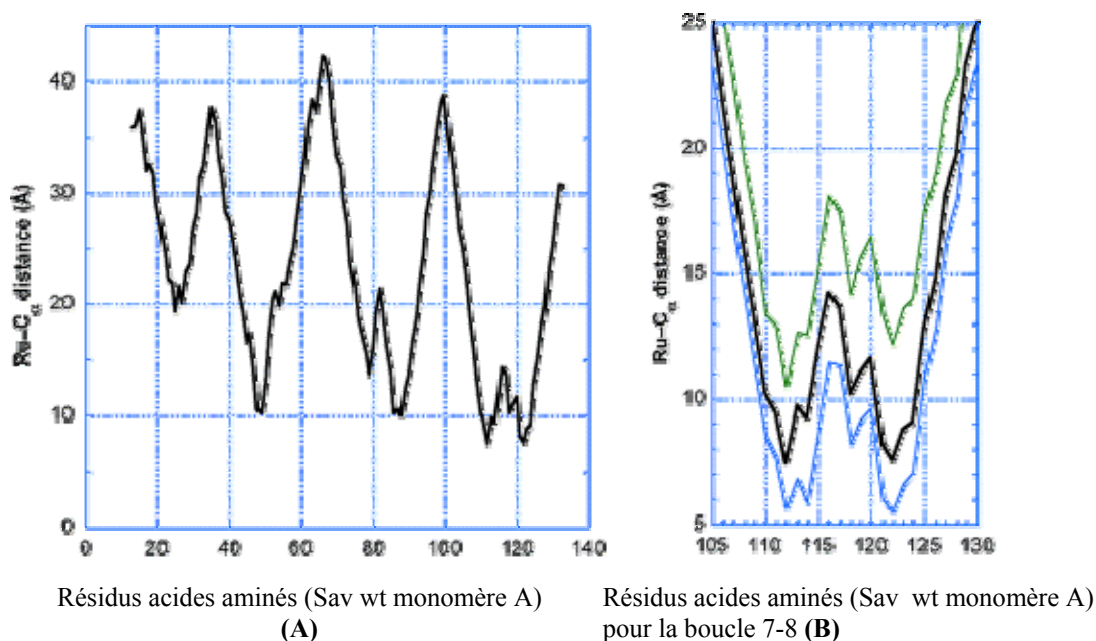


Figure 3.1. Distances moyennes (C α)-Ru pour le monomère A

avec le catalyseur ($[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\mathbf{Biot}\text{-}p\text{-}\mathbf{L})\text{H}]$)¹⁴¹

A. Distances moyennes C α -Ru pour le monomère A avec le catalyseur

$[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\mathbf{Biot}\text{-}p\text{-}\mathbf{L})\text{Cl}]$ incorporé dans la sav sauvage

B. Agrandissement de la boucle 7-8 (résidus les plus proches)

indiquant la distance moyenne (noir), minimale (bleu) et maximale (vert)¹⁴¹.

Les deux résidus les plus proches du Ruthénium (Ru) ont leur C α qui se situe entre 7 et 8 Å du métal catalytique (Fig. 3.2): il s'agit de la sérine S112 (7.41 Å) et de la sérine S122 (7.51 Å). Nous pouvons voir sur la figure 3.2 que la sérine S122 pointe vers l'extérieur du site actif, contrairement à la sérine S112, qui pointe vers l'intérieur. La position S112 a été donc choisie comme étant plus propice à influencer la sélectivité de l'enzyme artificielle.

Afin d'explorer les possibilités de mutations dues à la présence des trois autres monomères (B, C et D), les distances du Ruthénium (Ru) « docké » dans le monomère A, par rapport à chacun des acides aminés des monomères (B, C et D) ont été également calculées. Il s'agit de déterminer les acides aminés de ces trois monomères qui sont les plus proches du Ruthénium (Ru). La notion « proche », est définie ici comme une distance inférieure à 10 Å. Un seul Carbone asymétrique (C α), appartenant à la lysine 121 (K121) du monomère C s'est révélé proche du Ruthénium (Ru) du monomère A (9.42 Å).

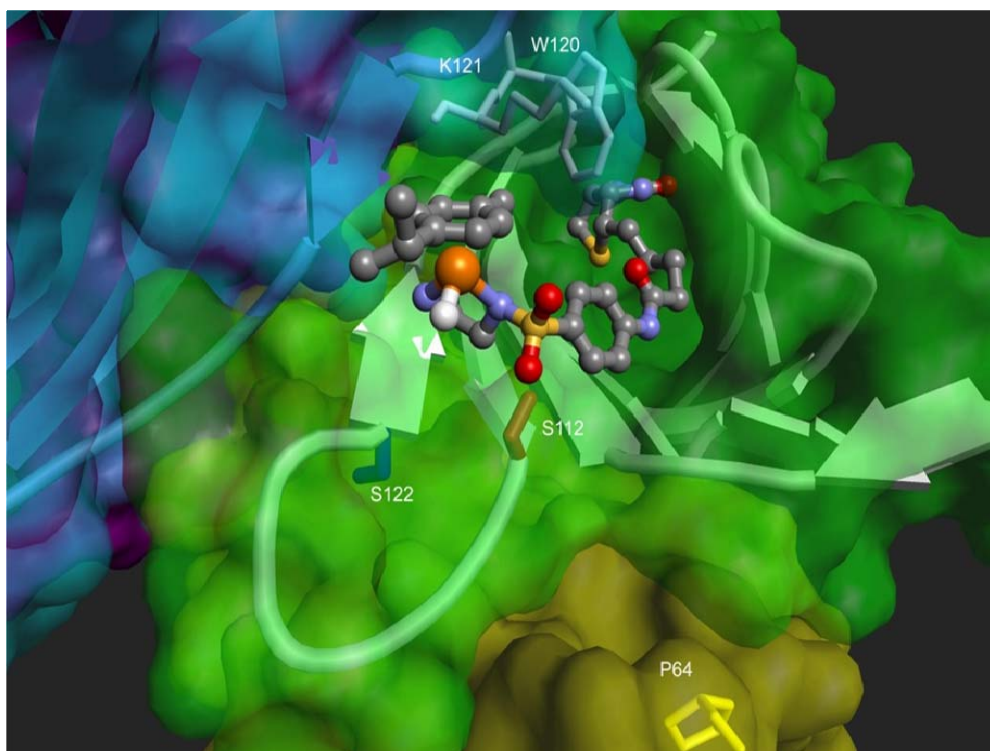


Figure 3.2. Visualisation des simulations « docking » entre la streptavidine et le $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{H}]^{141}$

Le « docking » prédit donc plusieurs résidus proches du métal catalytique⁸⁷. La position S112 a été privilégiée comme la première à exploiter pour l'optimisation génétique pour les raisons suivantes :

- elle est à la base de la boucle 7-8 qui s'ouvre sur la cavité. L'apport de diversité à cet endroit peut permettre à la boucle d'adopter différentes conformations susceptibles d'interagir avec le site catalytique à proximité.
- Son carbone (C α) est situé à 7.41 Å du Ruthénium (Ru) qui exerce l'activité catalytique. Sa chaîne latérale pointe vers la cavité hydrophobe.

Nous venons de voir que le « docking » permet d'identifier des positions d'acides aminés proches du métal catalytique. Sachant que cette approche reste purement théorique, nous avons décidé de poursuivre les voies d'obtention de la structure de la streptavidine contenant un complexe biotinylé. Dans un premier temps, nous avons démarré par la méthode RMN mais il s'est avéré qu'elle était longue et difficile à mettre en œuvre, c'est pourquoi nous avons utilisé une autre méthode appropriée pour ce genre d'étude : la résolution de la structure par rayons-X.

En collaboration avec l'équipe du Prof. Ronald Stenkamp (Université de Washington-Etats-Unis), le Dr. Marc Creus a réussi à co-cristalliser un mutant de la streptavidine (S112K) exprimé pendant le travail de cette thèse avec le complexe $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ (Fig. 3.3). Les acides aminés situés à moins de 5 Å du Ruthénium (Ru) ont été jugés comme d'excellents candidats pour une optimisation génétique. Ces résidus se trouvent dans la zone délimitée par la sphère jaune sur la figure 3.3 et sont la lysine 112 (112K) des monomères A et B, la lysine 121 du monomère B et la leucine 124 (L124) du monomère A.

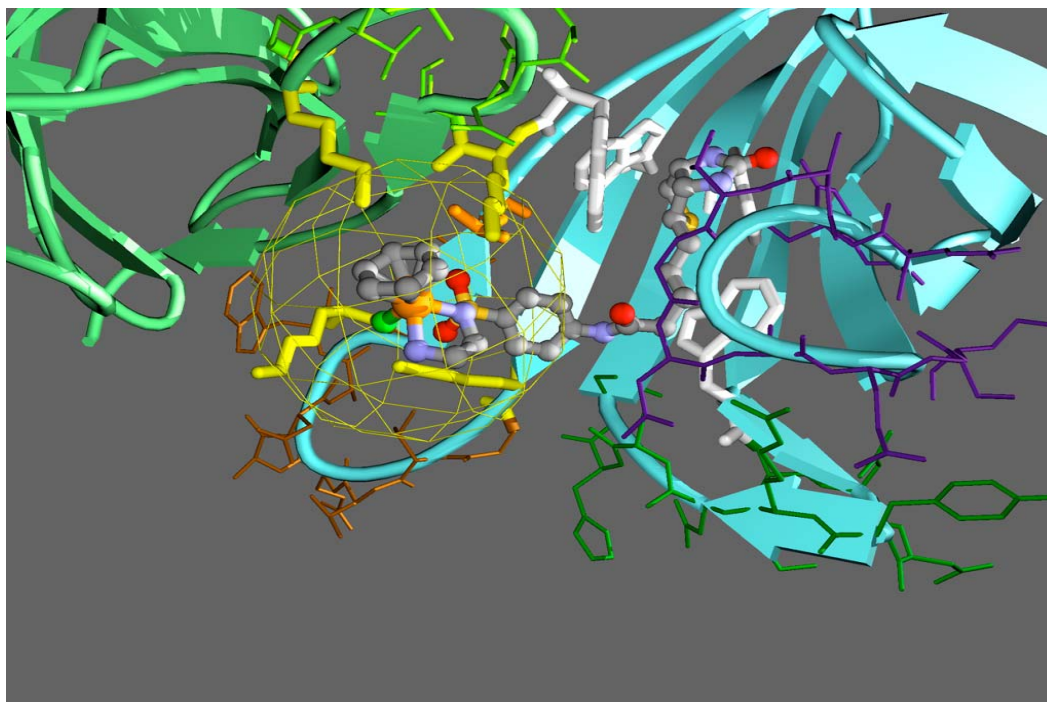


Figure 3.3. Co-cristallisation de S112K et le $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$

Dans l'esprit d'une optimisation combinatoire, une expérience de « Designed Evolution » (§3.2.4) a réuni les meilleurs mutants suggérés par le « docking » (S112A pour sa sélectivité (*R*) et S112K pour sa sélectivité (*S*)) aux positions proches du métal catalytique Ruthénium (Ru) basées sur la structure aux Rayons-X. Quatre doubles saturations ont été conçues pour cette approche : S112AK121X, S112KK121X, S112AL124X, S112KL124X (X=19 acides aminés).

Le criblage de la diversité protéique en vue d'une optimisation de l'énantiosélectivité est largement dépendant du mode d'expression des protéines obtenues. Pendant la première période de ce projet, un système d'expression en fermenteur de 10 l assurant d'excellents rendements (200 mg/l), au prix d'un travail de 2-3 semaines pour une isoforme de protéine, a été mis au point par le Dr. Nicolas Humbert¹³⁰. Pour permettre de gagner de temps et d'explorer plusieurs séquences protéiques, il a été mis au point en parallèle un système d'expression des protéines à petite échelle (50 ml) associée à une immobilisation sur biotine agarose.

L'optimisation des niveaux d'expression en erlenmeyers (50 ml) a porté sur plusieurs paramètres: le volume et la composition nutritionnelle du milieu, l'aération, la température et l'extraction de la protéine afin de permettre un criblage catalytique.

3.2. Diversification de la streptavidine fondée sur des bases rationnelles

Il a été publié que les mutations distantes du site actif améliorent souvent la stabilité et la solubilité des enzymes tandis que la sélectivité dépend plus des mutations proches du site actif^{142, 143}. L'emplacement des mutations, au sein du gène, va avoir une répercussion sur les performances différentes de la protéine telles que la solubilité, la stabilité, etc..., ce qui souligne la nécessité de pouvoir déterminer assez précisément la position du métal catalytique. La détermination de la localisation des acides aminés proches du métal catalytique a été effectuée par le « docking » et la co-crystallisation comme décrit dans § 3.1 et a servi pour les décisions des positions des acides aminés de la streptavidine à optimiser par la mutagenèse dirigée et de saturation.

3.2.1. Optimisation génétique par mutagenèse associée au « docking »

3.2.1.1. Saturation S112X

Il serait instructif d'évaluer les 19 acides aminés naturels à la position S112X, l'acide aminé le plus proche du Ruthénium (Ru), en termes d'effet sur l'énantiosélectivité. Une expérience de mutagenèse de saturation en position S112, s'est soldée par une génération de 19 mutants de la streptavidine. Le criblage des mutants du premier tour de l'optimisation génétique a été effectué par le Dr. Nicolas Humbert¹³⁰. Comme la librairie de mutants S112X

a été obtenue par la technique « nns », l'identification des séquences dans les clones obtenus a été réalisée par un criblage avec la KpnI et un séquençage.

Le crible par l'enzyme KpnI est effectué sur 63 clones. 34 clones portent le plasmide type sauvage sans site KpnI. Bien que le fournisseur du kit de mutagenèse précise que le rendement d'insertion des mutations n'est que de 80 %, cela n'explique pas une telle proportion de négatifs. La fragilité des plasmides type pET est probablement à l'origine de ce résultat. Même conservé à -20 °C dans le tampon TE, le plasmide a tendance à se trouver sous forme circulaire-ouverte s'il est stocké plusieurs mois. Il est fort probable que lors de la PCR, les brins coupés se réhybrident sur la matrice permettant l'amplification d'une séquence ne portant pas la mutation. Ce phénomène n'est jamais apparu aussi flagrant lors de la mutagenèse dirigée. En effet, à chaque fois, seules 2 à 4 clones sont séquencés et les négatifs sont rares. Dans le cas de la mutagenèse de saturation S112X, le nombre de séquençages est plus élevé.

Les séquences obtenues sont montrées sur la figure 3.4. La séquence de 11 nouveaux mutants est mise en évidence. Les séquences les plus fréquemment obtenues sont celles de S112P, du type sauvage avec le site KpnI (à chaque fois un codon différent du codon naturel) et S112F. Deux séquences sont dégénérées en position 112, il s'agit probablement d'un problème survenu lors de la PCR sur colonie. Les bactéries XL1-blue sont relativement petites lorsqu'elles sont nombreuses sur boîte de Pétri et il n'est pas toujours facile de différencier à l'oeil nu une colonie isolée et deux colonies fusionnées.

Aucun codon stop n'est généré, ni de mutation S112H, S112I, S112N, S112Q, S112T, S112W ou S112Y. Par soucis d'économie (proportion de type sauvage non muté trop importante), ces 7 mutants et S112M (dont la PCR a généré un décalage du cadre de lecture) sont finalement générés par mutagenèse dirigée avec des amorces spécifiques par moi et le Dr. Nicolas Humbert.

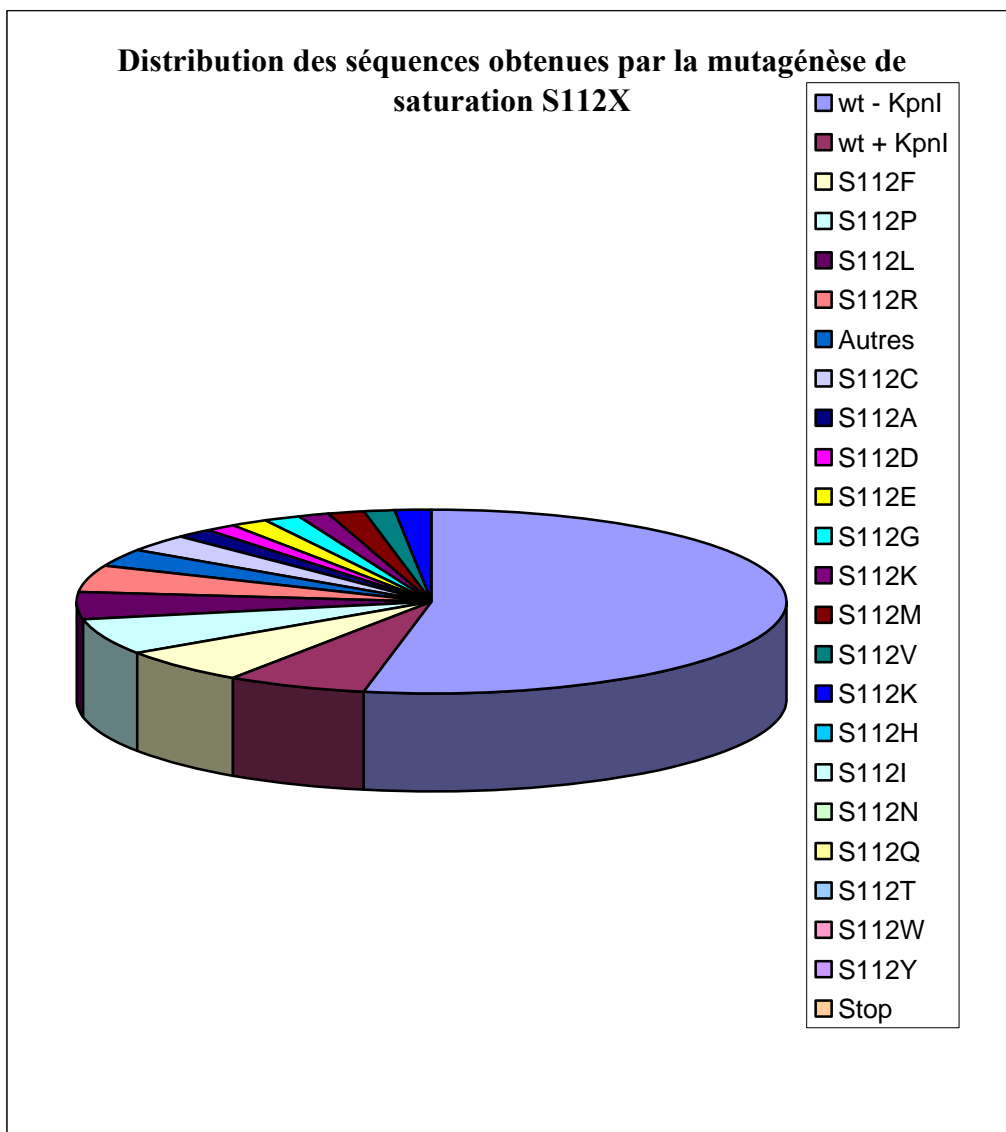


Figure 3.4. Résultats de la mutagenèse de saturation S112X (n=64 clones)

3.2.1.2. Exploration de la boucle 7-8

En vue d'une continuité de l'optimisation génétique, je me suis focalisée sur des acides aminés plus éloignés du métal catalytique Ruthénium (Ru) que la position S112, tout en restant suffisamment proches pour interagir avec l'entité catalytique. Le « docking » a prédit la proximité de la boucle 7-8 du site catalytique (Fig.3.1B). L'étude de la séquence des acides aminés de cette boucle montre que des acides aminés polaires ou chargés assurent l'interface entre le milieu aqueux et la cavité hydrophobe. Ils sont donc capables de former des interactions hydrogènes ou polaires avec le complexe catalytique. Les mutations T114G, T115A, E116A, N118A, ont été dessinées pour éliminer ces interactions. Cette action a entraîné une exploration du site actif, ce qui se révélera plus tard avoir un effet positif sur la sélectivité.

Les mutants de la boucle 7-8 ont été obtenus avec des amorces chevauchantes présentées dans §.2.1.1.2. Les amplifications ont été de type mutagenèse dirigée. Les séquences obtenues ont été criblées en vue l'analyse de la mutation silencieuse.

Deux types de criblage par mutation silencieuse sont envisageables. La première possibilité porte sur la digestion du plasmide complet. Dans ce cas, la seule coupure (si la mutation insérée est unique pour la séquence totale de plasmide) sur le plasmide le linéarise et ce dernier migre sur gel d'agarose comme une seule bande correspondant exactement à la taille de plasmide (dans le cas de pET 11b - streptavidine 6000 paires de bases) (Fig 3.5). Par contre si cette unique coupure n'a pas eu lieu sur le plasmide soumis à la digestion et à condition d'une bonne qualité de l'ADN de plasmide, les trois formes de plasmide intact devraient être observables : la surenroulée, l'enroulée et le plasmide circulaire relaxé. Dans cette démarche, le plasmide digéré et le même plasmide non digéré sont déposés et comparés sur gel d'agarose.

Il est parfois difficile de distinguer sur gel d'agarose les trois états d'un plasmide. Une coupure au sein du gène muté permet de voir clairement les deux bandes distinctes.

Une amplification du gène de la streptavidine par les amorces Sav EcoF et Sav BamR génère une bande correspondant au gène de la streptavidine. Sa digestion enzymatique à la mutation silencieuse introduite aux alentours de la position T114 doit produire deux bandes distinctes de 330pb et 150 pb. L'amplification du gène de la streptavidine (Fig.3.6) peut s'effectuer au niveau de la colonie dont la positivité en termes de digestion par la mutation silencieuse va justifier l'extraction de plasmide et sa production en protéines.

Au regard des digestions testées sur 10 colonies isolées T114G (Fig. 3.7), 3 apparaissent insensibles à la KpnI (pistes: 3, 4, 7), ceci suggérant qu'ils portent la séquence type sauvage. Les autres (pistes : 2, 5, 6, 8, 9, 10, 11) présentent des profils de digestions correspondant à la taille attendue. Une de ces colonies a été utilisée pour l'extraction de plasmide mutant et sa production en protéine.

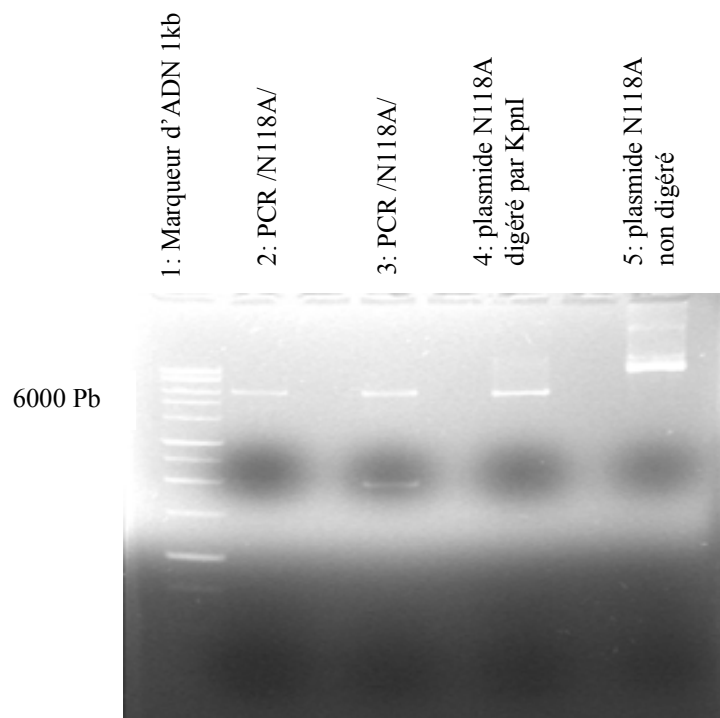


Figure 3.5. Gel d'agarose TBE 1%
Criblage du plasmide N118A par la mutation silencieuse KpnI

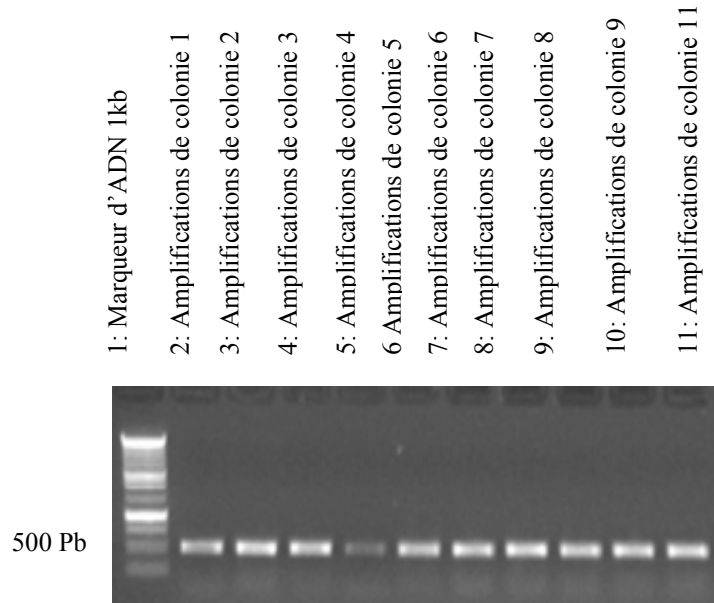


Figure 3.6. Gel d'agarose TBE 1%

Amplification du gène de la streptavidine / T114G à l'échelle de la colonie (de 1 à 10).

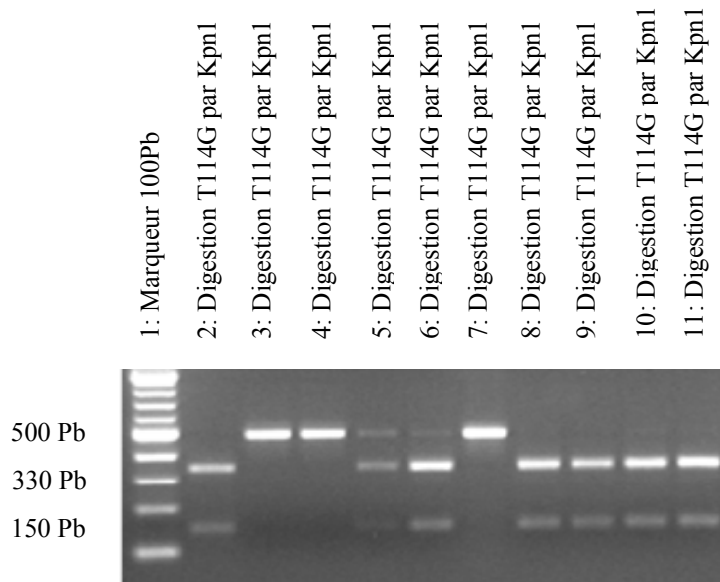


Figure 3.7. Gel d'agarose TBE 1 %

Criblage par Kpn I des dix colonies T114G (de 1 à 10)

Généralement, le remplacement d'un acide aminé par une glycine^{144, 145} dans la séquence d'une protéine se traduit par une flexibilité accrue de la structure au site de la mutation. La mutation T114G vient s'ajouter à la glycine précédente G113, créant ainsi une zone avec des degrés de liberté plus importants pour les angles Φ et ψ des liaisons peptidiques¹⁴⁶. La flexibilité accrue de la boucle 7-8 à cette position permet une plus grande facilité d'accès du substrat au métal. La mutation T114G donne de bons résultats comparée à la streptavidine type sauvage avec des conversions similaires et une sélectivité accrue avec deux substrats testés $[\eta^6-(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-p-L})\text{Cl}]$ et $[\eta^6-(\text{benzène})\text{Ru}(\text{Biot-p-L})\text{Cl}]$, excepté pour un des substrats testés : 2-acétylpyridine¹⁴⁰. C'est la mutation qui a donné la meilleure sélectivité *S* pour l'ensemble des mutants développés¹⁴⁰.

L'alanine scan¹⁴⁷ (T115A, E116A, N118A) a été dessiné localement pour la boucle 7-8 de la streptavidine et vise à déterminer si l'élimination d'un acide aminé à caractère polaire (T115, N118) ou acide (E116), par l'alanine, se répercute sur l'énantiosélectivité de la métalloenzyme artificielle. Globalement cette action diminue l'énantioselectivité par rapport au type sauvage pour les mutations T115A et E116A (les deux sont moins bénéfiques que la mutation T114G), sauf pour un des substrats testé (*p*-Méthylacetophenone)¹⁴⁰.

3.2.2. Optimisation génétique par mutagenèse associée à la structure cristallographique

En se basant sur des renseignements cristallographiques, concernant la proximité des acides aminés par rapport au Ruthénium (Ru) catalytique, j'ai conçu des expériences de mutagenèse de saturation sur deux acides aminés : K121X et L124X (X=19 acides aminés) afin d'explorer la séquence protéique complète à ces positions crytiques par sa proximité.

Tous les plasmides ont été obtenus et analysés en même temps que les mutants présentés dans § 3.2.3.

3.2.3. Optimisation génétique par «Designed Evolution»¹⁴⁸, associée au «docking» et à la structure cristallographique

Ayant identifié des mutants supérieurs en terme de sélectivité à la protéine de type sauvage au cours du premier tour d'optimisation génétique (S112X), j'ai continué l'optimisation avec une «Designed Evolution» qui combine les meilleurs mutants S112X (S112A pour sa tendance à privilégier l'énantiomère (*R*) et S112K pour son énantiodiscrimination (*S*)) avec les résidus proches du métal catalytique Ruthénium (Ru) de la structure cristallographique (K121X et L124X). Les quatre double saturations sont: S112AK121X, S112KL124X, S112KK121X, S112KL124X (X=19 acides aminés). Le principe de cette optimisation est résumé par le triangle de la figure 3.8.

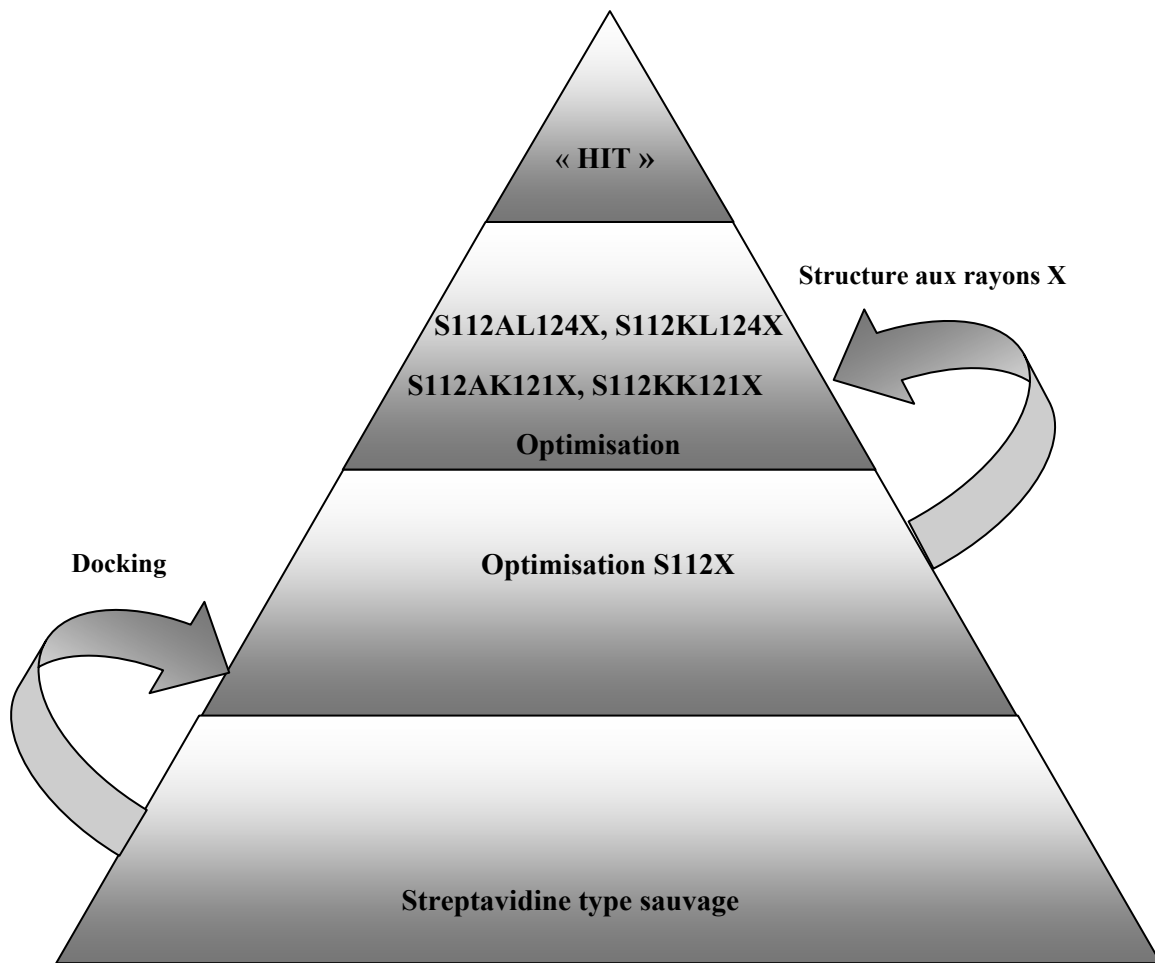


Figure 3.8. Principe de « Designed Evolution »

Ces mutants ont été obtenus par des amplifications mutagènes avec les amorces K121X et L124X sur les plasmides S112A et S112K. 76 amplifications (4 combinaisons x 19 acides aminés) ont été ainsi obtenues. Les doubles mutants ainsi que les mutants uniques (K121X et L124X) ont été amplifiés avec succès et présentent le même profil que celui présenté dans la Figure 3.8. Tous ces produits d'amplification, sans exception, migrent à la bonne taille (6000 Pb) correspondant à la taille du plasmide. Nous avons donc obtenu tous les plasmides mais par souci d'économie de place nous n'avons présenté qu'une dizaine d'amplification (Fig. 3.9

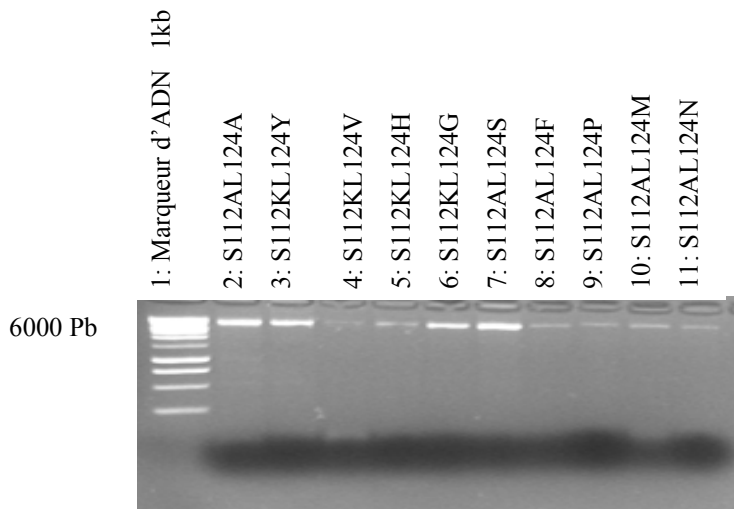


Figure 3.9. Gel d'agarose 0.7 % TBE. Amplifications « Designed Evolution »

Le criblage des plasmides mutants s'avère nécessaire pour plusieurs raisons. La première porte sur la fiabilité du kit commercial, utilisé comme outil d'obtention des mutations. D'après la note technique, l'insertion des mutations est observée dans 80% des amplifications¹⁴⁹. La deuxième raison d'effectuer un criblage est la fragilité des plasmides pET11b. Par ailleurs, le criblage a pour objectif de déterminer si la mutation silencieuse est présente ou non sur le plasmide muté. Sa présence suggère que la mutation d'intérêt (la substitution d'un acide aminé par un autre) existe aussi car les deux mutations sont apportées par la même paire d'amorces. Les positifs parmi les plasmides criblés sont séquencés.

L'expérience de mutagenèse de saturation a été conçue dans l'esprit d'obtenir d'une grande diversité de mutants. L'analyse de ces mutants issus de 114 plasmides, ainsi que leur séquençage, représenterait une réelle demande de temps, c'est pourquoi nous avons opté pour une analyse de seulement 14 d'entre eux, choisis d'une manière aléatoire. Ils ont été soumis à une digestion enzymatique par la mutation silencieuse ScaI.

Les résultats de ces digestions se trouvent dans la figure 3.13. Il apparaît que cinq plasmides sont insensibles à l'activité enzymatique de ScaI (pl. S112K124F, pl. S112K124Y, pl. L124H et pl. 112KL124G, pl. L124A). Les autres plasmides, énumérés dans la légende de la figure 3.10, sont sensibles à l'action de ScaI. Comme les amorces L124Y, L124G et L124A ne portent pas dans leur structure une mutation silencieuse, les deux plasmides négatifs sont le L124H et le S112KL124F.

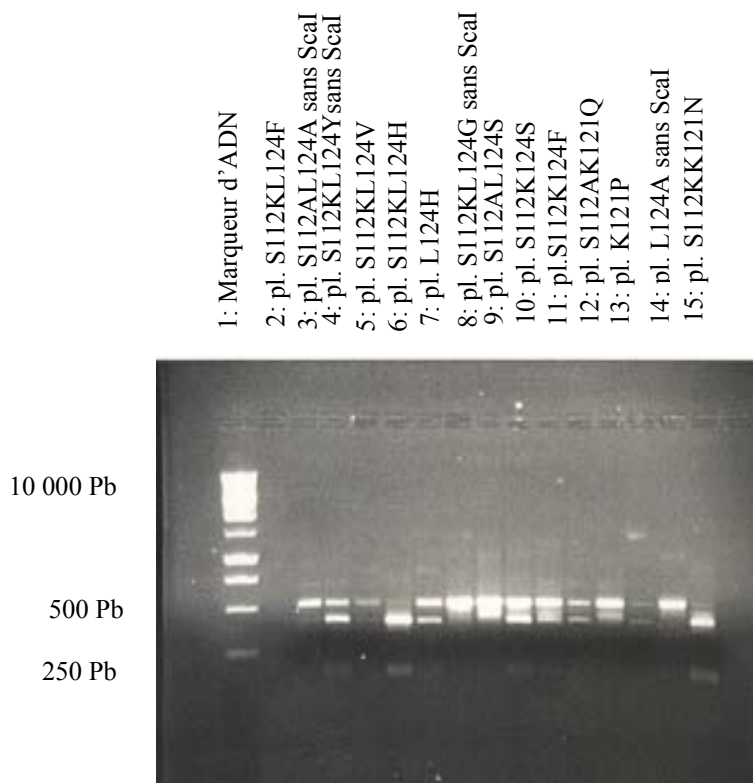


Figure 3.10. Gel d'agarose 1 %TBE. Criblage par ScaI des amplifications mutagènes

Afin de connaître la séquence précise des plasmides de saturation K121X, L124X, S112AK121X, S112KK121X, S112AL124X, S112KL124X nous avons opté pour un séquençage représentatif de 14 d'entre eux aléatoirement choisi. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.1. et démontrent 11 plasmides positifs, un plasmide portant une autre mutation (probablement due à une faute lors de la manipulation), ainsi que deux séquences qui sont non-concluantes présentant des pics indéfinis (nnn) aux niveaux des

positions d'intérêt. L'analyse des séquences représentées sur le tableau 3.1 a été effectuée par des alignements entre le gène de la streptavidine type sauvage et la séquence nucléotidique du chromatogramme. A titre d'exemple l'alignement du mutant S112KK121Q avec le gène de la streptavidine sauvage est présenté dans la figure 3.11.

Plasmides séquencés	Plasmide dessiné	Matrice (S112A, S112K ou wt)	Mutation silencieuse ScaI	Mutation d'intérêt K121X ou L124X
1	S112AK121G	S112A (+)	+	+
2	S112AK121F	S112K (+)	+	+
3	S112A121N	S112A (+)	+	+
4	S112A121T	S112A (+)	nnn*	nnn*
5	L124V	wt	+	+
6	S112K124H	-	+	- **
7	S112K121C	+	+	nnn*
8	S112A124T	S112A (+)	+	+
9	S112K 124C	S112K (+)	+	+
10	S112K121Q	S112K (+)	+	+
11	S112A121L	S112A (+)	+	+
12	K121L	wt	+	+
13	S112K121Y	S112K (+)	+	+
14	S112A121A	S112A (+)	+	+

Remarque:

* la séquence ne présente pas des pics clairs au niveau de la mutation silencieuse ou au niveau du codon muté.
** la séquence correspond au plasmide K121A

Tableau 3.1. Résultats du séquençage de 14 plasmides représentant les plasmides (K121X, L124X, S112AK121X, S112KK121X, S112AL124X, S112KL124X)

CCGGCACCTGGTACAACCAGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGACCGCGGGCGCCGACGGCG
 |||
 CCGGCACCTGGTACAACCAGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGACCGCGGGCGCCGACGGCG

CCCTGACCGGAACCTACGAGTCGGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGCTACGTCCTGACCG
 |||
 CCCTGACCGGAACCTACGAGTCGGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGCTACGTCCTGACCG

GTCGTTACGACAGCGCCCCGGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGGACGGTGG
 |||
 GTCGTTACGACAGCGCCCCGGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGGACGGTGG

CCTGGAAGAATAACTACCGCAACGCCCACTCCGCGACCACGTGGAGCGGCCAGTACGTCG
 |||
 CCTGGAAGAATAACTACCGCAACGCCCACTCCGCGACCACGTGGAGCGGCCAGTACGTCG

112K KpnI

GCGGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAGTGGCTGCTGACCAAGGGTACCACCGAGGCCA
 |||
 GCGGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAGTGGCTGCTGACCTCCGGCACCACCGAGGCCA

121Q Scal

ACGCCTGGCAGAGTACTCTGGTCGGCCACGACACCTTCACCAAGGTGAAGCCGTCCGCCG
 |||
 ACGCCTGGAAGTCCACGCTGGTCGGCCACGACACCTTCACCAAGGTGAAGCCGTCCGCCG

CCTCCATCGACGCGGCGAAGAAGGCCGGCGTCAACAACGGCAACCCGCTCGACGCCGTTTC
 |||
 CCTCCATCGACGCGGCGAAGAAGGCCGGCGTCAACAACGGCAACCCGCTCGACGCCGTTTC

AGCAGTAG
 |||
 AGCAGTAG

Figure 3.11. Alignement entre le gène de la streptavidine type sauvage (brin inférieur) et la séquence du plasmide S112KK121Q (brin supérieur)

Les mutations sont soulignées et en gras, les sites de restriction des mutations silencieuses sont en bleu. Les bases complémentaires sont indiquées par (|), les bases non-complémentaires sont indiquées par (:).

3.3.« Redesign » du gène de la streptavidine

La proximité de la boucle 7-8 du métal catalytique a permis de rationaliser une mutagenèse permettant d'éprouver individuellement les différents résidus d'acide aminés: T114G, T115A, E116A, N118A. Pourtant, les mutations des résidus isolés présentent des limitations au regard du potentiel d'évolution protéique quasiment infinie. Il a été publié¹⁵⁰ que des séquences d'acides aminés bien définies exercent conjointement un effet sur la sélectivité. Il serait donc utile de disposer des moyens de muter des acides aminés contigus, voire même de randomiser des boucles entières par des séquences dégénérées. La substitution de chaque boucle par des codons aléatoire (nnn) et sa réinsertion dans le gène déterminerait globalement le rôle de la séquence randomisée.

Un « redesign » est donc nécessaire pour pouvoir séparer les boucles les unes des autres. Ce travail a été déjà théoriquement effectué par le Dr. Nicolas Humbert qui a déterminé les sites de restriction à incorporer dans la séquence du gène « redesigné »¹³⁰.

Suite au « redesign », les régions qui codent les sept boucles de la streptavidine sont séparées l'une de l'autre par des sites de restrictions (Fig. 3.12). Cinq des sites sont naturellement présents et les trois autres sont obtenus par des mutations silencieuses générant les séquences des sites de restriction. L'alignement entre le gène de la streptavidine et le gène de la streptavidine « redesignée » est présenté (Fig.3.13).

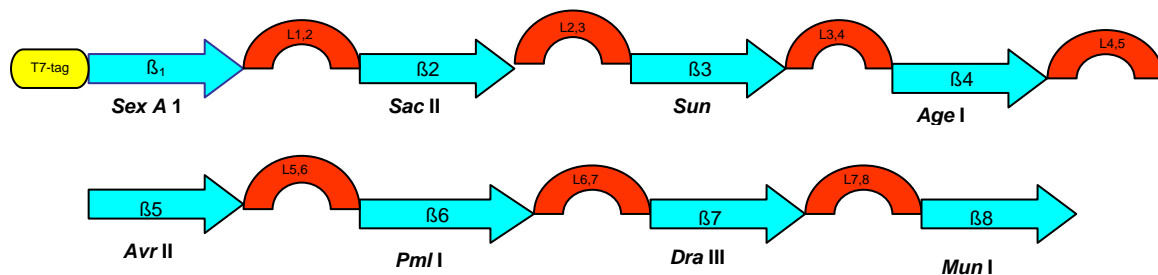


Figure 3.12. Carte de restriction de gène de la streptavidine « redesigné »

Après l'identification des sites de restriction naturellement présents, je me suis concentrée sur le « design » et l'obtention des trois sites artificiellement apportés. L'insertion des trois mutations a été effectuée en partant du gène de la streptavidine sauvage sur lequel une première PCR avec les amorces apportant la mutation, générant le site de restriction AvrII, a été menée. Ce plasmide a servi de base pour l'apport de la deuxième mutation SunI. Le plasmide doublement muté (AvrII, SunI) a été utilisé comme matrice pour la troisième mutation MunI.

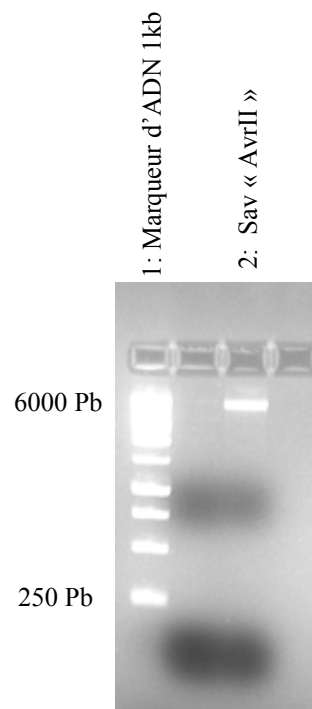


Figure 3.14. Gel d'agarose TBE 1%

PCR mutagène apportant le site de restriction Avr II

Le plasmide portant la mutation AvrII, amplifié par la PCR mutagène (Fig.3.14), a été utilisé pour la transformation de X1-blue. Après le développement des transformants, une PCR sur colonies amplifiant le gène de la streptavidine a été réalisée et les amplifications positives sont

présentées dans la figure 3.15. La digestion par la mutation apportée (Fig. 3.16) confirme la présence du site AvrII dans le gène de la streptavidine.

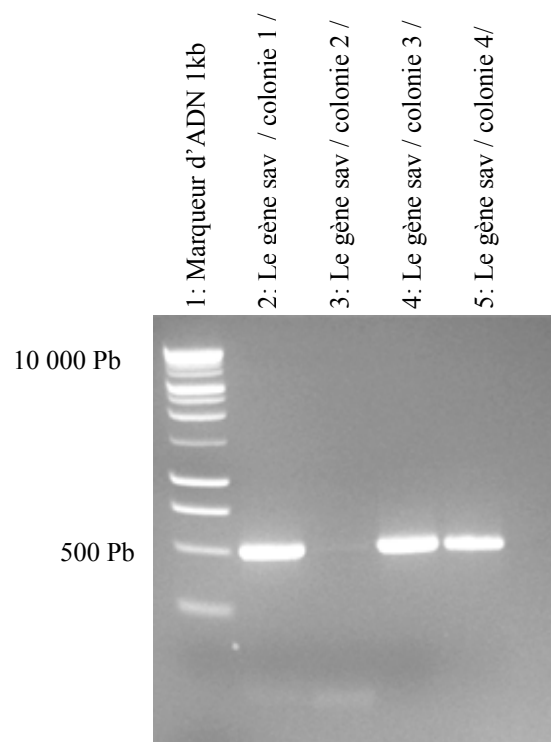


Figure 3.15. Gel TBE 1%.
Amplifications du gène de la streptavidine après PCR mutagène AvrII

Après la confirmation de la mutation apportée, cette colonie a été utilisée pour l'extraction du plasmide portant la mutation générant le site de restriction AvrII.

Le plasmide positif à la première mutation (AvrII) (Fig.3.16) a été soumis à une deuxième PCR mutagène, apportant le site de restriction (SunI). Après la confirmation de cette mutation, le plasmide doublement muté (AvrII, SunI) a servi de matrice pour l'introduction du troisième site de restriction MunI. Le plasmide résultant est transformé dans des bactéries de clonage sur lesquelles une PCR a généré le gène triplement muté. Les trois digestions par les sites de restriction ont été testées sur ce produit final et sont présentées dans la figure 3.17.

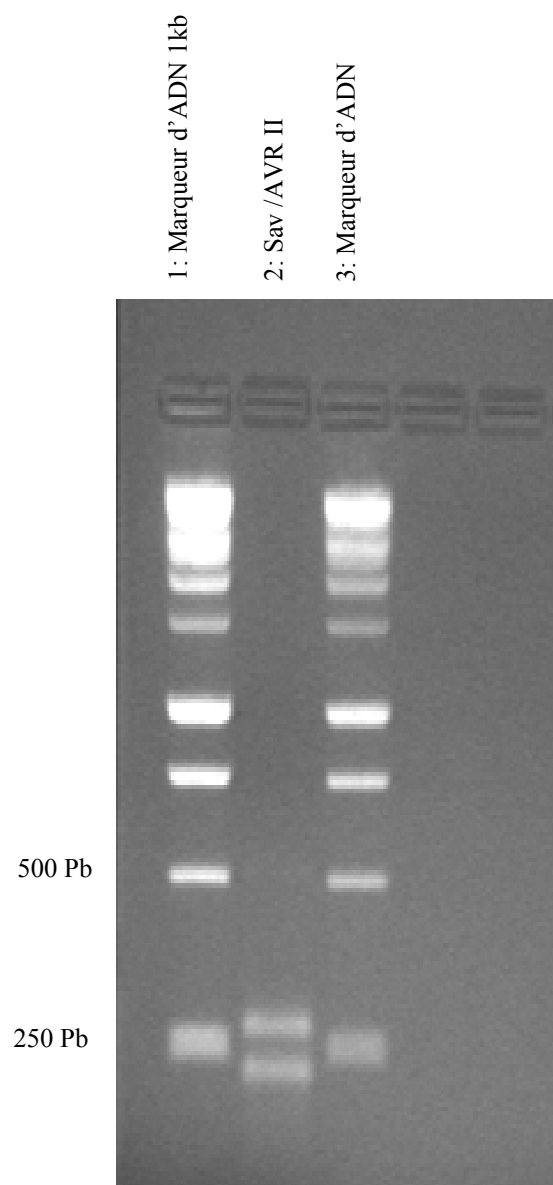


Figure 3.16. Gel d'agarose TBE 1%.
Criblage de colonie /1/ par AvrII

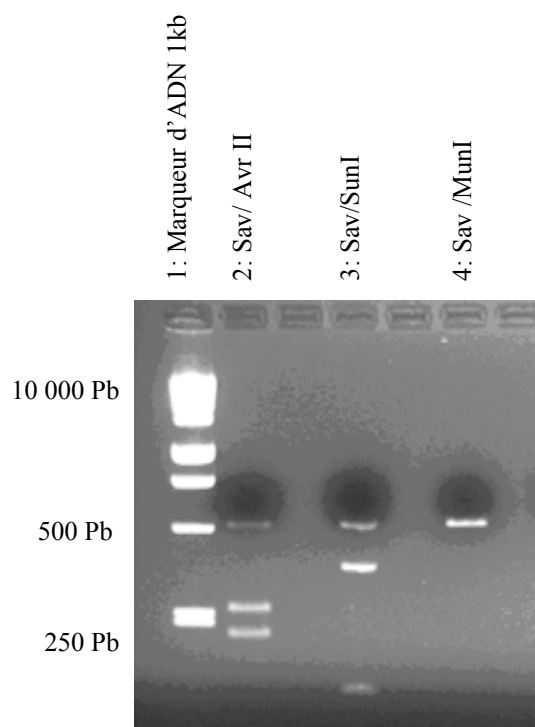


Figure 3.17. Gel d'agarose TBE 1%.
Vérification de l'insertion des mutations Avr II, SunI, MunI

L'observation du profil de restriction du gène redessiné montre la coupure des enzymes AvrII et SunI générant les bandes à la bonne taille (260 Pb et 240 Pb pour AvrII et 400 Pb et 100 Pb pour SunI). Au regard du profil de MunI, une deuxième bande n'apparaît pas sur le gène d'analyse. L'emplacement de cette séquence étant aux alentours de l'extrémité C, le deuxième fragment n'est pas détectable sur gel. Ce type de test ne permet donc pas de s'assurer de l'insertion de la troisième mutation. Le fragment à 500 Pb, présent pour les pistes 2 et 3 est attribué à l'excès d'ADN soumis à la digestion enzymatique. Le séquençage a confirmé la présence des trois mutations AvrII, SunI, MunI au sein de la streptavidine « redesignée ».

3.4. Nouvelle fonctionnalité pour les métalloenzymes artificielles

Au cours des sept premières années du projet streptavidine-biotine, le potentiel d'optimiser ces métalloenzymes artificielles pour la catalyse asymétrique a abouti à des excès énantiomériques allant jusqu'à 97%⁸⁷. Comme la streptavidine offre un environnement chiral, déterminant l'énantiosélectivité lors des réactions asymétriques, nous avons émis l'hypothèse que ce même «scaffold» peut induire des coupures spécifiques sur les acides nucléiques, ce qui lui conférerait une propriété additionnelle. Nous avons pour cela décidé de remplacer la séquence « C » de la streptavidine par une autre séquence connue pour ses propriétés de fixation d'acides nucléiques. La molécule qui en découle est une streptavidine chimérique.

3.4.1. Description de la streptavidine chimérique

Pour dessiner une enzyme de restriction artificielle (Fig 3.18), deux caractéristiques principales doivent être réunies : l'affinité pour l'ADN et la capacité d'hydrolyser des liaisons phosphodiester (5'-3').

Afin d'apporter l'agent actif hydrolysant le squelette nucléotidique, il est prévu que la Doctoresse Julietta Gradinaru couple la biotine au Cérium (Ce) connu pour son activité hydrolysante d'ADN. On ne sait pas si la streptavidine possède ou non une capacité naturelle de lier les acides nucléiques, le substrat d'intérêt. Pour essayer d'introduire cette affinité les 20 acides aminés de son extrémité « C » ont été substitués par les 20 acides aminés du facteur de transcription de *Drosophila sp.* « engrailed homeodomain » connu pour sa capacité à se fixer sur la molécule ADN¹⁵¹.

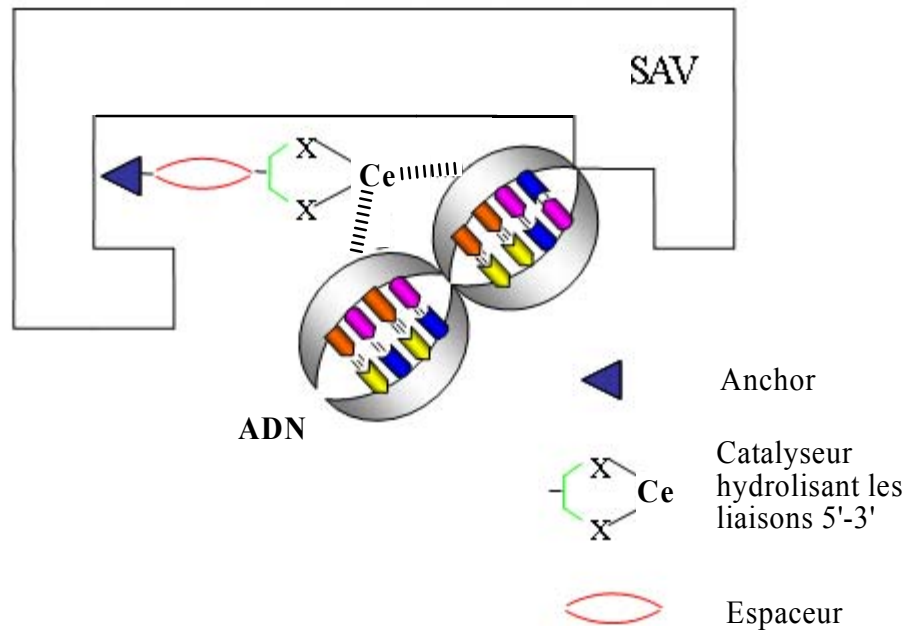


Figure 3.18. Principe d'une enzyme de restriction artificielle, basée sur la technologie streptavidine- biotine

3.4.2. Obtention du gène de la streptavidine chimérique

La séquence « engrailed DNA-binding motif »¹⁵¹ comprend 30 acides aminés dont 20 ont été utilisé pour remplacer la séquence de la partie « C » de la streptavidine (de position S139 à position Q159). Les amorces dessinées sont constituées de $\frac{1}{2}$ de la séquence du troisième motif HTH de « engrailed » et $\frac{1}{2}$ de la séquence complémentaire du plasmide Sav-pet 11b. L'amorce supérieure s'hybride au gène de la streptavidine avant la position 139, et se prolonge avec 30 nucléotides codant 10 acides aminés de l'hélice du troisième motif HTH. L'amorce inférieure s'apparie à une séquence du vecteur Sav-pET11b après la séquence du gène de la streptavidine suivant le codon stop et se prolonge avec $\frac{1}{2}$ de la séquence du troisième motif HTH (30 nucléotides codant pour 10 acides aminés). L'amorce supérieure et

l'amorce inférieure sont phosphorylées à leurs extrémités 5'. Le principe de cette PCR est schématisé dans la figure 3.20

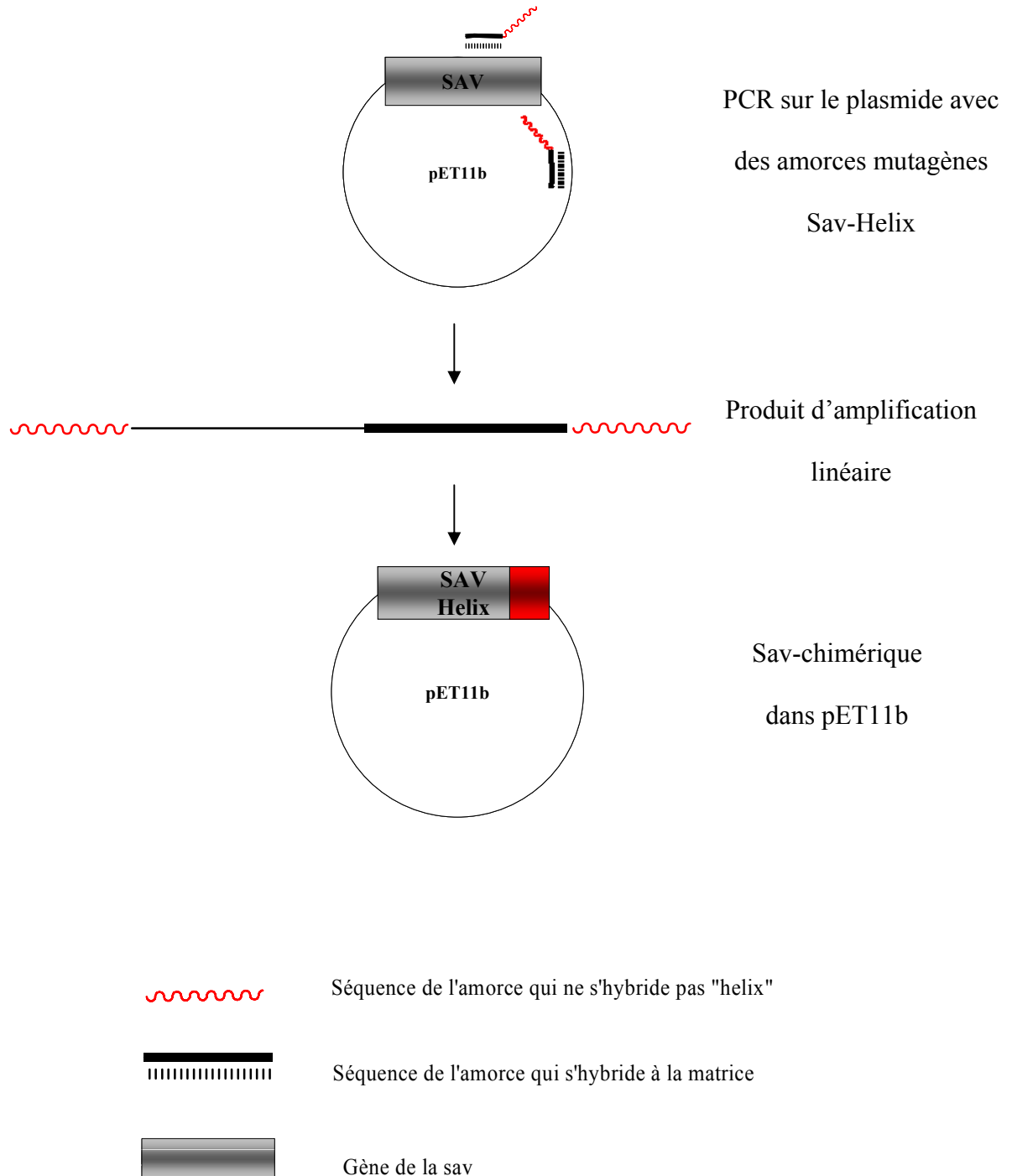


Figure 3.19. Principe de la PCR en vue de l'insertion de la séquence chimérique dans le gène de la streptavidine

Le produit d'amplification PCR, est une séquence linéaire qui, après ligation, génère un plasmide circulaire contenant la séquence génétique de l'hélice du troisième motif HTH (Fig. 3.21).

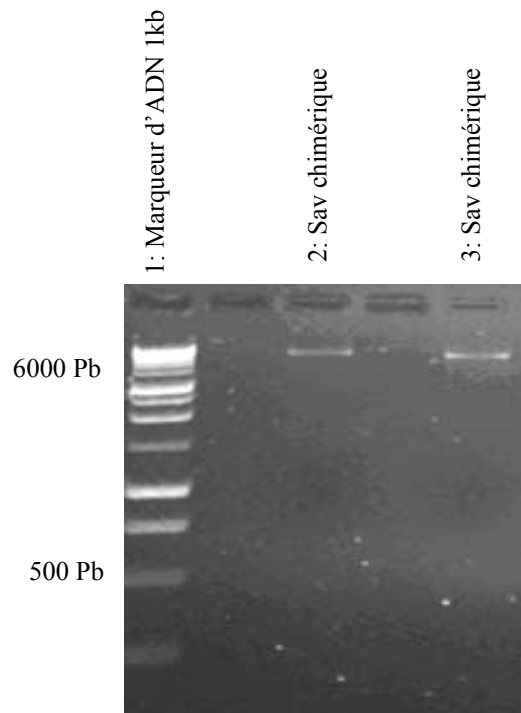


Figure 3.20 .Gel d'agarose 1 % TAE. Amplification de la streptavidine chimérique

Le produit PCR linéaire (Fig. 3.21), après purification, a été soumis à une ligation en vue de sa circularisation. Le séquençage a confirmé la présence des 20 acides aminés de substitution dans son extrémité « C ».

3.5. Expression et purification de la diversité protéique obtenue à grande échelle

La diversité protéique nécessaire pour assurer de bons niveaux d'énantiodiscrimination implique un mode d'expression efficace pour les protéines. Deux systèmes de production de la streptavidine sont exploités dans le groupe : l'expression dans un fermenteur de 10 l et l'expression en erlenmeyers (à petite échelle de 50 ml).

3.5.1. Expression à grande échelle

3.5.1.1. Expression en milieu riche

Pendant la première période du projet, un système d'expression de la streptavidine mutante en fermenteur de 10 l a été mis au point par le Dr. Nicolas Humbert¹³⁰. Après une optimisation des paramètres d'expression (composition nutritionnelle de milieu, aération, optimisation des étapes précédant et suivant la purification par affinité), les rendements obtenus atteignent jusqu'à 2 g pour un volume de fermentation de 10 l. Comme nous postulons que l'optimisation chimique apporte plus de diversité sur les métalloenzymes artificielles que l'optimisation génétique, ce système d'expression, permettant des rendements élevés est exploité. Il permet de cribler plusieurs complexes organométalliques. Toutes les protéines S112X ont été obtenues dans une fermentation de ce type, après propagation du plasmide dans les bactéries *E. coli* XL1-blue, suivi d'une expression dans les bactéries *E. coli* BL21 (DE3) pLys. Les mutations flexibilisant la boucle 7-8 : T114A, T115A, E116A, N118A et la streptavidine chimérique ont été également produites par ce mode d'expression.

3.5.1.2. Expression en milieu minimal

Afin de pouvoir nous baser sur la structure de la streptavidine avec un ligand biotinylé, nous avons collaboré avec le Dr. D.Haeussinger du « Biozentrum » à Bâle pour la détermination de la structure par RMN 800 MHz. Malgré son poids moléculaire élevé (64 000 g/mol pour le tétramère), les études en cours suggèrent que la structure de la streptavidine est accessible par RMN.

La protéine de type sauvage a été soumise à deux fermentations différentes en milieu minimal pour son marquage isotopique, dans un volume total de 1 l (type sauvage aux ²H, ¹⁵N) et de

0.6 l (type sauvage aux ^2H , ^{15}N , ^{13}C). Le profil de la croissance est présenté dans la figure 3.22.

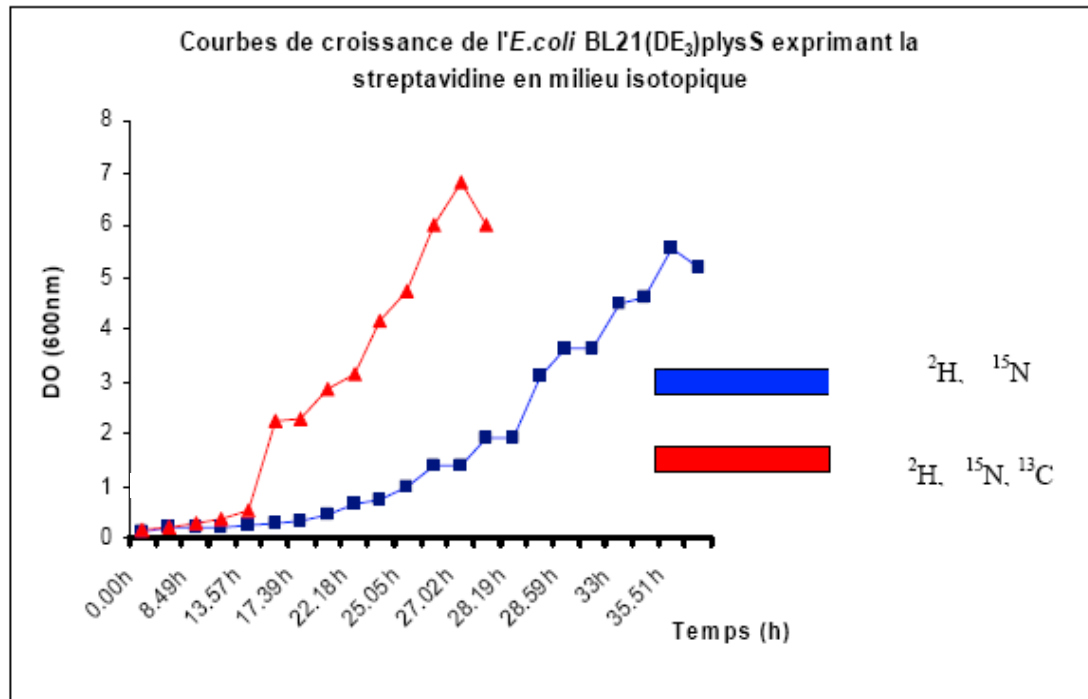


Figure 3.21. Profil de croissance d'*E.coli* exprimant la streptavidine type sauvage en milieu isotopique

La fermentation en milieu minimal isotopiquement marqué, présente plusieurs différences par rapport à la fermentation à haute densité cellulaire en milieu riche, à savoir : un temps total cinq fois plus long, un pourcentage de glucose (source unique de Carbone (C) en milieu minimal) plus élevé, un taux d'Oxygène (O_2) et d'air suivi.

Nous avons utilisé des conditions différentes pour les deux fermentations isotopiques : la fermentation (^2H , ^{15}N) est menée dans un volume d'un litre avec une forte concentration de glucose (2.1% concentration finale), alors que la deuxième fermentation (^2H , ^{15}N , ^{13}C) est menée dans un volume total de 0,6 l avec une concentration de glucose finale égale à 1 %, afin de réduire le cout de glucose isotopiquement marqué. Les niveaux de production de ces deux types de marquage sont différents des rendements issus de productions en milieu riche. La streptavidine (^2H , ^{15}N) est obtenue avec un rendement de production de 306 mg/l, soit

environ 50 % de plus que les meilleurs niveaux obtenus en milieu riche. La même protéine marquée aux ^2H , ^{15}N , ^{13}C est obtenue avec 80 mg pour les 0.6 l de fermentation, valeur similaire aux rendements moyens des protéines exprimées en milieu riche. Un facteur majeur semble être à la base de ces différences : la concentration finale de glucose (2.1 %). En fait, le glucose influence positivement le système de régulation (inhibition totale de l'expression basale lors de la phase préinductive) et sert de source de Carbone (C) pour la synthèse protéique. Il reste à démontrer si ce seul paramètre permettrait d'augmenter systématiquement les rendements des expressions en fermenteur.

3.5.2. Purification de la streptavidine recombinante, issue d'une expression à grande échelle.

Toutes les protéines produites à grande échelle, dans un fermenteur de 10 l ou dans un fermenteur de 2 l (pour le marquage aux isotopes) ont été purifiées par dénaturation-renaturation, suivies par une chromatographie sur une colonne d'affinité (2-imminobiotine). Les solutions éluées sont soumises à des dialyses contre l'eau distillée et l'eau bidistillée pour l'élimination des sels et finalement lyophilisées. Ce système de purification a permis la purification de toutes les protéines exprimées sous forme solubles, donc prêtes à l'utilisation. Les étapes de purifications ainsi que les solutions associées sont détaillées dans §.2.7.1.

3.5.3. Analyse des protéines issues d'une expression à grande échelle

3.5.3.1. Gel SDS-PAGE

Ce type d'analyse procure des renseignements sur l'état de la protéine (soluble ou insoluble) ainsi que sur le niveau approximatif d'expression. L'analyse par SDS-PAGE (conditions-dénaturantes) de quelques expressions choisies est présentée sur les photos des figures 3.23,

3.24, 3.25. Elles permettent de voir la différence entre diverses protéines recombinantes : type sauvage en milieu minimal isotopique (Fig. 3.23), streptavidine T114G en milieu riche (Fig 3.24), N118A, exemple de protéine produite exclusivement sous forme de corps d'exclusion (Fig. 3.25).

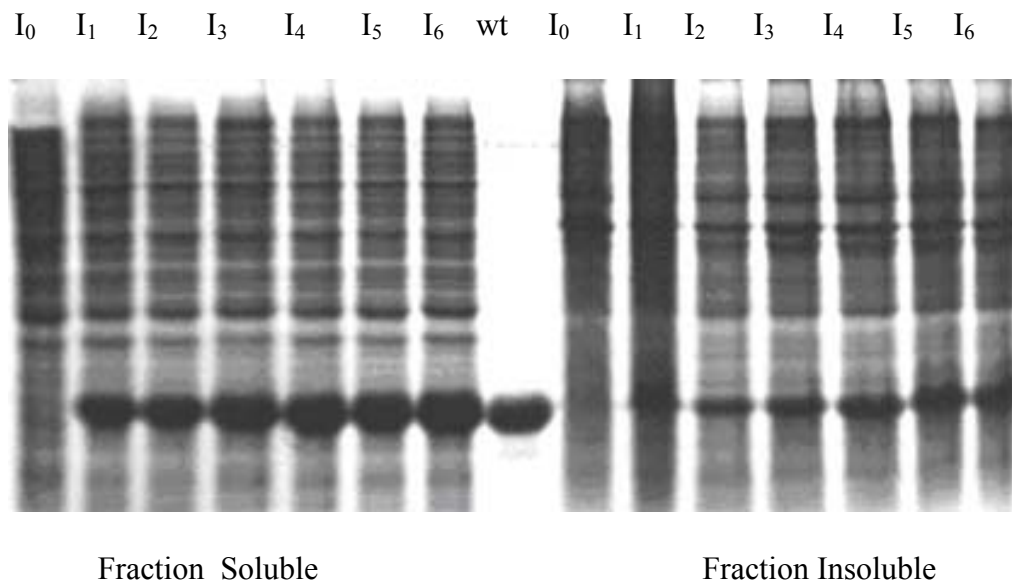


Figure 3.22. Gel SDS-PAGE de l'expression de la streptavidine ²H, ¹⁵N

I₀-I₆ : Temps comptabilisé de 0h à 6h de la phase post-inductive

I₀ : moment de l'induction, I₁ : une heure après l'induction,

I₂ : deux heures après l'induction, I₃ : trois heures après l'induction

I₄ : quatre heures après l'induction, I₅ : cinq heures après l'induction

I₆ : six heures après l'induction, Wt : témoin positif (sav lyophilisée)

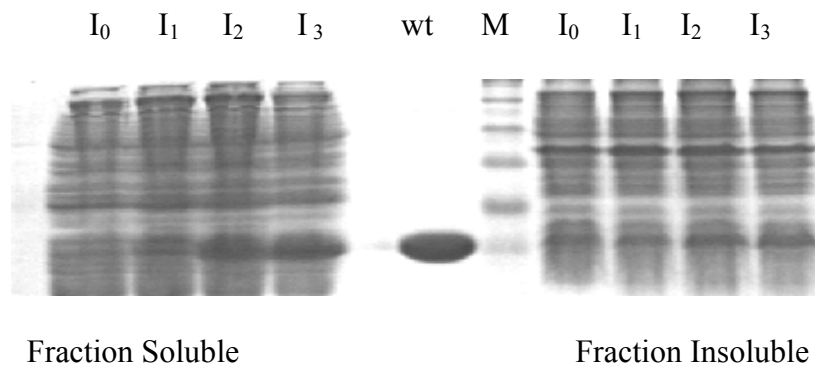


Figure 3.23. Gel SDS-PAGE de l'expression de T114G

M : Marqueur de protéines « Promega »

I₀ -I₃ : Temps comptabilisé de 0h à 3h de la phase post-inductive de la fermentation.

I₀ : moment de l'induction, I₁ : une heure après l'induction,

I₂ : deux heures après l'induction, I₃ : trois heures après l'induction

Wt : témoin positif (sav lyophilisée)

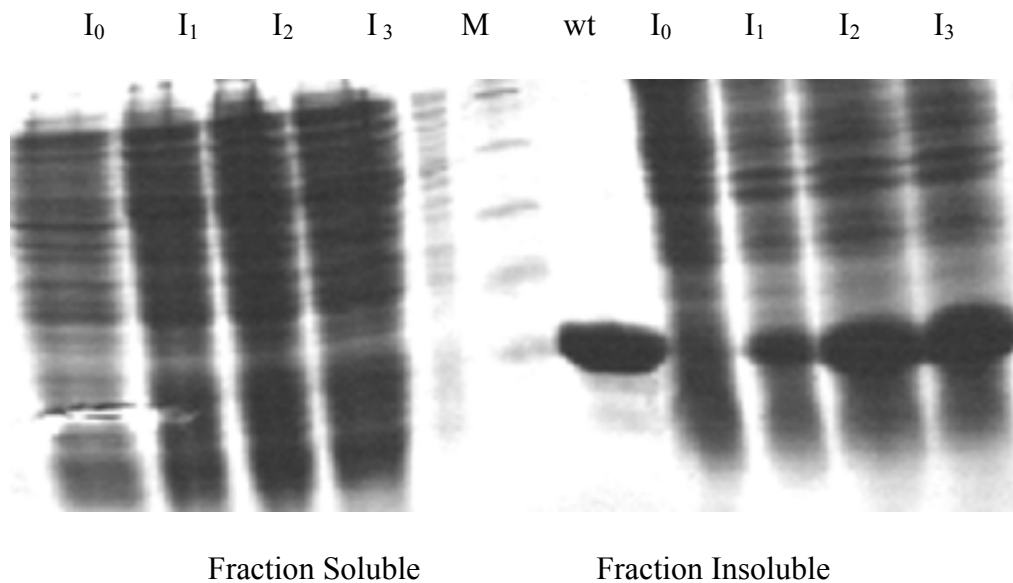


Figure 3.24. Gel SDS-PAGE de l'expression N118A

M : Marqueur de protéines « Promega »

I₀ -I₃: Temps comptabilisé de 0h à 3h de la phase post-inductive de la fermentation.

I₀: moment de l'induction, I₁: une heure après l'induction,

I₂: deux heures après l'induction, I₃: trois heures après l'induction

Wt : témoin positif (sav lyophilisée)

3.5.3.2. Gel SDS-B₄F

Une technique d'analyse non dénaturante alternative à la SDS-PAGE non-dénaturant a été mise au point dans notre groupe pour tester la fonctionnalité (capacité de fixer la biotine) des mutants obtenus¹³¹. Le complexe streptavidine-B₄F migre en tant que tétramère et présente une bande fluorescente sous exposition UV. Les mutants nonactifs ne fixent pas la B₄F et la fluorescence apparaît sous forme libre au bas de gel, ce qui confère à cette méthode la capacité de différencier les protéines fonctionnelles des nonfonctionnelles. Une comparaison entre un gel SDS-B₄F (Fig.3.29A) et SDS-PAGE (Fig.3.29B) est présentée dans la figure 3.26.

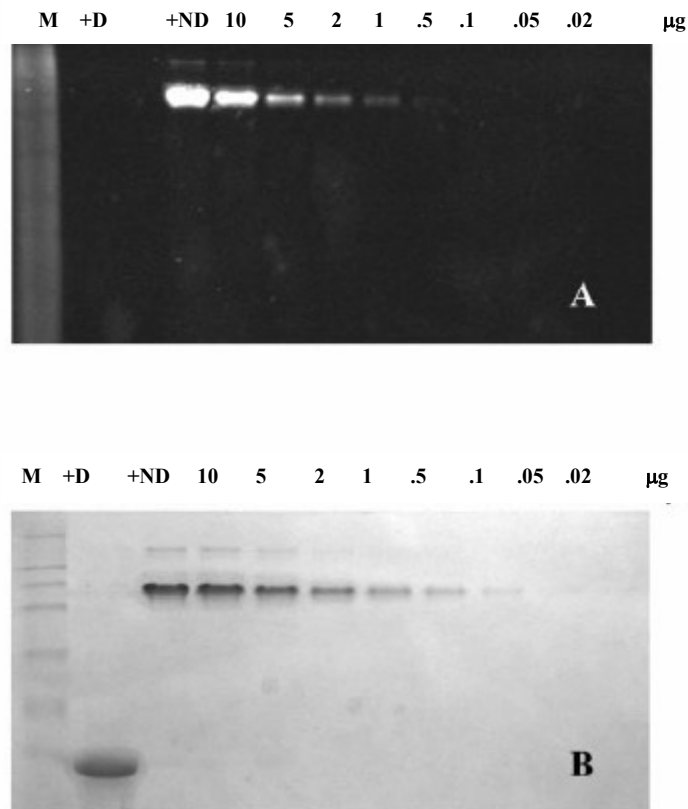


Figure 3.25. Comparaison des gels SDS-B₄F (A) et SDS-PAGE (B)

+D=conditions dénaturantes, ND=conditions non-dénaturantes

3.5.4. Le cas des mutants exprimés exclusivement sous forme de corps d'inclusions¹⁵².

Au cours des expressions, nous avons obtenu certains mutants à 100 % dans la fraction insoluble des cellules. Malgré une première expérience de resolubilisation après expression (par dilution en chlorure de guanidine à pH=1.5)¹⁵³, aucun de ces mutants n'a pas présenté un pic d'élution lors de son passage sur la colonne d'affinité (2-iminobiotine).

Il est établi que l'ajout du cofacteur (pour la streptavidine c'est la biotine) dans le milieu de la fermentation peut faciliter le repliement correct de la protéine au cours de cette expression d'où le passage de ces protéines de l'état d'aggrégats encapsulés dans la fraction soluble cytoplasmique¹⁵⁴.

Le deuxième facteur, connu pour prévenir la formation des corps d'inclusions, est l'abaissement de la température lors de l'expression, ralentissant les processus de synthèse et le repliement des protéines recombinantes, ces derniers adoptant leur conformation native.

La streptavidine N118A (100% dans les corps d'inclusion, voir figure 3.25) et la streptavidine-helix (80 % dans la fraction insoluble, gel non-montré) sous ont été exprimées à 37 °C avec de la biotine (6 mg/l, ajouté au moment de l'induction) et à 20 °C dans des erlenmeyers de 50 ml comme décrit dans §.2.6.2 et traitées comme décrit dans §.2.7.2. La figure 3.27 (pistes 1, 2, 3 et 4) présente leur détection dans la fraction soluble. La totalité dans chaque expression (1.5 ml) (piste 1, 2, 3, 4) a été mélangée avec 2,5 ml de billes de 2-iminobiotine dans le tampon de liaison à pH=9.8 (sa composition est donnée dans §. 2.7.1.1). Après une première centrifugation (5 min à 14 000g), les billes ont été lavées 3 fois avec le même tampon (1ml pour chaque lavage) afin d'éliminer les impuretés accrochées non spécifiquement. Finalement, 1 ml d'acide acétique 1% a été appliqué. L'éluât a été mélangé avec 0.5 ml Tris-HCl (1M). Chaque elution a été analysée sur gel SDS-B₄F et les résultats sont présentés sur la figure 3.27 (piste 1',2',3',4'). Les bandes fluorescentes obtenues suggèrent que les corps d'inclusions solubilisés « in vivo » par l'ajout de la biotine et une température d'expression basse (20 °C) peuvent être purifiées par chromatographie d'affinité 2-iminobiotine.

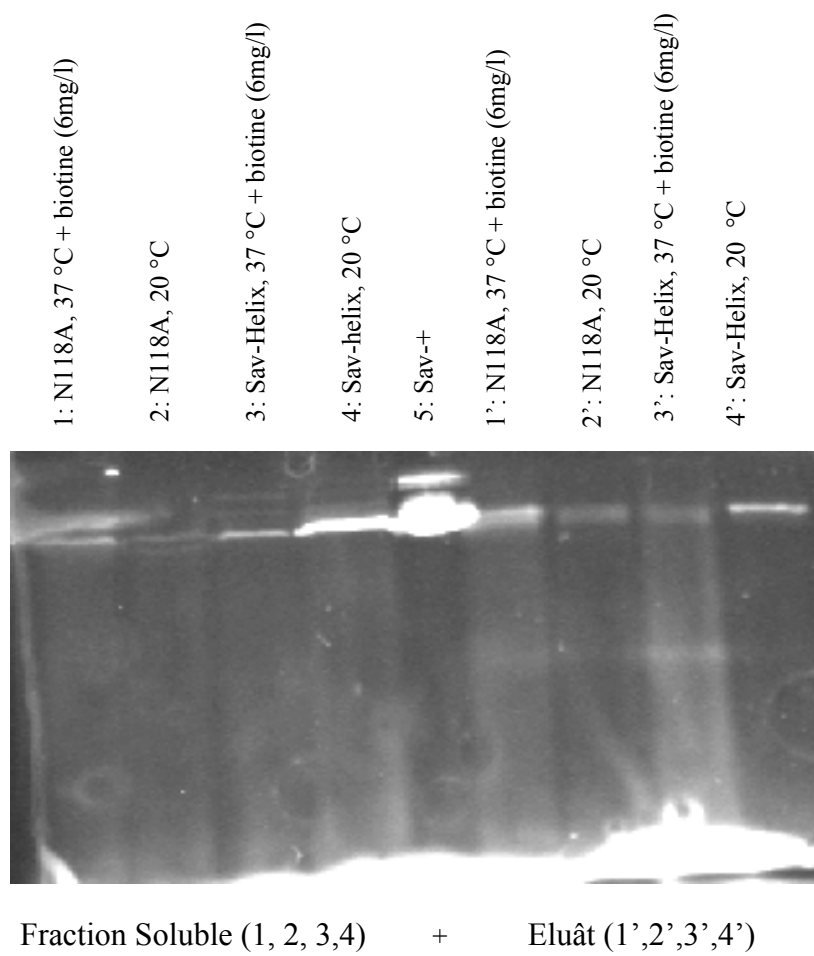


Figure 3.26. Gel SDS-B₄F. Purification des protéines solubilisées par 2-imminobiotine

3.5.5. Spectre de masse « ESI-MS » des protéines issues d'une expression à grande échelle

La streptavidine type sauvage (produite régulièrement en milieu riche, ainsi que celle marquée aux isotopes), les mutants S112X et ceux flexibilisant la boucle 7-8, ont été analysées par spectroscopie de masse (« ESI-MS ») à l'Université de Berne au sein du groupe du professeur Johann Schaller. L'analyse « ESI-MS » reflète le poids du monomère. A titre d'exemple, le spectre « ESI-MS » de la streptavidine (^2H , ^{15}N) est présenté dans la figure 3.30. Le pic majeur de 17 310 appartient au monomère de la streptavidine isotopiquement marquée.

Afin d'estimer le taux de marquage avec ^{15}N et ^2H nous avons procédé à une comparaison de la masse molaire de la streptavidine type sauvage et de celle marquée au ^2H , ^{15}N . La séquence de la streptavidine mature a été soumise au site www.scipps.edu/cgi-bin/cdputnam/protcalc3, spécialisé dans l'analyse des propriétés des protéines telles que le pI, le poids moléculaire, la détermination des formules brutes etc. Ainsi, pour la séquence de la streptavidine mature la formule brute a été déterminée : $\text{C}_{718}\text{N}_{208}\text{O}_{238}\text{S}_3\text{H}_{1106}$. Cette formule coresspond à une masse molaire égale à 16 556,00664 g/mole. Les masses de ^2H et de ^{15}N ont été obtenues du site www.cem.msu.edu/reusch/OrgPage/mass.htm (2.01410 pour ^2H et 15.0001 pour ^{15}N). La masse molaire de la streptavidine mature ($\text{C}_{718}\text{N}_{208}\text{O}_{238}\text{S}_3\text{H}_{1106}$) a été recalculée, cette fois-ci avec les masses isotopiques des isotopes lourdes. La valeur obtenue est égale à 17 875,4664 g/mole. La différence avec la masse déterminée par « ESI-MS » de la streptavidine marquée aux ^2H , ^{15}N (17 310 g/mole) (Fig.3.28) peut être attribuée à un marquage partiel aux ^2H , ^{15}N ou à un échange de ^2H par H lors de la purification. Le plasmide streptavidine type sauvage a été séquencé juste avant son utilisation en fermentation en vue du marquage (^2H , ^{15}N) ce qui élimine la possibilité des mutations sur la protéine analysée par « ESI-MS ».

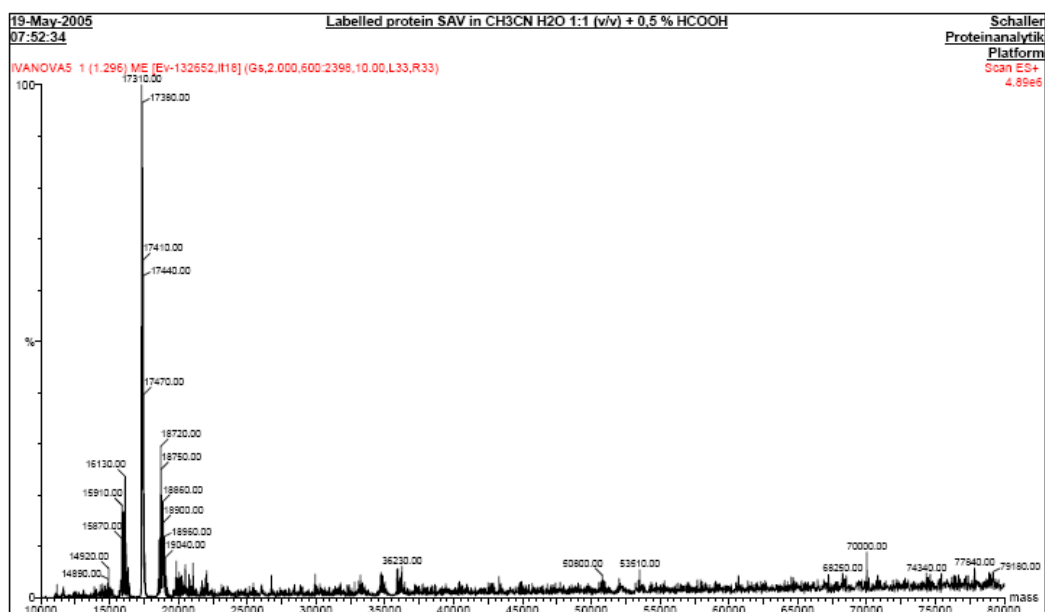


Figure 3.27. « ESI-MS » de la streptavidine type sauvage (^2H , ^{15}N).

3.5.6. Détermination de l'activité des protéines issues d'expression à grande échelle

La protéine streptavidine, produite en fermentation à grande échelle, présente une occupation partielle de ses sites actifs, due à la biotine endogène provenant du microorganisme d'expression. Bien que la purification dénaturation-renaturation vise à éliminer cette biotine, la streptavidine garde toujours des résidus de biotine.

Un exemple de titrage indirect de la streptavidine par HABA sur une production de la streptavidine type sauvage est présenté dans la figure 3.29. La même protéine a été titrée par la B_4F et l'allure de la courbe est présentée dans la figure 3.30. Les points de saturations sont indiqués par une flèche sur les deux figures mentionnées. Le calcul de ces titrages a révélé que sur les 4 sites présents au sein de la streptavidine, seuls 3,25 sont disponibles ou libres.

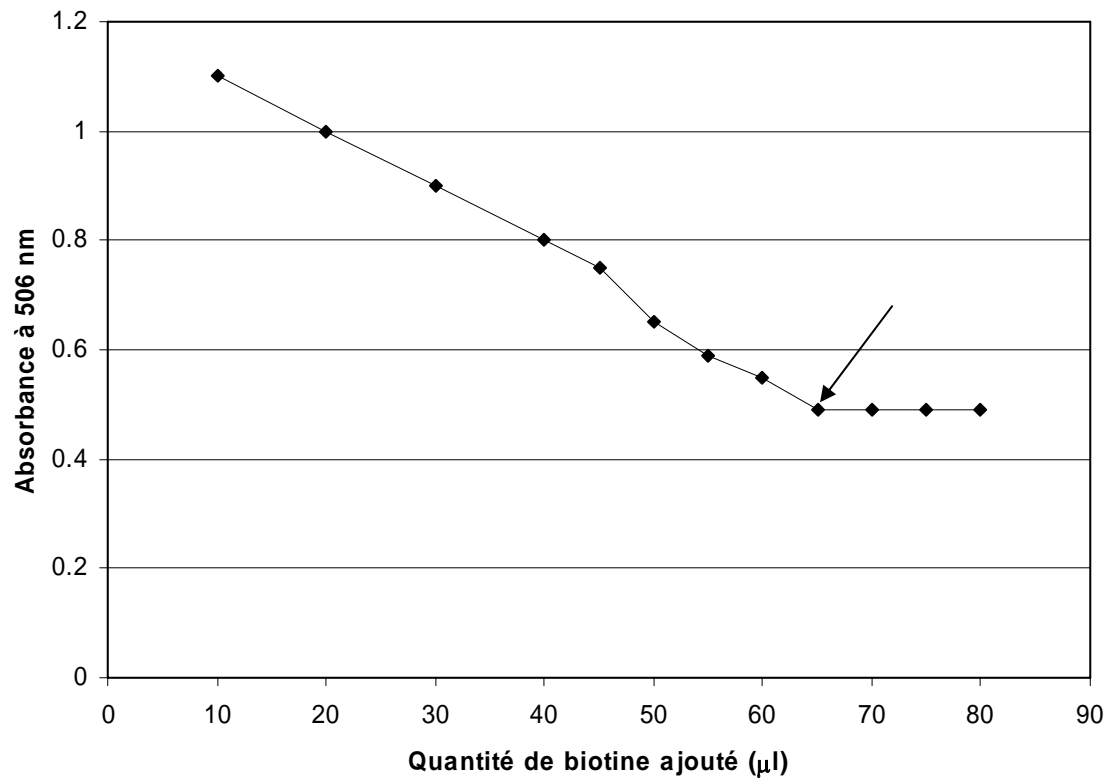


Figure 3.28. Titration indirecte de la streptavidine type sauvage par exclusion de HABA par la biotine.

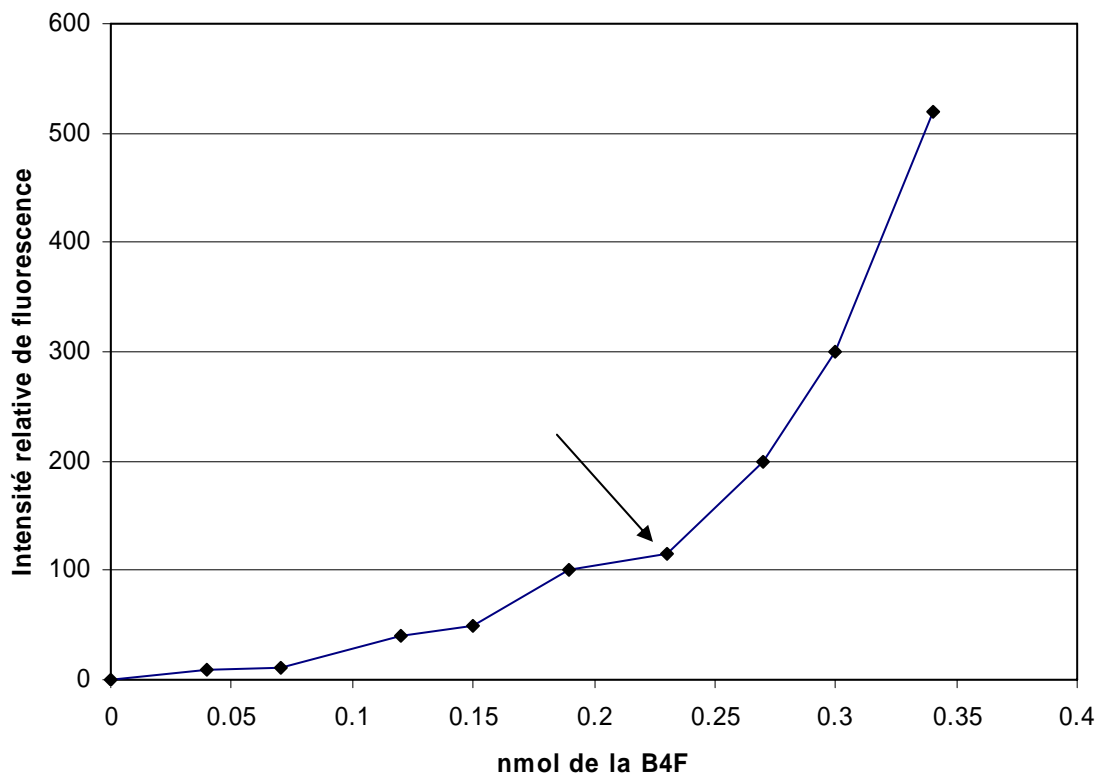


Figure 3.29. Titrage direct de la streptavidine par « quenching » de la fluorescence de la B₄F dans les sites actifs libres de la streptavidine.

Les mutants quantifiés par ces deux moyens, révèlent de 2.5 à 3.75 sites actifs libres. En fonction de la forme particulière de la cavité hydrophobe, propre à chaque mutant, des différences dans la courbe de titrages sont observables. Ces particularités pour des mutants de la streptavidine ont été étudiées par N. Humbert¹³⁰.

3.5.7. Rendement de productions à grande échelle

La figure 3.31 présente les niveaux d'expression des différentes protéines rapportés au volume d'expression. Il apparaît sur cette figure que trois groupes de protéines, exprimant des rendements similaires, peuvent être distingués. Le premier groupe, présentant les meilleurs rendements de production, est la streptavidine de type sauvage en milieu minimal isotopique (^2H , ^{15}N). La fermentation prolongée, associée aux conditions d'expression différentes influence significativement les niveaux de production pour cette protéine. Le deuxième groupe contient la streptavidine type sauvage et les mutants, T114G, S112M, S112H, S112I, S112T, S112F, S112I. Le troisième groupe comprend les protéines qui ont les niveaux de production les plus bas : S112P, S112W, S112N, S112G, S112Q, S112Y, T115A, E116A. En fait, dans ce groupe on trouve des acides aminés à caractère aromatique (S112W, S112Y) et la proline qui perturbent significativement le repliement, ainsi que les deux mutations de l'alanine scan de la boucle 7-8 (T115A, E116A). La streptavidine chimérique se caractérise par des rendements modestes.

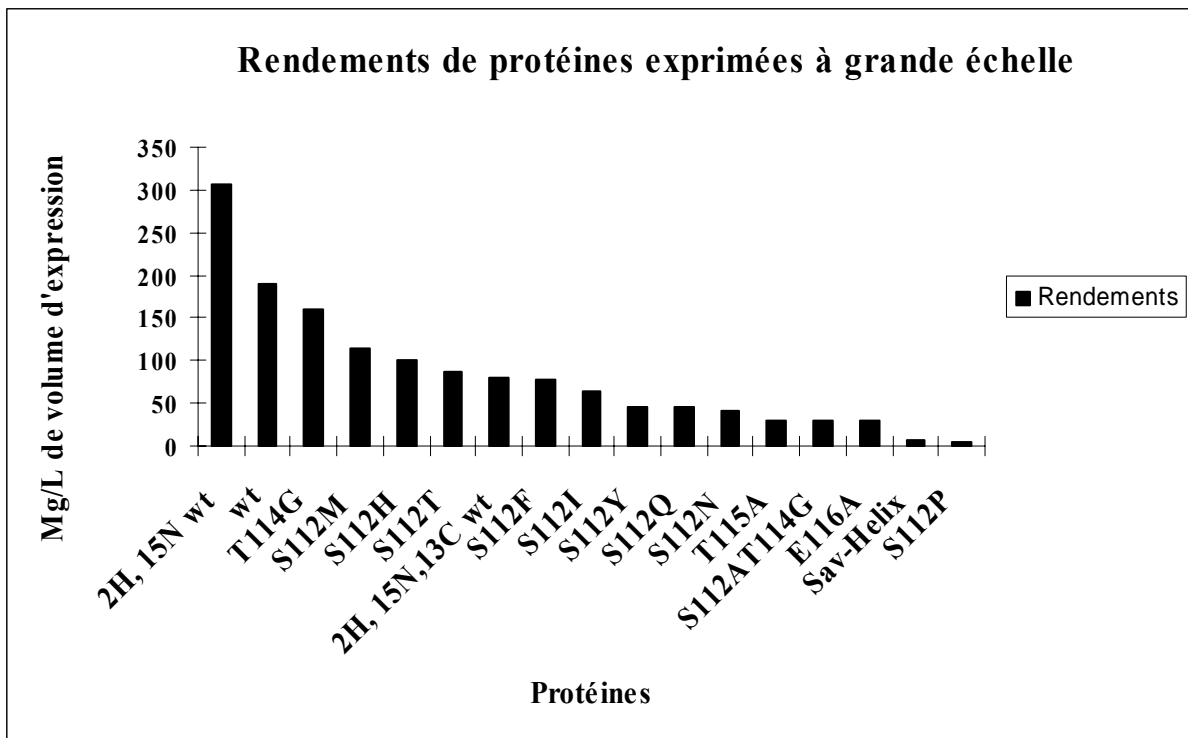


Figure 3.30. Rendements de production de la streptavidine recombinante à grande échelle

3.6. Expression et purification de la streptavidine à petite échelle

L'optimisation des niveaux d'expression à petite échelle a porté sur le milieu d'expression, l'aération, la température et l'extraction de la streptavidine. Chacun de ces facteurs, connu pour influencer les rendements, va être discuté dans les paragraphes suivants.

3.6.1. Etude des paramètres de l'expression

3.6.1.1. Définition du volume

Initialement, nous avons tenté de produire la streptavidine dans un volume de 10 ml. Un gel analytique SDS-B₄F révèle que la quantité de la protéine est minime (Fig. 3.32). Une première quantification a démontré que la quantité de protéine exprimée est moins d'un milligramme.

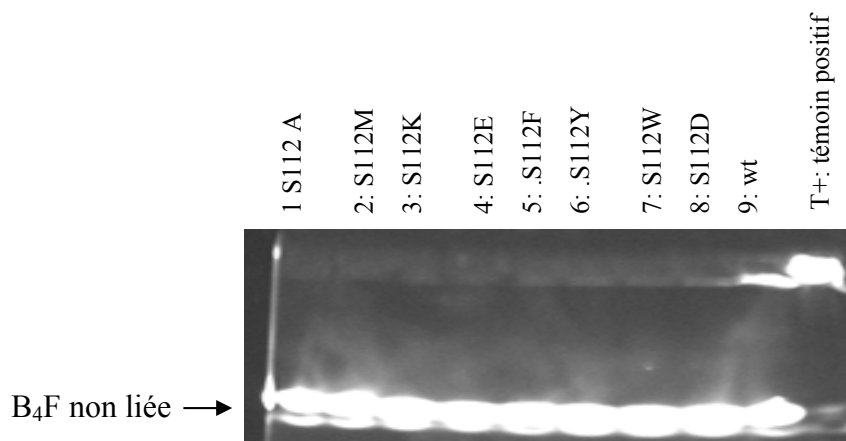


Figure 3.31. Gel SDS-B₄F des mutants de la streptavidine exprimés en 10 ml

Nous avons donc augmenté le volume d'expression à 50 ml (erlenmeyer 250 ml). La quantification d'un extrait bactérien issu de ces 50 ml d'expression présente des rendements

de protéine permettant au minimum une réaction catalytique (3 mg pour le type sauvage, (Fig. 3.33)). Ce volume a été retenu pour l'optimisation des autres variables telles que la température, l'agitation et l'aération.

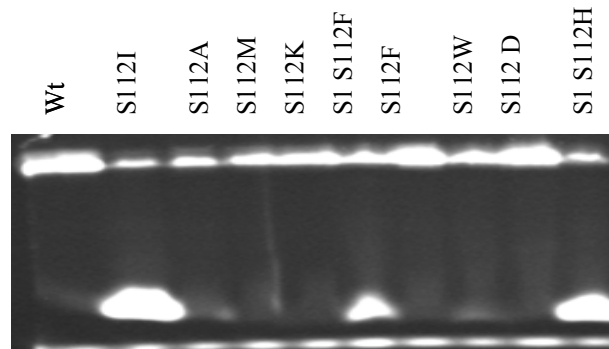


Figure 3.32. Gel SDS-B₄F des mutants de la streptavidine exprimés en 50 ml

3.6.1.2. Définition de l'aération et de l'agitation orbitale

Afin de déterminer l'importance de l'aération pour notre système d'expression, nous avons exprimé la streptavidine dans trois volumes de milieu croissants dans un récipient de même volume (250 ml), permettant ainsi de varier le volume d'air dans le récipient. La quantification des trois extraits confirme le rôle critique de l'aération : dans un erlenmeyer de 250 ml, pour un volume de milieu de 100 et 150 ml, la protéine n'a pas été détectée, alors qu'elle est présente pour une expression pour un volume de 50 ml. Désormais, les expressions à petite échelle ont été effectuées majoritairement en volume de 50 ml dans des erlenmeyers de 250 ml ou dans des proportions 1 : 4 pour des volumes plus grands.

L'agitation orbitale mesurée en rpm (rotations par minutes) s'est avérée d'une importance capitale pour les rendements protéiques car elle a permis d'augmenter les rendements protéiques d'un facteur six. Une expression de la streptavidine type sauvage sous agitation à 250 rpm a abouti à l'obtention de 0.5 mg/ml de protéine (valeur moyenne de deux

répétitions) contre 2.9 mg/ml (valeur moyenne de deux répétitions) obtenus par expression sous agitation à 400 rpm. Les 400 rpm ont donc été utilisées pour l'ensemble des mutants exprimés en 50 ml.

3.6.1.3. Criblage des milieux

Il est connu que les différents milieux déterminent les rendements de production de protéines recombinantes. En plus, chaque combinaison protéine recombinante/souche d'expression nécessite un criblage de milieux à compositions nutritionnelles différentes.

Premièrement, nous avons testé 5 milieux différents développés pour l'expression de protéines recombinantes¹⁵⁵ (Fig. 3.34). Les milieux NZYM, Glucose M9 et TP, présentent des rendements très proches (moins de 10 % de différence entre eux). Bien que moins productif, le milieu autoinductif présente un autre avantage car il permet l'expression en absence de suivi et pourrait être utilisé pour des expressions pendant la nuit¹⁵⁶. Le milieu autoinductif utilise deux sources de Carbone (C) différentes dans sa composition : le glucose et le lactose. Les souches recombinantes développées dans ce milieu croissent jusqu'à saturation grâce à la consommation du glucose qui inhibe totalement le promoteur lac. Une fois le glucose consommé, les souches sont « forcées » de métaboliser le lactose, qui élimine la répression catabolique et induit, de cette façon, l'expression de la protéine recombinante. Il faut noter que ce type d'autoinduction est valable seulement pour le système T7 lac et pour des bactéries perméables au lactose.

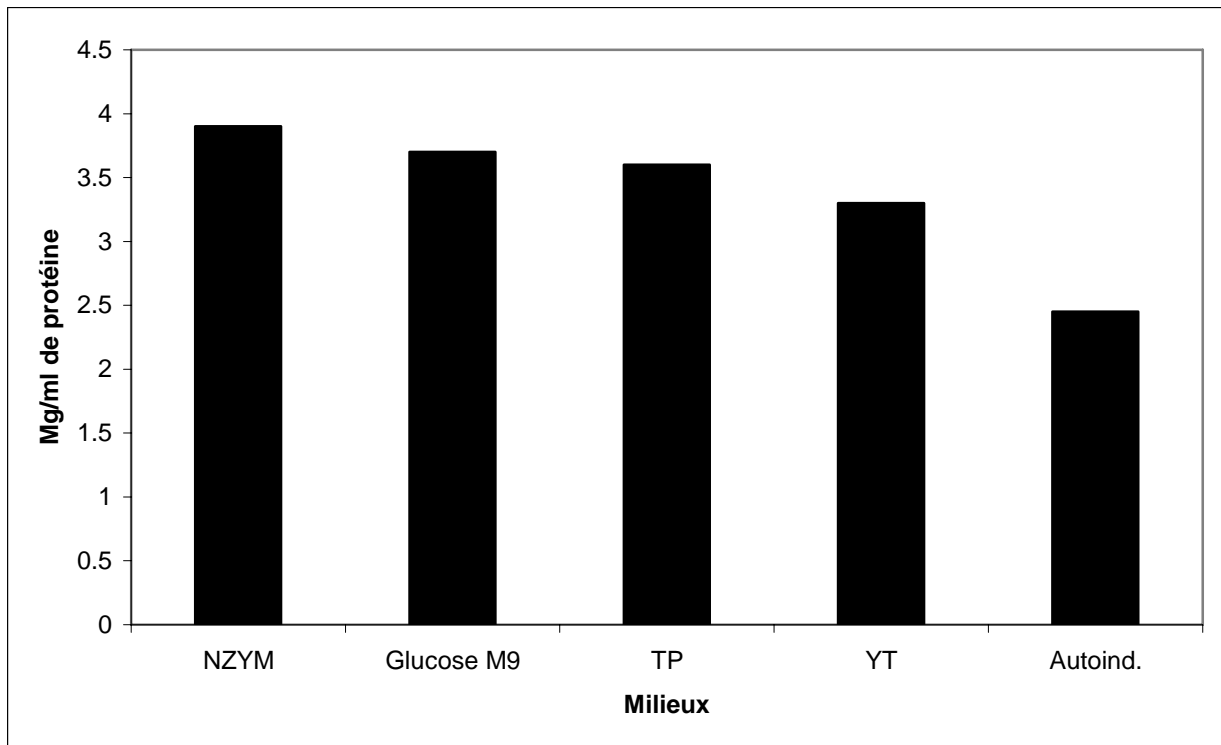


Figure 3.33. Criblage de milieux connus pour l'expression de protéines recombinantes

Le criblage d'un "kit" commercial (Fig 3.35) en termes de productivité a fait ressortir deux milieux optimaux (« Super Prime Broth » et « Superior Prime Broth »). Compte tenu du coût élevé de ces deux milieux optimaux et de l'amélioration peu spectaculaire (pas plus de 10% par rapport au milieu TP, notre milieu standard) qu'ils apportent, nous avons gardé le TP comme milieu pour le criblage des autres paramètres.

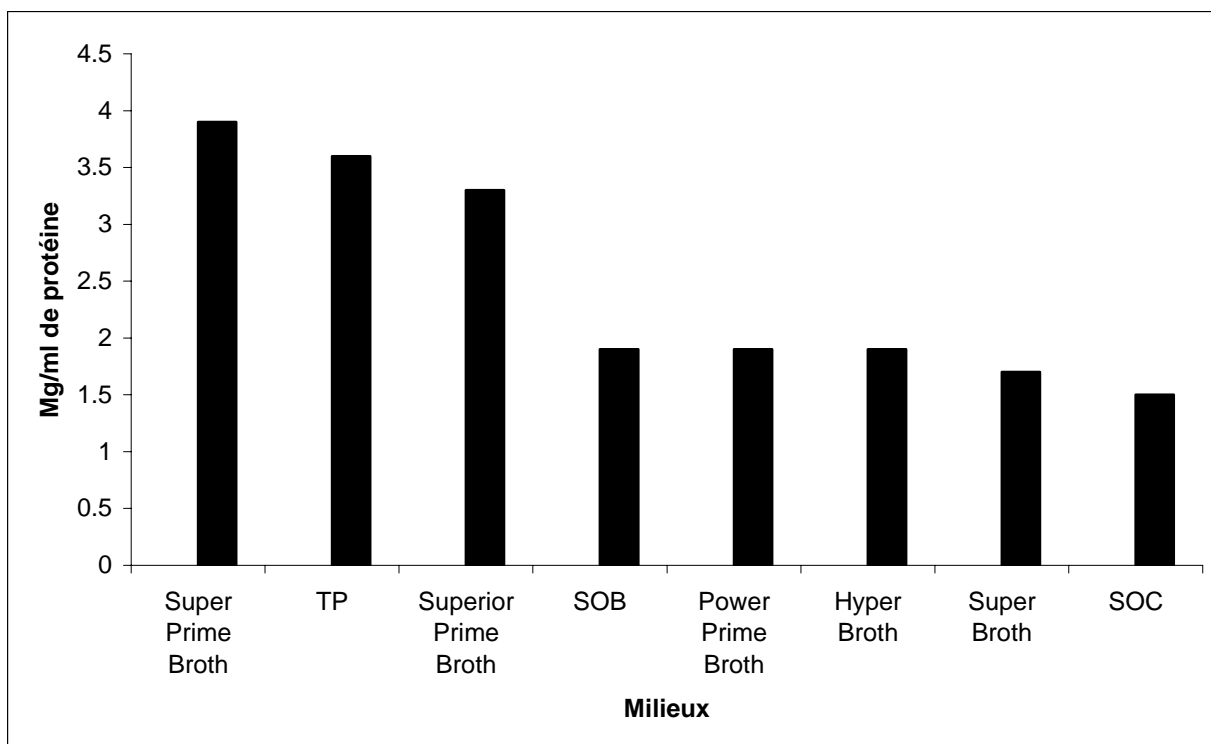


Figure 3.34. Criblage des milieux commerciaux connus pour l'expression des protéines recombinantes

Remarque :

Pour ces expériences, nous avons utilisé des milieux ne contenant pas de glucose. Et ceci est une différence importante dans l'expression menée à haute densité cellulaire en fermenteur et l'expression en volume réduit de 50 ml. Le glucose est toujours un composant de la pré-culture. Etant une source de Carbone (C) facilement assimilable, le glucose exerce un effet positif sur le rendement de production de la streptavidine. Aussi, elle est l'agent responsable de la suppression basale de la streptavidine avec le système de régulation pET11b-Sav/ BL21 (DE3) pLysS¹⁵⁷. Un troisième effet de glucose est le renforcement des parois bactériennes lors de la formation du peptidoglycane¹⁵⁸. Le traitement de l'extrait bactérien, issu d'une expression en 50 ml, est dépourvu de l'étape de dénaturation en agent chaotrope et à pH bas. Lors des cycles congélation et décongélation des souches, l'explosion des cellules

développées en absence de glucose est donc plus efficace et occasionne des rendements plus élevés (non-montré). Je suppose que la quantité de glucose présente dans la préculture n'est pas totalement consommée et vient supprimer l'expression basale dans la phase préinductive sans pour autant renforcer les parois bactériennes.

3.6.1.4. Optimisation de la température

Il est connu que chaque espèce de protéine recombinante a une température optimale d'expression¹⁵⁹ qui ne peut être déterminée que d'une façon empirique. Cette température peut être différente de la température optimale de croissance de la souche recombinante. Afin d'étudier l'influence de la température sur les rendements son rôle a été étudié.

Cette étude a consisté à mesurer la concentration de protéine en fonction de la température, afin de déterminer la température optimum pour la méthode d'expression de la streptavidine en 50 ml. Afin de déterminer l'effet de ce paramètre, une attention particulière a été apportée à la température effective dans l'incubateur. En effet, la température souhaitée, programmée sur les incubateurs, apparaissait différente de la température affichée sur l'incubateur qui elle-même était différente de la température effective dans l'incubateur mesurée avec un thermomètre à Mercure. Il faut noter que seules les températures effectivement mesurées ont été retenues pour cette évaluation.

La figure 3.36 montre la quantité protéique en fonction de la température. La courbe présentée représente le rendement de la streptavidine en fonction de la température. Il faut noter que les rendements rapportés présentent la moyenne de deux expressions en parallèle. On peut constater que la production est maximale quand la température dans l'incubateur est aux environs de 34 °C. Celle-ci constitue donc la température optimum pour ce genre d'expression.

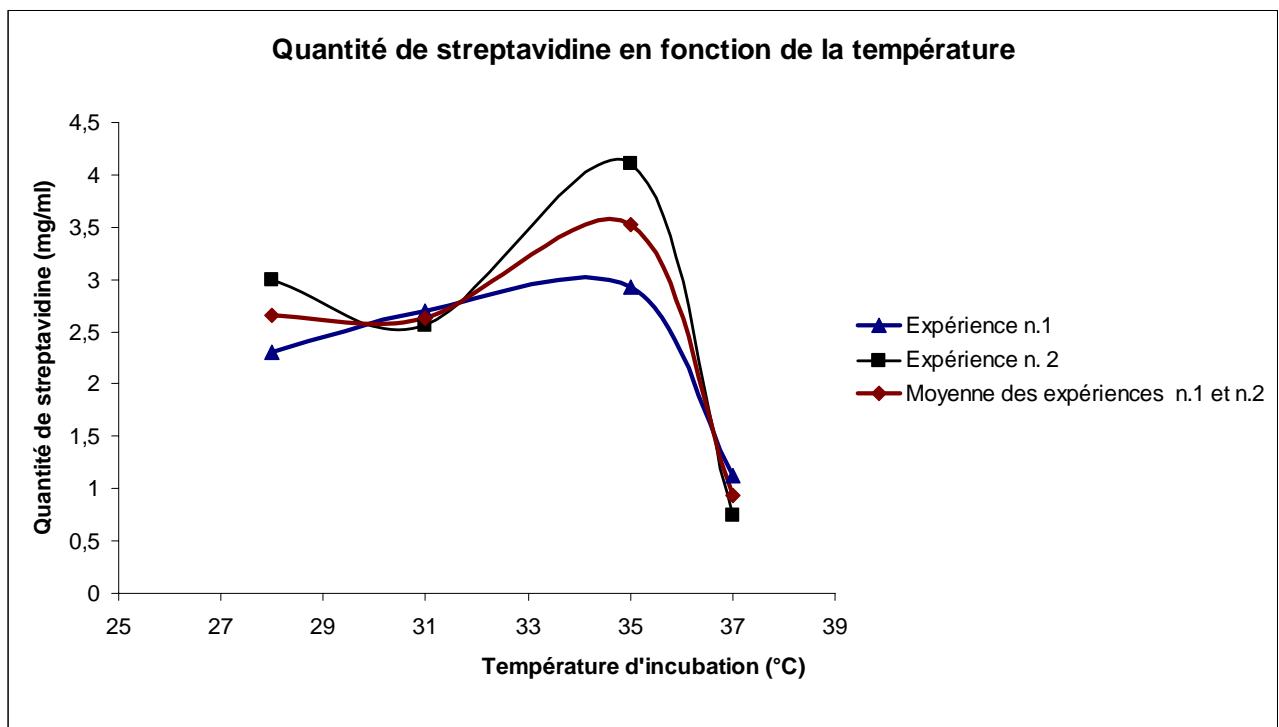
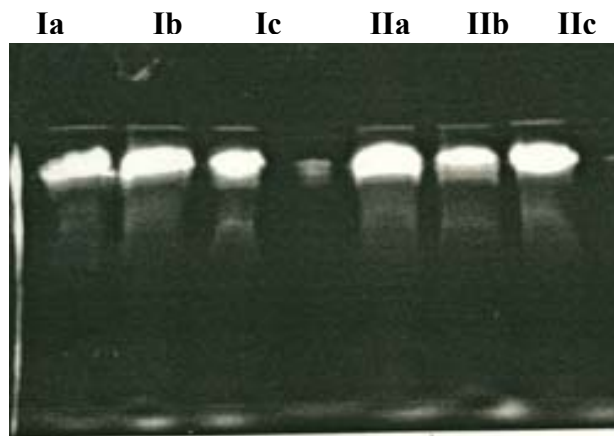


Figure 3.35. Effet de la température sur le rendement de production de la streptavidine à petite échelle

3.6.1.5. Analyse des extractions

Après la première extraction (voir §. 2.7.2), la présence de la protéine dans la fraction insoluble m' a incité à tenter une deuxième extraction, avec une solution (TRIS/HCl 20mM pH=7.4 ; NaCl 100mM, PMSF 1 mM), de la fraction insoluble ceci étant susceptible d'extraire une quantité supplémentaire de protéine. Cette hypothèse s'est révélée correcte lors d'une analyse des deux extractions sur gel SDS-B₄F (Fig. 3.37A). Désormais, les expressions sont traitées par deux extractions consécutives (la première sur les cellules explosées et la deuxième sur la fraction insoluble résultante après la première extraction). J'ai testé aussi une troisième et une quatrième extraction dont l'analyse par gel SDS-B₄F a démontré la présence de la streptavidine. La figure 3.37B montre que pour l'une des expressions (dite a) l'intensité de la fluorescence est la même (suggérant une quantité identique de la streptavidine) pour les quatre extractions successives, tandis que pour la deuxième expression (dite b), l'intensité de la fluorescence diminue ce qui indique la diminution de la quantité de la streptavidine pour chaque nouvelle extraction. Cette variation peut être attribuée à la différente quantité de départ de streptavidine exprimée. La première et la deuxième extraction ont été suffisantes pour le criblage de la majorité des mutants K121X, L124X, S112AK121X, S112KK121X, S112AL124X, S112KL124X en terme de performances catalytiques.

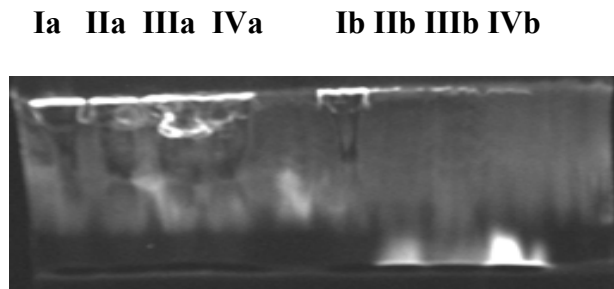


Ia, Ib, Ic: Première extraction de la streptavidine sur trois expressions a,b et c.

IIa, IIb, IIc: Deuxième extraction de la streptavidine sur la première fraction insoluble des expressions a,b et c.

Figure 3.36A. Gel SDS-B₄F

Première et deuxième extraction de la streptavidine sur trois expressions différentes (a, b et c)



Ia, IIa, IIIa, IVa : Première, deuxième, troisième et quatrième extraction sur une expression (a)

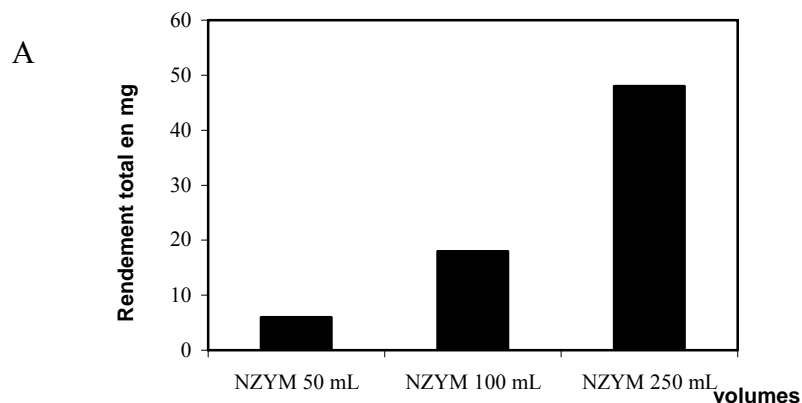
Ib, IIb, IIIb, IVb : Première, deuxième, troisième et quatrième extraction sur une expression (b).

Figure 3.36B. Gel SDS-B₄F

Première, deuxième, troisième et quatrième extraction sur deux expressions différentes

3.6.2. Transférabilité de volume « Scale up »

Afin de savoir si la quantité de la protéine augmente en fonction du volume j'ai exprimé la streptavidine type sauvage en volume du milieu croissant (50 ml, 100 et 250 ml). Pour tenir compte du ratio optimal du taux d'aération (1 :4), les expressions ont été effectuées dans des erlenmeyers de volume respectivement de 250 ml, 500 ml, 1000 ml dans deux milieux (NZYM et TP). Le but de cette expérience a été de déterminer si des mutants qui se caractérisent avec des rendements modestes peuvent être exprimé dans un plus grand volume ceci permettant leur criblage en catalyse assez vite. Les quantités obtenues démontrent que les rendements protéiques augmentent avec l'augmentation de volume. (Fig. 3.38A et Fig. 3.38B).



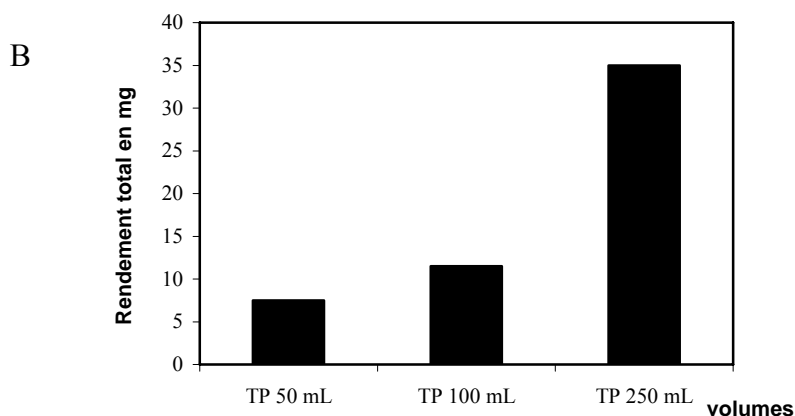


Figure 3.37. Transférabilité de volume dans TP (A) et dans NZYM (B)

3.6.3. Immobilisation de la streptavidine sur la biotine agarose

La streptavidine présente un avantage : elle est tétravalente fixant 4 moles de biotine pour une mole de protéine. Ces quatre sites actifs peuvent accommoder quatre catalyseurs organométalliques biotinylés responsables de la transformation catalytique. Nous avons raisonné que une partie des sites actifs de la streptavidine peut être utilisé pour son immobilisation sur la biotine agarose, laissant des sites libres pour l'incorporation des entités catalytiques. L'intérêt de cette immobilisation porte sur l'élimination de la longue procédure de purification des protéines recombinantes. L'immobilisation assure l'élimination des autres protéines présentes dans l'extrait qui ne sont pas fixées sur le support (biotine agarose). Les sites actifs libres sont utilisés pour l'ancrage supramoléculaire des complexes organométalliques. Un schéma présente « la pêche » de la streptavidine sur la biotine agarose (Fig. 3.39). Le principe d'une catalyse avec une streptavidine immobilisée a été prouvé sur une protéine purifiée par une chromatographie d'affinité et lyophilisée. Par la suite, le système de purification par immobilisation de la streptavidine sur la biotine agarose a été utilisé pour le criblage des mutants de saturation K121X, L124X et les mutants cumulés de saturation

(S112AK121X, S112KL124X, S112AK121X, S112AL124X) exprimées en volume de 50 ml et quantifiés en termes de rendements protéiques.

Cette nouvelle approche que nous venons de mettre au point a vite trouvé son application dans nos investigations, notamment parce qu'elle permet de cribler les protéines exprimées à petite échelle après leurs immobilisation sur la biotine agarose ce qui a permis de cribler près de 114 mutants de la streptavidine en terme de performances catalytiques. Les résultats de criblage des 114 mutants immobilisés sont présentés dans §. 3.8.2.2 .

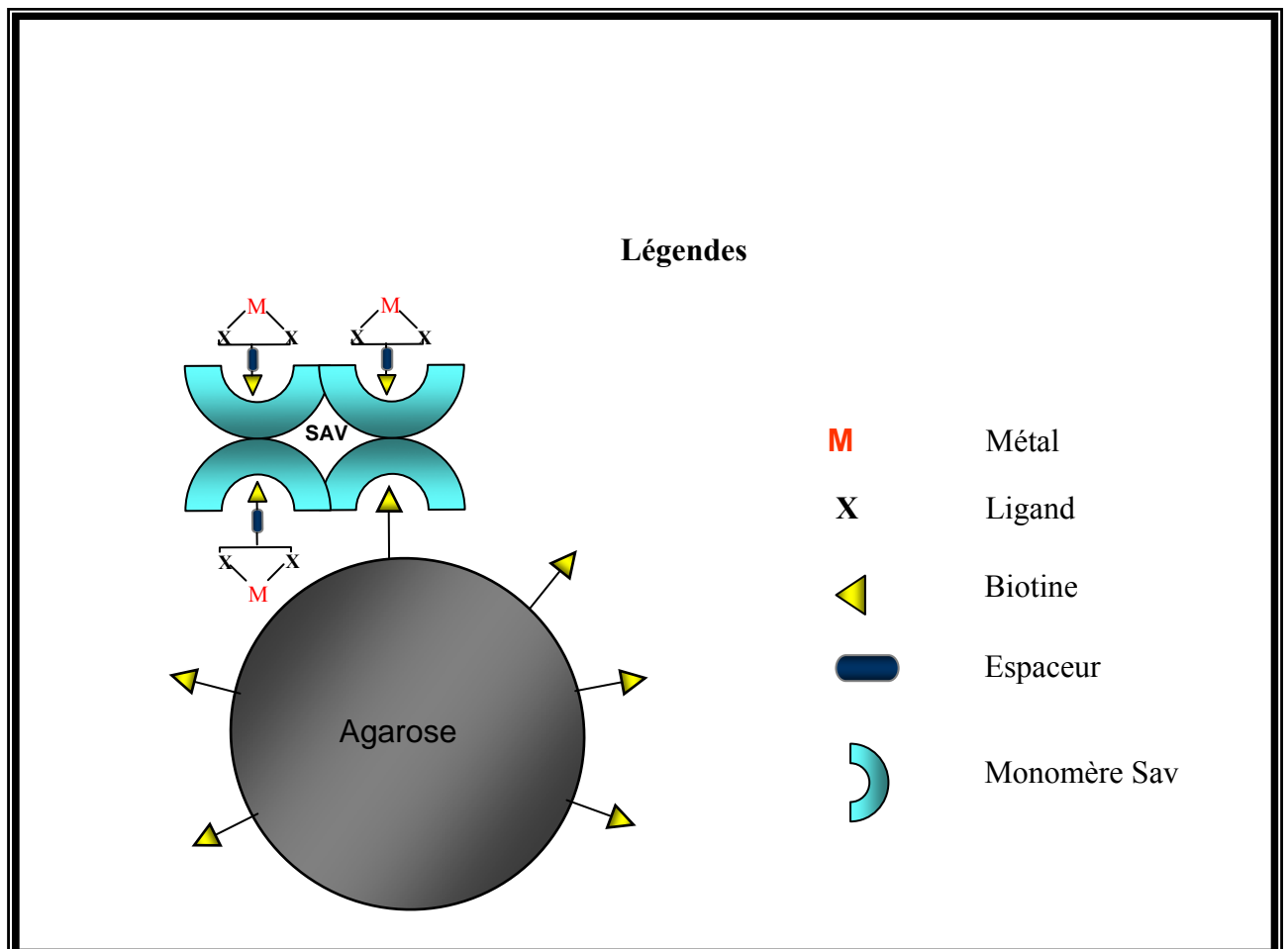


Figure 3.38. Principe d'une métalloenzyme, immobilisée sur biotine agarose

3.6.4. Rendements de production à petite échelle

Les mutants de saturation uniques (K121X, L124X) et doubles (S112AK121X, S112KK121X, S112AL124X et S112KL124X), destinés à une immobilisation sur biotine agarose ont été quantifiées par suivi de « quenching » de la fluorescence de B₄F, en plaque Elisa à 96 puits, en collaboration avec Thibaud Rossel et Alessia Sardo.

La figure 3.40 résume les rendements protéiques (exprimés en mg/ml d'extraction) obtenus pour les mutants exprimés à petite échelle. Il faut noter que certains d'entre eux n'expriment pas du tout la streptavidine. La valeur rapportée représente une valeur moyenne des niveaux d'expression.

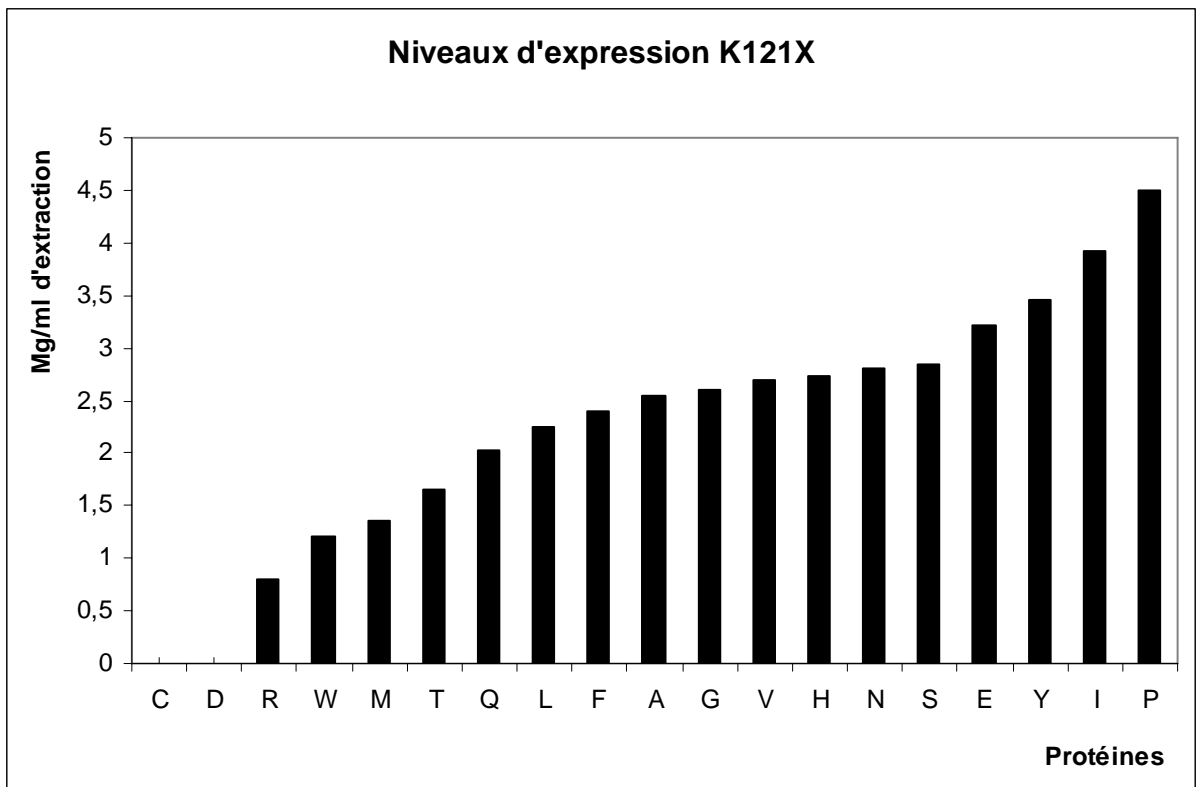


Figure 3.39A. Rendements de production à petite échelle : niveaux d'expression K121X

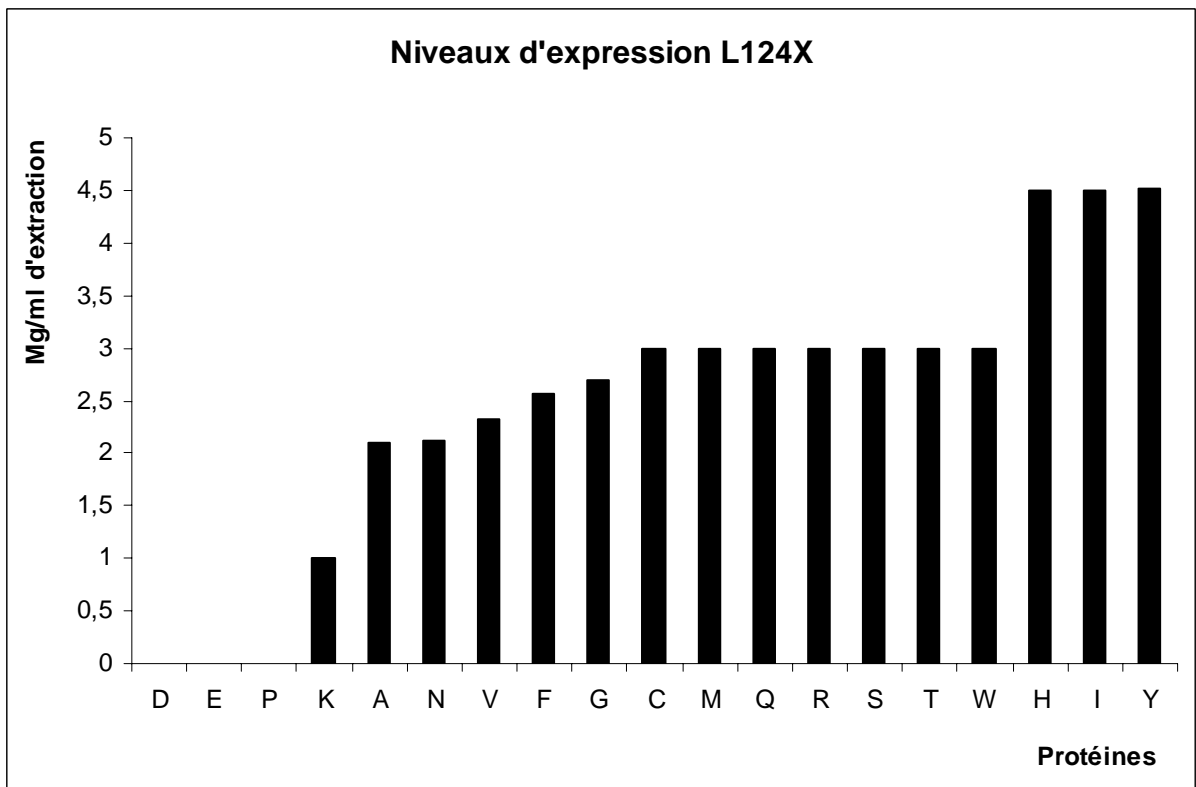


Figure 3.39B. Rendements de production à petite échelle : niveaux d'expression L124X

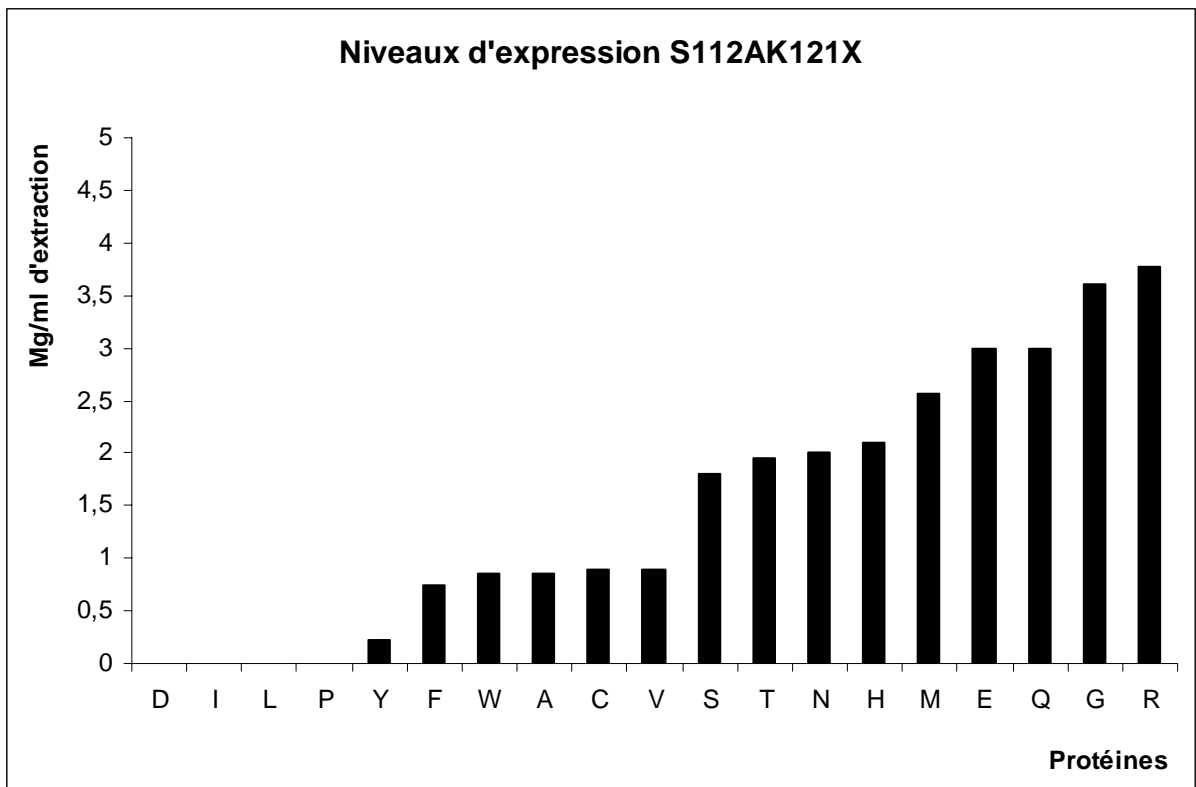


Figure 3.39C. Rendements de production à petite échelle : niveaux d'expression S112AK121X

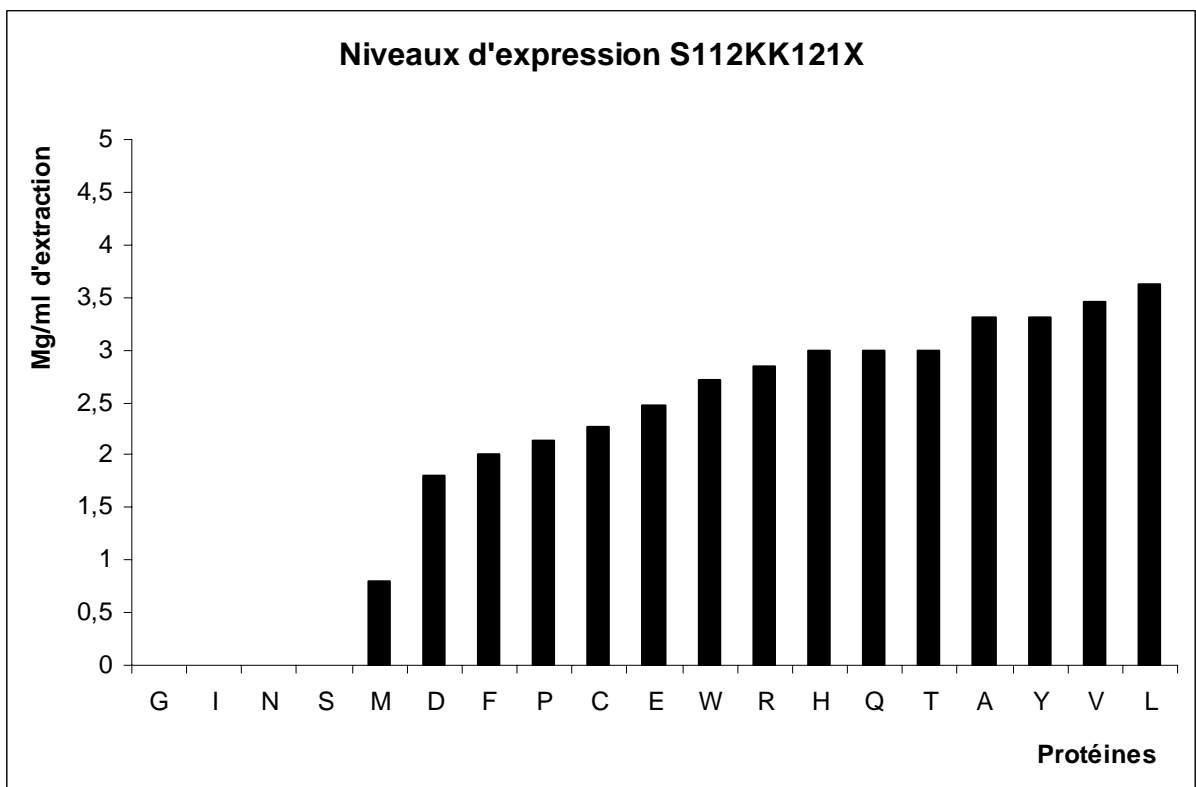


Figure 3.39D. Rendements de production à petite échelle : niveaux d'expression S112KK121X

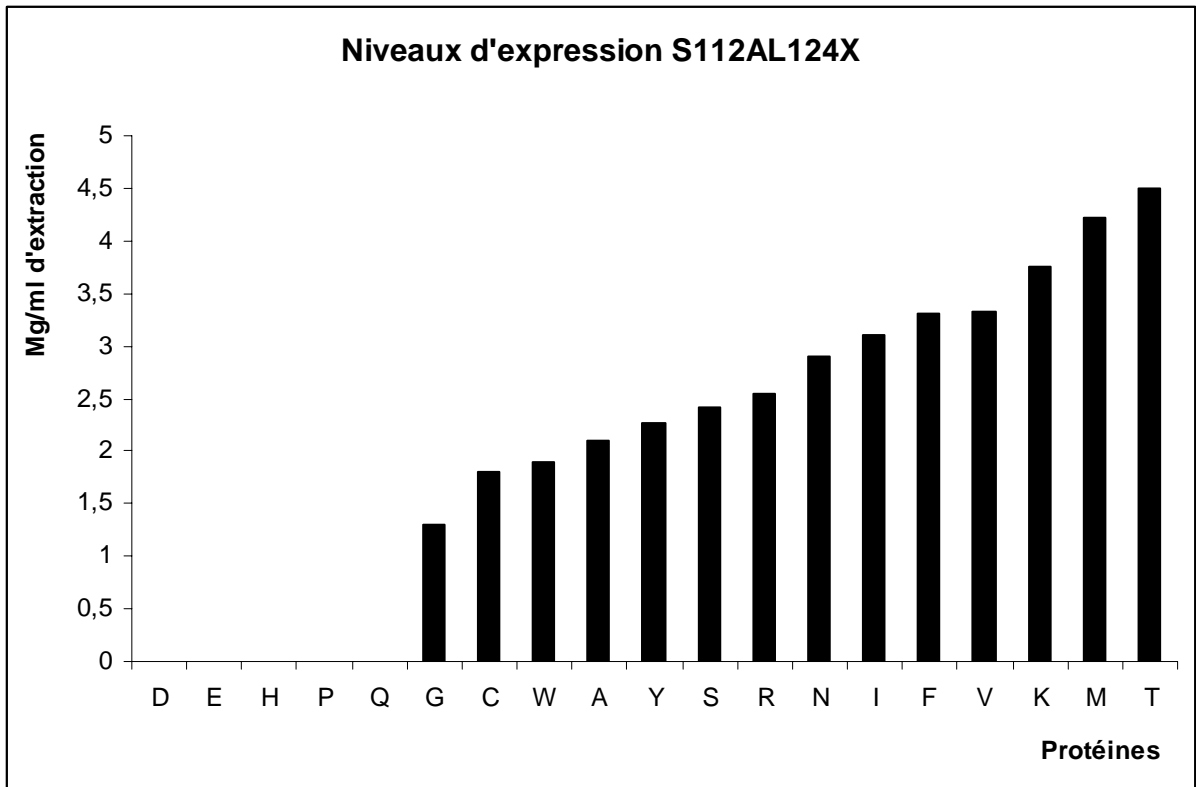


Figure 3.39E. Rendements de production à petite échelle : niveaux d'expression S112AL124X

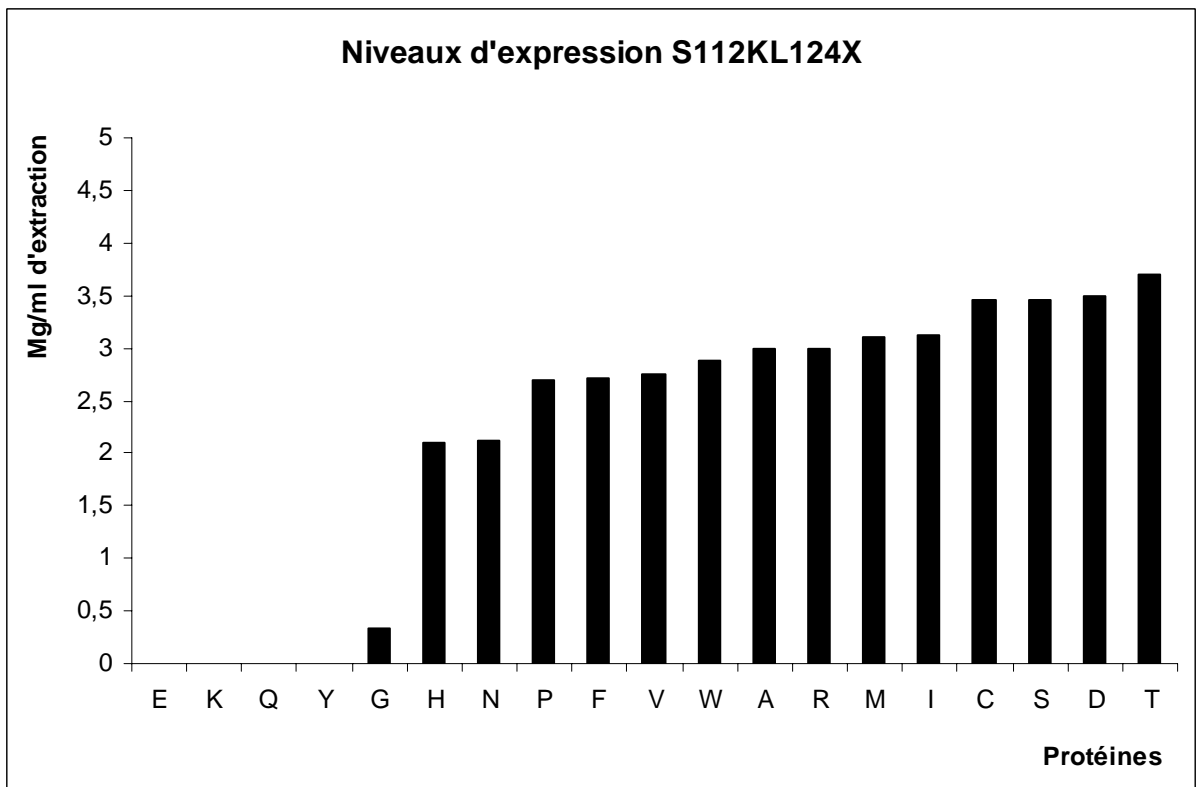


Figure 3.39F. Rendements de production à petite échelle : niveaux d'expression S112KL124X

A travers ces résultats, il apparaît qu'il est quasiment impossible de prédire le rendement en protéines d'une expérience de saturation à autre, les taux les plus élevés ne correspondant pas toujours aux mêmes types de mutation, quand on passe d'une saturation à une autre. Par contre toutes les saturations ont présenté quelques mutations à rendements élevés, c'est-à-dire supérieurs au rendement moyen de la protéine sauvage (3,5 mg/ml). Nous verrons plus loin si ces mutations donnent de bons résultats aux tests de criblage d'énantioselectivité.

3.7. Comparaison de l'expression à petite et à grande échelle.

L'expression en 50 ml a été conçue afin d'exploiter la possibilité d'explorer plus de diversité protéique dans les plus brefs délais. Au final, ce système présente l'avantage de permettre l'obtention d'un mutant de la streptavidine au bout de 30 heures, par rapport aux 250 heures caractérisant la production en fermenteur de 10 l. Ce gain de temps est attribuable majoritairement à l'élimination des étapes de la dénaturation-renaturation, ainsi qu'à l'absence de lyophilisation. En plus, les volumes d'expression de 50 ml permettent la production et le traitement simultanés d'une trentaine de protéines d'intérêt. La comparaison des systèmes de production à grande et à petite échelle (expression et purification) est présentée dans le tableau 3.2.

Critère de comparaison	Fermentation 10 l	Mini expression en 50 ml
Pré culture	150 ml	7.5 ml
Culture	150 ml	50 ml
Traitement des cellules	Congélation-décongélation	Congélation-décongélation
Reprise des cellules	Volume de 150 ml	Deux extractions consécutives (1.5ml total)
Digestion des acides nucléiques par la DNA ase	Présente	Présente
Dénaturation-rénaturation	Présente	Absente
Séparation de la streptavidine des autres protéines cellulaires	2-imminobiotine agarose	Biotine agarose après la quantification de la streptavidine
Lyophilisation	Présente	Absente
Durée totale de l'obtention de la protéine	approximativement 200h	approximativement 30h

Tableau 3.2. Comparaison du système de production en 10 l et le système de production en 50 ml

3.8. Diversité chimique et protéique par rapport au transfert hydrogénant des cétones.

La dissociation de l'activité catalytique, exercée par le métal, de la sélectivité due aux interactions critiques avec la deuxième sphère de coordination (la protéine), déterminent le travail en concert entre chimistes et biologistes dans ce projet. Les paragraphes suivants, présentent la finalité en termes de performance catalytique des métalloenzymes artificielles développées dans le groupe par rapport à l'induction asymétrique lors de transfert hydrogénant de dérivés carbonylés. Le transfert hydrogénant des cétones par des métalloenzymes artificielles, basées sur la technologie streptavidine-biotine, a été mis en place par le Dr. Christophe Letondor (ancien collaborateur) et succédé par Mlle Anca Pordea et Monsieur Thibaud Rossel. Comme l'optimisation de l'énantiosélectivité des métalloenzymes artificielles est largement liée à la diversité protéique une brève discussion sur les tendances énantiodiscriminatives va être présentée.

3.8.1. Stratégie de l'optimisation

Avant de passer à la présentation des résultats, il paraît nécessaire de déterminer la stratégie du criblage de la diversité touchant l'optimisation chimio-génétique. La matrice de l'optimisation des métalloenzymes artificielles est tridimensionnelle. Une première dimension concerne la diversité chimique touchant les complexes biotinylés catalytiques (potentiel d'optimiser le métal catalytique, l'arène η^6 , le positionnement lors de l'accrochage de la biotine au sein de tabouret de Piano (*ortho*, *méta* ou *para*)). La deuxième dimension exploite l'optimisation génétique qui vient s'ajouter aux meilleurs catalyseurs issus de l'optimisation chimique. Les meilleurs métalloenzymes artificielles (après l'optimisation chimio-génétique)

sont appliqués sur différents dérivés carbonylés (la diversité des substrats constitue la troisième dimension).

3.8.2. Tendances d'énantiosélectivité

3.8.2.1. Tendances S112X

L'optimisation chimique a fait ressortir cinq complexes catalytiques performants en termes de sélectivité et de conversion en présence de la streptavidine type sauvage. Ces complexes ont été combinés avec les mutants issus d'un premier tour d'optimisation génétique S112X pour le criblage en cocktail de trois dérivés de l'acétophénone¹⁴¹(Fig. 3.41).

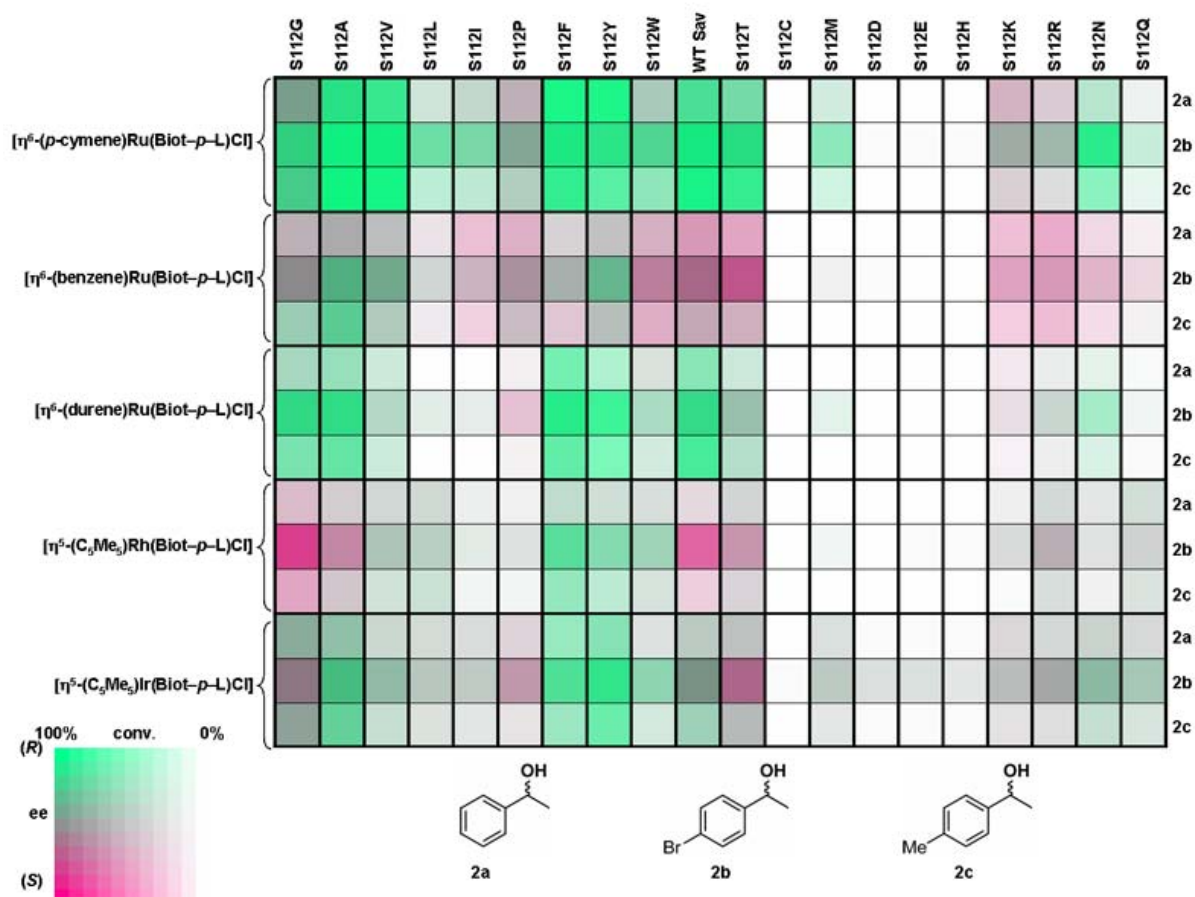


Figure 3.40. Tendances énantiosélectives $[\eta^n-(\text{C}_n\text{R}_n)\text{M}(\text{Biot-}q\text{-L})\text{Cl}]$ incorporés dans S112X pour les 2a, 2b, 2c:

$n=5$ et $\text{M}=\text{Ir}, \text{Rh}$; $n=6$ et $\text{M}=\text{Ru}$

Les alcools énantiomériquement enrichis sont représentés sous la forme d'« empreintes digitales » pour chaque combinaison appliquée (complexe, protéine). L'intensité de la couleur reflète la valeur de la conversion, tandis que la couleur indique l'énantiomère obtenu préférentiellement : couleur verte pour l'énantiomère (*R*), passant par le gris pour le produit racémique et rose pour les énantiomères (*S*). Ce type de représentation est illustré dans la figure 3.41.

L'analyse de cette figure par lignes permet de comparer les tendances énantiosélectives des cinq complexes catalytiques avec les 20 protéines S112X pour les trois substrats. Il est évident que pour chaque complexe catalytique existe une prédominance sélective. Pour le complexe $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\mathbf{Biot}\text{-}p\text{-}\mathbf{L})\text{Cl}]$, les empreintes vertes prédominent. Inversément, le complexe $[\eta^6\text{-}(\text{benzène})\text{Ru}(\mathbf{Biot}\text{-}p\text{-}\mathbf{L})\text{Cl}]$ favorise les alcools (*S*) en présence des mutants S112X.

Le complexe $[\eta^6\text{-}(\text{durène})\text{Rh}(\mathbf{Biot}\text{-}p\text{-}\mathbf{L})\text{Cl}]$ oriente l'énantiosélectivité préférentiellement vers l'énantiomère (*R*). De faible sélectivité (*S*) caractérise le complexe $[\eta^5\text{-}(\text{C}_5\text{Me}_5)\text{Rh}(\mathbf{Biot}\text{-}p\text{-}\mathbf{L})\text{Cl}]$ et de faible sélectivité (*R*) est observable pour le complexe $[\eta^5\text{-}(\text{C}_5\text{Me}_5)\text{Ir}(\mathbf{Biot}\text{-}p\text{-}\mathbf{L})\text{Cl}]$.

La diversité chimique est indubitablement à l'origine des tendances énantiosélectives. L'impact de la diversité protéique peut être évalué par une lecture verticale de la grille de la figure 3.42. Pour les mutants S112Y, S112F, S112A, la tendance énantiodiscriminative est catégoriquement (*R*). Les mutants cationiques, S112K et S112R favorisent la formation des produits (*S*).

Néanmoins, avec un complexe donné $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\mathbf{Biot}\text{-}p\text{-}\mathbf{L})\text{Cl}]$ une transition de produit (*R*) avec la protéine S112A au produit (*S*) avec la protéine S112K a lieu. Cette inversion de préférence énantiodiscriminatives supporte le rôle critique de la deuxième sphère

de coordination dans les fins mécanismes gérant la catalyse asymétrique par des métalloenzymes artificielles.

Les colonnes pour les mutants S112C, S112M, S112D, S112E, S112H sont dépourvues de couleur (voir colonnes de la figure 3.41), traduisant ainsi que la conversion de ces transformations est quasi nulle, ceci suggérant un manque d'activité catalytique. Il paraît probable que la chaîne latérale de ces mutants, coordonne le Ruthénium (Ru), inhibant ainsi son activité catalytique.

3.8.2.2. Tendances K121X, L124X, S112AK121X, S112KK121X, S112AL124X, S112KL124X

Une observation globale de tableau récapitulatif (Fig. 3.42) des protéines mutées (K121X, L124X et S112AK121X, S112AL124X, S112KK121X, S112AL124X) permet de déterminer les tendances énantiodiscriminatives des deux complexes testés. Tandis que le complexe $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\mathbf{Biot}\text{-}p\text{-L})\text{Cl}]$ présente majoritairement une tendance verte (*R*) sélective, le complexe $[\eta^6\text{-(benzène)}\text{Ru}(\mathbf{Biot}\text{-}p\text{-L})\text{Cl}]$ favorise les alcools (*S*). Cette observation générale confirme l'impact de la partie organométallique de catalyseur dans l'induction asymétrique.

➤ Analyse horizontale pour le complexe $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\mathbf{Biot}\text{-}p\text{-L})\text{Cl}]$

La majorité des protéines K121X présente une tendance (*R*) pour les alcools formés. Cependant, avec des mutations isolées K121G une tendance opposée pour les deux substrats se présente. Tandis que le substrat stériquement plus encombré est converti en alcool (*S*), le substrat de plus petite taille est converti en alcool (*R*). Cette tendance de discrimination différente est présente aussi pour la mutation K121Y. Cette protéine converti le substrat plus

encombré an alcool (*R*) et en (*S*) le substrat de plus petite taille. Cette observation suggère des interactions particulières de ces mutants (glycine et tyrosine) avec les deux substrats qui inversent le mécanisme d'énantiosélection.

Les protéines S112AK121X présentent une tendance globale (*R*). En fait le mutant S112A qui a présenté des tendances (*R*) dans le premier tour d'optimisation génétique S112X, semble la transmettre dans la lignée des doubles mutants S112AK121X. Seulement le mutant S112AK121G inverse la tendance en faveur de l'énantiomère opposé (*S*), ceci peut-être attribuable à la flexibilité de la glycine.

La ligne des mutants S112KK121X se caractérise par la prédominance (*S*). La même tendance (*S*) est caractéristique pour le mutant S112K. Les mutants L124X est semblable à ceux de la K121X. Les mutants cumulés S112AL124X et S112KL124X gardent les tendances imputables à la première mutation (les doubles mutants portant la mutation S112A orientent la sélectivité vers le produit (*R*) et les protéines doublement mutées S112K vers l'alcool opposé (*S*). Le phénomène d'inversion de la sélectivité par le passage d'un mutant à l'autre est valable aussi avec les mutants cumulés. Tandis que la protéine S112AL124L oriente la sélectivité pour les deux substrats vers l'alcool (*R*), la protéine S112AL124M favorise la discrimination de l'énantiomère opposé. Cette observation confirme le rôle critique de la deuxième sphère de coordination dans les mécanismes énantiodiscriminatifs, à l'échelle d'un acide aminé près du métal catalytiquement actif.

➤ **Analyse horizontale pour le complexe $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$**

Des conclusions générales, concernant la deuxième partie du tableau récapitulatif, peuvent être tirées. Les mutants K121X et L124X, inversent leurs tendances générales. Les doubles mutants S112AL124X et S112KL124X gardent les tendances de la première mutation, ceux portant la mutation S112A favorisent l'énantiomère (*R*), ceux avec la mutation S112K, l'alcool (*S*). L'inversion de sélectivité (*S*) à sélectivité (*R*) par un acide aminé est valable aussi

dans le cas de la glycine comme deuxième mutation : S112AL124G est (*S*)-sélective, tandis que S112AL124F est (*R*) sélective. En fait, il semble que la glycine inverse la sélectivité et la réaction suit le mécanisme énantiosélectif dû au complexe : tendance globale (*S*).

Les « hits » identifiés après la lecture de l'énantiosélectivité à ce jour (criblées avec les complexes ($[\eta^6\text{-(arène)Ru}(\mathbf{Biot}\text{-}p\text{-}\mathbf{L})\text{H}]$, arène=benzène ou *p*-cymène) pour les substrats *p*-Bromoacétophénone et 4-phényl-2-butanone) sont listés en ordre décroissant d'excès énantiomérique : L124V (83% ee), S112AK121F (70% ee), S112AL124V (68% ee), S112AK121Q (65% ee), K121L (64 % ee), S112A K121T (59% ee).

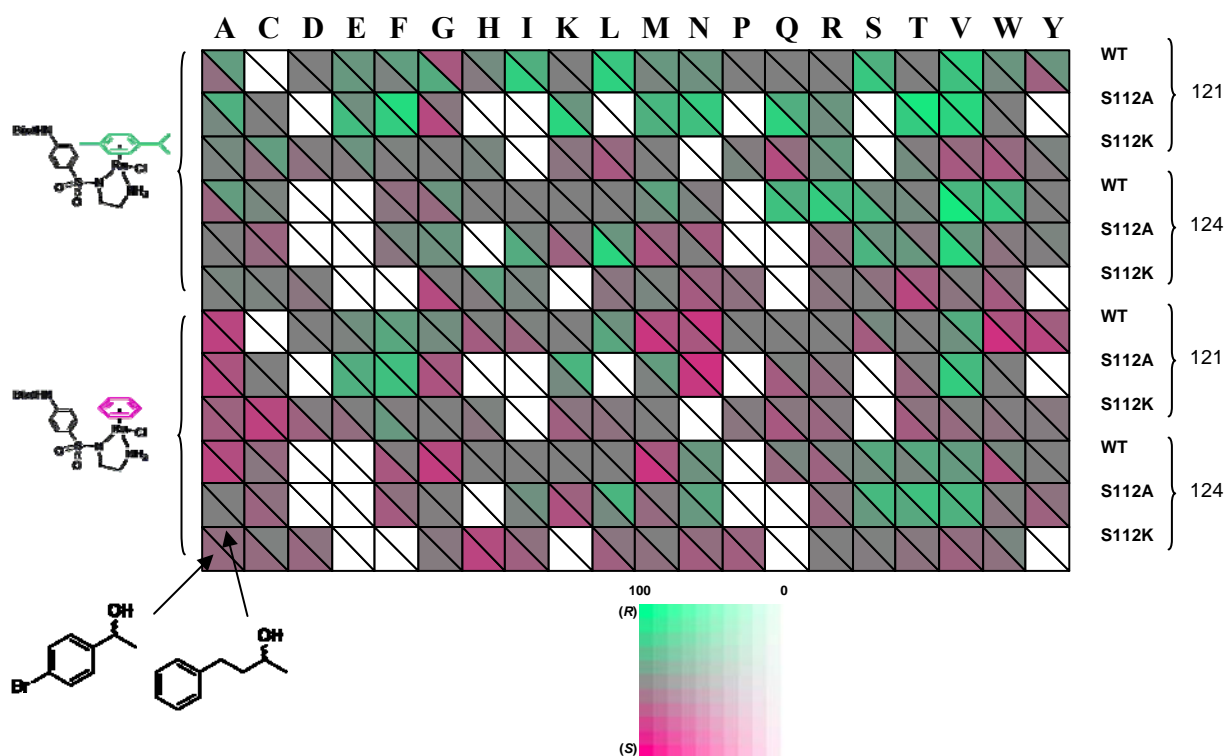


Figure 3.41. Tendances énantiosélectives S121X, L124X, S112AK121X, S112KK121X, S112AL124X, S112KL124X avec les catalyseurs $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru}(\mathbf{Biot}\text{-}p\text{-}\mathbf{L})\text{Cl}]$ et $[\eta^6\text{-(benzène)Ru}(\mathbf{Biot}\text{-}p\text{-}\mathbf{L})\text{Cl}]$ pour le les substrats *p*-Bromoacétophénone et 4-phényl-2-butanone

CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'optimisation chimio-génétique des métalloenzymes artificielles a été possible à travers l'exploitation de la diversité génétique et chimique. Ce travail a porté sur l'optimisation de la partie enzymatique du catalyseur. On s'est appuyé sur des études structurales (simulation de « docking » et une co-cristallisation de la streptavidine complexée avec une entité catalytique) pour identifier plusieurs positions critiques de mutations d'acides aminés sur la streptavidine. Il s'est avéré que par rapport à la sélectivité des métalloenzymes, les positions critiques ont été celles les plus proches du métal catalytique. Près de 150 mutants (issues de mutations uniques et doubles) ont ainsi été obtenus par la mutagenèse dirigée et de saturation à des positions à proximité du site catalytique (S112X, la boucle 7-8, K121X, L124X).

L'exploration de la diversité protéique au cours de cette investigation a ouvert plusieurs perspectives, dont la mise en œuvre a été engagée, pour multiplier le nombre de mutants potentiels. Par exemple, afin de pouvoir muter simultanément des séquences entières, un gène « redesigné » de la streptavidine a été réalisé. Il porte les sites de restriction AvrII, SacII, MunI qui permettent la digestion des boucles et des brins de la streptavidine type sauvage et leur réinsertion en tant que des séquences mutées. L'une des premières perspectives serait de mener une étude plus approfondie du site actif, en mutant simultanément plus d'un acide aminé. Ceci pourrait permettre d'identifier des zones du site actif qui influencent la catalyse car il est probable que des acides aminés contigus soient interdépendants et qu'une telle approche permette une optimisation fine des interactions stériques et électroniques qui ont lieu dans le site actif.

Enfin, le développement d'une streptavidine chimérique que nous avons obtenue ouvre une nouvelle voie pour donner une fonctionnalité additionnelle aux métalloenzymes artificielles. Il est prévu, qu'elle soit couplée au Cérium (Ce) biotinylé hydrolysant la molécule de l'ADN, rendant ainsi l'obtention des enzymes de restrictions artificielles basés sur le système streptavidine-biotine envisageable à long terme.

Le succès de la diversification protéique, avec près de 150 mutants dessinés, a tout de suite posé le problème de leur expression à grande échelle (en fermentation de 10 l) compte tenu du fait que cette expérience est longue et coûteuse. Nous avons pu relever ce défi en mettant au point un nouveau système d'expression en volumes réduits (50 ml). En plus de l'avantage du volume réduit, cette méthode intègre une étape raccourcie de purification de la streptavidine. Et ceci, grâce au contact de l'extrait protéique avec la biotine agarose qui résulte dans l'immobilisation de la streptavidine sur le support solide dû à leur affinité. L'avantage de ce petit volume d'expression (50 ml) couplé à un système de purification réduite en une seule étape, est de rendre possible l'expression simultanée d'une trentaine d'isoformes protéiques par jour contre 1 seul à grande échelle. Cette expérience de criblage à débit élevé des métalloenzymes artificielles diversifiées a ainsi permis de tester les performances catalytiques de près de 114 mutants.

Comme toute nouvelle méthode qui se met en place pour la première fois, ce système d'expression à petite échelle a nécessité l'optimisation des niveaux de production pour constituer une bonne méthode de référence de criblage de la diversité protéique. Cette optimisation a abouti à des rendements protéiques suffisamment élevés pour le criblage de ces mutants en termes de performances catalytiques.

Enfin, en ce qui concerne les performances catalytiques des métalloenzymes artificielles, on peut conclure que les études structurales associées à la mutagenèse dirigée et de saturation se sont révélées une approche efficace permettant d'obtenir des excès énantiomériques de 95 % en faveur de l'énantiomère (*R*) avec le catalyseur $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\mathbf{Biot}\text{-}p\text{-}\mathbf{L})\text{Cl}]$ incorporé dans S112Y pour la réduction de *p*-Bromoacétophénone et 84 % en faveur de l'énantiomère (*S*) avec le catalyseur $[\eta^6\text{-}(\text{benzène})\text{Ru}(\mathbf{Biot}\text{-}p\text{-}\mathbf{L})\text{Cl}]$ incorporé dans T114G pour la réduction de 1,2,3,4-Tetrahydro-1-naphtalène. De bons niveaux d'énantiosélectivité ont été trouvés pour les mutants L124V (83% ee), S112AK121F (70% ee), S112AK121Q (65 % ee) criblés avec les complexes ($[\eta^6\text{-}(\text{arène})\text{Ru}(\mathbf{Biot}\text{-}p\text{-}\mathbf{L})\text{Cl}]$, arène = benzène ou *p*-cymène) et testés avec les substrats *p*-Bromoacétophénone et 4-phenyl-2-butanone.

Le point fort du système streptavidine-biotine réside dans son potentiel d'évolution et de variabilité. La dissociation sélectivité-activité présente aussi l'avantage d'envisager plusieurs réactions (oxydation, époxydation, CC couplage) simplement en changeant le résidu organométallique pour les mutants développés. La plupart de ces travaux sont d'ores et déjà en développement en groupe.

REFERENCES

1. Faber, K., *Biotransformations in organic chemistry*. [5th ed.] ed.; Springer-Verlag: New York, 2004.
2. Jacobsen, E. N.; Pfaltz, A.; Yamamoto, A., *Comprehensive asymmetric catalysis*. Springer: Berlin, 1999.
3. Berkessel, R. G., H., Metal-free organic catalysis in asymmetric synthesis. *Wiley-VCH* **2005**.
4. Dalko, P. I.; Moisan, L., In the golden age of organocatalysis. *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, 43, (39), 5138-5175.
5. Kazmaier, U., Amino acids-valuable organocatalysts in carbohydrate synthesis. *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, 44, (23), 2186.
6. Davies, R. R.; Kuang, H.; Qi, D. F.; Mazhary, A.; Mayaan, E.; Distefano, M. D., Artificial metalloenzymes based on protein cavities: Exploring the effect of altering the metal ligand attachment position by site directed mutagenesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1999**, 9, (1), 79-84.
7. Thomas, C. M.; Ward, T. R., Artificial metalloenzymes: proteins as hosts for enantioselective catalysis. *Chemical Society Reviews* **2005**, 34, (4), 337-346.
8. Carey, J. R.; Ma, S. K.; Pfister, T. D.; Garner, D. K.; Kim, H. K.; Abramite, J. A.; Wang, Z.; Guo, Z.; Lu, Y., A site-selective dual anchoring strategy for artificial metalloprotein design. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (35), 10812-3.
9. Krämer, R., Supramolecular Bioinorganic Hybrid Catalysts for enantioselective Transformations *Angewandte Chemistry International Edition* **2005**, 45, 858-860.
10. Stinson, S. C., Chiral pharmaceuticals. *Chemical & Engineering News* **2001**, 79, (40), 79-97.
11. Thayer, A. M., Trial separations. *Chemical & Engineering News* **2005**, 83, (36), 49-53.
12. Noyori, R., Asymmetric catalysis: Science and opportunities (Nobel lecture). *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, 41, (12), 2008-2022.
13. Knowles, W. S., Asymmetric hydrogenations (Nobel lecture). *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, 41, (12), 1999-2007.
14. Sharpless, K. B., Searching for new reactivity (Nobel lecture). *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, 41, (12), 2024-2032.
15. Knowles, W. S.; Vineyard, B. D.; Sabacky, M. J., Catalytic Asymmetric Hydrogenation. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1972**, (1), 10-&.
16. Knowles, W. S.; Sabacky, M. J.; Vineyard, B. D.; Weinkauff, D. J., Asymmetric Hydrogenation with a Complex of Rhodium and a Chiral Bisphosphine. *Journal of the American Chemical Society* **1975**, 97, (9), 2567-2568.
17. Kagan, H. B.; Dang, T. P., Asymmetric Catalytic Reduction with Transition-Metal Complexes .1. Catalytic System of Rhodium(I) with (-)-2,3-O-Isopropylidene-2,3-Dihydroxy-1,4-Bis(Diphenylphosphino)Butane - New Chiral Diphosphine. *Journal of the American Chemical Society* **1972**, 94, (18), 6429-6433.
18. Dang, T. P.; Kagan, H. B., Asymmetric Synthesis of Hydratropic Acid and Amino-Acids by Homogeneous Catalytic Hydrogenation. *Journal of the Chemical Society D-Chemical Communications* **1971**, (10), 481-485.
19. Miyashita, A.; Yasuda, A.; Takaya, H.; Toriumi, K.; Ito, T.; Souchi, T.; Noyori, R., Synthesis of 2,2'-Bis(Diphenylphosphino)-1,1'-Binaphthyl (Binap), an Atropisomeric Chiral Bis(Triaryl)Phosphine, and Its Use in the Rhodium(I)-Catalyzed Asymmetric Hydrogenation

- of Alpha-(Acylamino)Acrylic Acids. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, 102, (27), 7932-7934.
20. Kitamura, M.; Ohkuma, T.; Inoue, S.; Sayo, N.; Kumobayashi, H.; Akutagawa, S.; Ohta, T.; Takaya, H.; Noyori, R., Homogeneous Asymmetric Hydrogenation of Functionalized Ketones. *Journal of the American Chemical Society* **1988**, 110, (2), 629-631.
21. Tadeusiak, E. J., Synthesis of phosphonic analogues of carnitine and gamma-amino-beta-hydroxybutyric acid. *Bioorganic Chemistry* **2004**, 32, (6), 473-482.
22. Ohkuma, T.; Ishii, D.; Takeno, H.; Noyori, R., Asymmetric hydrogenation of amino ketones using chiral RuCl₂(diphosphine)(1,2-diamine) complexes. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, (27), 6510-6511.
23. Noyori, R.; Takaya, H., Binap - an Efficient Chiral Element for Asymmetric Catalysis. *Accounts of Chemical Research* **1990**, 23, (10), 345-350.
24. Noyori, R., Chiral Metal-Complexes as Discriminating Molecular Catalysts. *Science* **1990**, 248, (4960), 1194-1199.
25. Noyori, R.; Hashiguchi, S., Asymmetric transfer hydrogenation catalyzed by chiral ruthenium complexes. *Accounts of Chemical Research* **1997**, 30, (2), 97-102.
26. Campbell, E. J.; Zhou, H. Y.; Nguyen, S. T., The asymmetric Meerwein-Schmidt-Pondorf-Verley reduction of prochiral ketones with isopropanol catalyzed by chiral aluminum catalysts. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2002**, 224, U134-U134.
27. Ohkuma, T.; Koizumi, M.; Doucet, H.; Pham, T.; Kozawa, M.; Murata, K.; Katayama, E.; Yokozawa, T.; Ikariya, T.; Noyori, R., Asymmetric hydrogenation of alkenyl, cyclopropyl, and aryl ketones. RuCl₂(xylbinap)(1,2-diamine) as a precatalyst exhibiting a wide scope. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, (51), 13529-13530.
28. Haack, K. J.; Hashiguchi, S.; Fujii, A.; Ikariya, T.; Noyori, R., The catalyst precursor, catalyst, and intermediate in the Ru-II-promoted asymmetric hydrogen transfer between alcohols and ketones. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1997**, 36, (3), 285-288.
29. Fujii, A.; Hashiguchi, S.; Uematsu, N.; Ikariya, T.; Noyori, R., Ruthenium(II)-catalyzed asymmetric transfer hydrogenation of ketones using a formic acid-triethylamine mixture. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, (10), 2521-2522.
30. Yamakawa, M.; Yamada, I.; Noyori, R., CH/pi attraction: The origin of enantioselectivity in transfer hydrogenation of aromatic carbonyl compounds catalyzed by chiral eta(6)-arene-ruthenium(II) complexes. *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, 40, (15), 2818-2821.
31. Alonso, D. A.; Brandt, P.; Nordin, S. J. M.; Andersson, P. G., Ru(arene)(amino alcohol)-catalyzed transfer hydrogenation of ketones: Mechanism and origin of enantioselectivity. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 121, (41), 9580-9588.
32. Kroutil, W.; Mang, H.; Edegger, K.; Faber, K., Biocatalytic oxidation of primary and secondary alcohols. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2004**, 346, (2-3), 125-142.
33. Mertens, R.; Greiner, L.; van den Ban, E. C. D.; Haaker, H. B. C. M.; Liese, A., Practical applications of hydrogenase I from *Pyrococcus furiosus* for NADPH generation and regeneration. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2003**, 24-5, 39-52.
34. Streu, C.; Meggers, E., Ruthenium-induced allylcarbamate cleavage in living cells. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, (34), 5645-5648.
35. Groger, H.; Chamouleau, F.; Orolagas, N.; Rollmann, C.; Drauz, K.; Hummel, W.; Weckbecker, A.; May, O., Enantioselective reduction of ketones with "Designer cells" at high substrate concentrations: Highly efficient access to functionalized optically active alcohols". *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, (34), 5677-5681.
36. Fox, R. J.; Davis, S. C.; Mundorff, E. C.; Newman, L. M.; Gavrilovic, V.; Ma, S. K.; Chung, L. M.; Ching, C.; Tam, S.; Muley, S.; Grate, J.; Gruber, J.; Whitman, J. C.; Sheldon,

- R. A.; Huisman, G. W., Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution. *Nature Biotechnology* **2007**, *25*, (3), 338-344.
37. Reetz, M. T.; Carballeira, J. D.; Peyralans, J.; Hobenreich, H.; Maichele, A.; Vogel, A., Expanding the substrate scope of enzymes: Combining mutations obtained by CASTing. *Chemistry-a European Journal* **2006**, *12*, (23), 6031-6038.
38. Reetz, M. T.; Bocola, M.; Carballeira, J. D.; Zha, D. X.; Vogel, A., Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: Combinatorial active-site saturation test. *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, *44*, (27), 4192-4196.
39. Zhao, H. M.; Chockalingam, K.; Chen, Z. L., Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, *13*, (2), 104-110.
40. Smith, M., Synthetic DNA and Biology (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1994**, *33*, (12), 1214-1221.
41. Mullis, K. B.; Smith, M., 1993 Nobel-Prizes for Chemistry. *Chemie in Unserer Zeit* **1993**, *27*, (6), 287-293.
42. Urban, A.; Neukirchen, S.; Jaeger, K. E., A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Research* **1997**, *25*, (11), 2227-2228.
43. Ke, S. H.; Madison, E. L., Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method. *Nucleic Acids Research* **1997**, *25*, (16), 3371-3372.
44. Kirsch, R. D.; Joly, E., An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes. *Nucleic Acids Research* **1998**, *26*, (7), 1848-1850.
45. Sarkar, G.; Sommer, S. S., The Megaprimer Method of Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques* **1990**, *8*, (4), 404-407.
46. Zheng, L.; Baumann, U.; Reymond, J. L., An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*, (14), e115.
47. Stratagène *QuickChange^R Site-directed Mutagenesis Kit-Instruction manual*; Stratagene: 2006.
48. Borgford, T. J.; Gray, T. E.; Brand, N. J.; Fersht, A. R., Site-Directed Mutagenesis Reveals Transition-State Stabilization as a General Catalytic Mechanism for Aminoacyl-Transfer Rna-Synthetases. *Biochemistry* **1987**, *26*, (23), 7246-7250.
49. Lau, F. T. K.; Fersht, A. R., Site-Directed Mutagenesis in the Effector Site of Escherichia-Coli Phosphofructokinase. *Protein Engineering* **1987**, *1*, (3), 260-261.
50. Kuang, H.; Davies, R. R.; Distefano, M. D., Modulation of the rate, enantioselectivity, and substrate specificity of semisynthetic transaminases based on lipid binding proteins using site directed mutagenesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1997**, *7*, (15), 2055-2060.
51. Bornscheuer, U. T.; Pohl, M., Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology* **2001**, *5*, (2), 137-143.
52. Reetz, M. T., Combinatorial and Evolution-Based Methods in the Creation of Enantioselective Catalysts. *Angewandte Chemistry International Edition in English* **2001**, *40*, (2), 284-310.
53. Jaeger, K. E.; Eggert, T.; Eipper, A.; Reetz, M. T., Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2001**, *55*, (5), 519-30.
54. Jaeger, K. E.; Reetz, M. T., Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, *4*, (1), 68-73.

55. Reetz, M. T.; Wang, L. W., High-throughput selection system for assessing the activity of epoxide hydrolases. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* **2006**, 9, (4), 295-9.
56. Reetz, M. T., Changing the enantioselectivity of enzymes by directed evolution. *Methods in Enzymology* **2004**, 388, 238-56.
57. Liebeton, K.; Zonta, A.; Schimossek, K.; Nardini, M.; Lang, D.; Dijkstra, B. W.; Reetz, M. T.; Jaeger, K. E., Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chemistry & Biology* **2000**, 7, (9), 709-718.
58. Reetz, M. T.; Wang, L. W.; Bocola, M., Directed Evolution of Enantioselective Enzymes: Iterative Cycles of CASTing for Probing Protein-Sequence Space. *Angewandte Chemistry International Edition English* **2006**, 45, (16), 2494.
59. Arnold, F. H.; Volkov, A. A., Directed evolution of biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* **1999**, 3, (1), 54-59.
60. Reetz, M. T., Combinatorial and evolution-based methods in the creation of enantioselective catalysts. *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, 40, (2), 284-310.
61. Rice, G. C.; Goedel, D. V.; Cachianes, G.; Woronicz, J.; Chen, E. Y.; Williams, S. R.; Leung, D. W., Random Pcr Mutagenesis Screening of Secreted Proteins by Direct Expression in Mammalian-Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, 89, (12), 5467-5471.
62. De Lay, N. R.; Cronan, J. E., Gene-specific random mutagenesis of Escherichia coli in vivo: isolation of temperature-sensitive mutations in the acyl carrier protein of fatty acid synthesis. *Journal of Bacteriology* **2006**, 188, (1), 287-96.
63. Miyazaki, K.; Wintrode, P. L.; Grayling, R. A.; Rubingh, D. N.; Arnold, F. H., Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *Journal of Molecular Biology* **2000**, 297, (4), 1015-1026.
64. Miyazaki, K.; Arnold, F. H., Exploring nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: Rapid improvement of protein function. *Journal of Molecular Evolution* **1999**, 49, (6), 716-720.
65. Wada, M.; Hsu, C. C.; Franke, D.; Mitchell, M.; Heine, A.; Wilson, I.; Wong, C. H., Directed evolution of N-acetylneuraminic acid aldolase to catalyze enantiomeric aldol reactions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, 11, (9), 2091-2098.
66. Stemmer, W. P. C., DNA Shuffling by Random Fragmentation and Reassembly - in-Vitro Recombination for Molecular Evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91, (22), 10747-10751.
67. Pelletier, J. N., A RACHITT for our toolbox. *Nature Biotechnology* **2001**, 19, (4), 314-315.
68. Coco, W. M.; Levinson, W. E.; Crist, M. J.; Hektor, H. J.; Darzins, A.; Pienkos, P. T.; Squires, C. H.; Monticello, D. J., DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nature Biotechnology* **2001**, 19, (4), 354-359.
69. Zhao, H.; Giver, L.; Shao, Z.; Affholter, J. A.; Arnold, F. H., Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nature Biotechnology* **1998**, 16, (3), 258-61.
70. Shao, Z.; Zhao, H.; Giver, L.; Arnold, F. H., Random-priming in vitro recombination: an effective tool for directed evolution. *Nucleic Acids Research* **1998**, 26, (2), 681-3.
71. Reetz, M. T., An overview of high-throughput screening systems for enantioselective enzymatic transformations. *Methods in Molecular Biology* **2003**, 230, 259-82.
72. Li, Z.; Butikofer, L.; Witholt, B., High-throughput measurement of the enantiomeric excess of chiral alcohols by using two enzymes. *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, 43, (13), 1698-1702.

73. Gubitz, G.; Schmid, M. G., Chiral separation by chromatographic and electromigration techniques. A review. *Biopharmaceutic and Drug Disposition* **2001**, *22*, (7-8), 291-336.
74. Cao, L. Q., Immobilised enzymes: science or art? *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, *9*, (2), 217-226.
75. Kiba, N.; Ito, S.; Tachibana, M.; Tani, K.; Koizumi, H., Flow-through chemiluminescence sensor using immobilized oxidases for the selective determination of L-glutamate in a flow-injection system. *Analytical Sciences* **2001**, *17*, (8), 929-933.
76. Adachi, S.; Kobayashi, T., Synthesis of esters by immobilized-lipase-catalyzed condensation reaction of sugars and fatty acids in water-miscible organic solvent. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2005**, *99*, (2), 87-94.
77. Rocha, J. M. S.; Gil, M. H.; Garcia, F. A. P., Optimisation of the enzymatic synthesis of n-octyl oleate with immobilised lipase in the absence of solvents. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **1999**, *74*, (7), 607-612.
78. Arroyo, M.; Moreno, J. M.; Sinisterra, J. V., Immobilization Stabilization on Different Hydroxylic Supports of Lipase from *Candida rugosa*. *Journal of Molecular Catalysis* **1993**, *83*, (1-2), 261-271.
79. Benjamin, S.; Pandey, A., *Candida rugosa* lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast* **1998**, *14*, (12), 1069-1087.
80. Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M., Modulation of the enantioselectivity of *Candida antarctica* B lipase via conformational engineering: kinetic resolution of (+/-)- α -hydroxy-phenylacetic acid derivatives. *Tetrahedron-Asymmetry* **2002**, *13*, (12), 1337-1345.
81. Aoun, S.; Baboulene, M., Regioselective bromohydroxylation of alkenes catalyzed by chloroperoxidase: Advantages of the immobilization of enzyme on talc. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **1998**, *4*, (1-2), 101-109.
82. Carey, J. R.; Berry, S. M.; Pfister, T. D.; Kim, H.; Zhao, X.; Hwang, H. J.; Wang, N. Y.; Abramite, J. A.; Brower, E.; Zhu, J. Z.; Lu, Y., Engineering of metalloproteins and novel biocatalysts using native protein scaffolds. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2003**, *225*, U30-U30.
83. Ward, T. R., Artificial metalloenzymes for enantioselective catalysis based on the noncovalent incorporation of organometallic moieties in a host protein. *Chemistry* **2005**, *11*, (13), 3798-804.
84. Letondor, C.; Ward, T. R., Artificial metalloenzymes for enantioselective catalysis: recent advances. *ChemBiochem* **2006**, *7*, (12), 1845-52.
85. Thomas, C. M.; Ward, T. R., Artificial metalloenzymes: proteins as hosts for enantioselective catalysis. *Chemical Society Reviews* **2005**, *34*, (4), 337-46.
86. Skander, M.; Humbert, N.; Collot, J.; Gradinaru, J.; Klein, G.; Loosli, A.; Sauser, J.; Zocchi, A.; Gilardoni, F.; Ward, T. R., Artificial metalloenzymes: (strept)avidin as host for enantioselective hydrogenation by achiral biotinylated rhodium-diphosphine complexes. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, (44), 14411-8.
87. Letondor, C.; Pordea, A.; Humbert, N.; Ivanova, A.; Mazurek, S.; Novic, M.; Ward, T. R., Artificial transfer hydrogenases based on the biotin-(strept)avidin technology: Fine tuning the selectivity by saturation mutagenesis of the host protein. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, (25), 8320-8.
88. van de Velde, F.; Arends, I. W. C. E.; Sheldon, R. A., Vanadium-catalysed enantioselective sulfoxidations: rational design of biocatalytic and biomimetic systems. *Topics in Catalysis* **2000**, *13*, (3), 259-265.
89. Ohashi, M.; Koshiyama, T.; Ueno, T.; Yanase, M.; Fujii, H.; Watanabe, Y., Preparation of artificial metalloenzymes by insertion of chromium(III) Schiff base complexes

- into apomyoglobin mutants. *Angewandte Chemie-International Edition* **2003**, 42, (9), 1005-1008.
90. Carey, J. R.; Ma, S. K.; Pfister, T. D.; Garner, D. K.; Kim, H. K.; Abramite, J. A.; Wang, Z. L.; Guo, Z. J.; Lu, Y., A site-selective dual anchoring strategy for artificial metalloprotein design. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (35), 10812-10813.
91. Reetz, M. T.; Rentsch, M.; Pletsch, A.; Maywald, M., Towards the directed evolution of hybrid catalysts. *Chimia* **2002**, 56, (12), 721-723.
92. Mahammed, A.; Gross, Z., Albumin-conjugated corrole metal complexes: Extremely simple yet very efficient biomimetic oxidation systems. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (9), 2883-2887.
93. Okrasa, K.; Kazlauskas, R. J., Manganese-substituted carbonic anhydrase as a new peroxidase. *Chemistry-a European Journal* **2006**, 12, (6), 1587-1596.
94. Roelfes, G.; Feringa, B. L., DNA-based asymmetric catalysis. *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, 44, (21), 3230-3232.
95. Roelfes, G.; Boersma, A. J.; Feringa, B. L., Highly enantioselective DNA-based catalysis. *Chemical Communications* **2006**, (6), 635-637.
96. Kaiser, E. T., The 1984 Nobel-Prize in Chemistry. *Science* **1984**, 226, (4679), 1151-1153.
97. Levine, H. L.; Kaiser, E. T., Oxidation of Dihyronicotinamides by Flavopapain. *Journal of the American Chemical Society* **1978**, 100, (24), 7670-7677.
98. Levine, H. L.; Nakagawa, Y.; Kaiser, E. T., Flavopapain: synthesis and properties of semi-synthetic enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1977**, 76, (1), 64-70.
99. Matsumoto, K.; Davis, B. G.; Jones, J. B., Chemically modified "polar patch" mutants of subtilisin in peptide synthesis with remarkably broad substrate acceptance: Designing combinatorial biocatalysts. *Chemistry-a European Journal* **2002**, 8, (18), 4129-4137.
100. Davies, R. R.; Kuang, H.; Qi, D.; Mazhary, A.; Mayaan, E.; Distefano, M. D., Artificial metalloenzymes based on protein cavities: exploring the effect of altering the metal ligand attachment position by site directed mutagenesis. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters* **1999**, 9, (1), 79-84.
101. Wilson, M. E.; Whitesides, G. M., Conversion of a Protein to a Homogeneous Asymmetric Hydrogenation Catalyst by Site-Specific Modification with a Diphosphinerhodium(I) Moiety. *Journal of the American Chemical Society* **1978**, 100, (1), 306-307.
102. Lin, C. C.; Lin, C. W.; Chan, A. S. C., Catalytic hydrogenation of itaconic acid in a biotinylated Pyrphos-rhodium(I) system in a protein cavity. *Tetrahedron-Asymmetry* **1999**, 10, (10), 1887-1893.
103. Gyorgy, P.; Rose, C. S.; Hofmann, K.; Melville, D. B.; du Vigneaud, V., Identity of vitamin H with biotin. *Science (Washington, DC, United States)* **1940**, 92, 609.
104. Attwood, P. V.; Wallace, J. C., Chemical and catalytic mechanisms of carboxyl transfer reactions in biotin-dependent enzymes. *Accounts of Chemical Research* **2002**, 35, (2), 113-120.
105. Jitrapakdee, S.; Wallace, J. C., The biotin enzyme family: Conserved structural motifs and domain rearrangements. *Current Protein & Peptide Science* **2003**, 4, (3), 217-229.
106. Nikolau, B. J.; Ohlrogge, J. B.; Wurtele, E. S., Plant biotin-containing carboxylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2003**, 414, (2), 211-22.
107. Green, N. M., Avidin. *Advanced Protein Chemistry* **1975**, 29, 85-133.
108. Wilchek, M.; Bayer, E. A., Foreword and introduction to the book (strept)avidin-biotin system. *Biomolecular Engineering* **1999**, 16, (1-4), 1-4.

109. Green, N. M., Avidin and streptavidin. *Methods in Enzymology* **1990**, 184, 51-67.
110. Laitinen, O. H.; Hytonen, V. P.; Nordlund, H. R.; Kulomaa, M. S., Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2006**, 63, (24), 2992-3017.
111. Marttila, A. T.; Laitinen, O. H.; Airene, K. J.; Kulik, T.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Kulomaa, M. S., Recombinant NeutraLite Avidin: a non-glycosylated, acidic mutant of chicken avidin that exhibits high affinity for biotin and low non-specific binding properties. *Febs Letters* **2000**, 467, (1), 31-36.
112. Ahlroth, M. K.; Grapputo, A.; Laitinen, O. H.; Kulomaa, M. S., Sequence features and evolutionary mechanisms in the chicken avidin gene family. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, 285, (3), 734-41.
113. Ahlroth, M. K.; Ahlroth, P.; Kulomaa, M. S., Copy-number fluctuation by unequal crossing-over in the chicken avidin gene family. *Biochemical and Biophysical. Research Communications* **2001**, 288, (2), 400-6.
114. Bayer, E. A.; Ben-Hur, H.; Wilchek, M., Isolation and properties of streptavidin. *Methods in Enzymology* **1990**, 184, 80-9.
115. Argarana, C. E.; Kuntz, I. D.; Birken, S.; Axel, R.; Cantor, C. R., Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene. *Nucleic Acids Research* **1986**, 14, (4), 1871-82.
116. Sano, T.; Pandori, M. W.; Chen, X. M.; Smith, C. L.; Cantor, C. R., Recombinant Core Streptavidins - a Minimum-Sized Core Streptavidin Has Enhanced Structural Stability and Higher Accessibility to Biotinylated Macromolecules. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, 270, (47), 28204-28209.
117. Sano, T.; Vajda, S.; Smith, C. L.; Cantor, C. R., Engineering subunit association of multisubunit proteins: A dimeric streptavidin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, 94, (12), 6153-6158.
118. Pugliese, L.; Coda, A.; Malcovati, M.; Bolognesi, M., Three-dimensional structure of the tetragonal crystal form of egg-white avidin in its functional complex with biotin at 2.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **1993**, 231, (3), 698-710.
119. Stayton, P. S.; Klumb, L. A.; Chu, V.; Letrong, I.; Freitag, S.; Stenkamp, R., Mechanistic studies of the high-affinity streptavidin-biotin reaction coordinate. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **1997**, 213, 35-Biot.
120. Ostergaard, S.; Hansen, P. H.; Olsen, M.; Holm, A., Novel avidin and streptavidin binding sequences found in synthetic peptide libraries. *FEBS Letters* **1995**, 362, (3), 306-8.
121. Qureshi, M. H.; Yeung, J. C.; Wu, S. C.; Wong, S. L., Development and characterization of a series of soluble tetrameric and monomeric streptavidin muteins with differential biotin binding affinities. *Journal of Biology and Chemistry* **2001**, 276, (49), 46422-8.
122. Chu, V.; Freitag, S.; Le Trong, I.; Stenkamp, R. E.; Stayton, P. S., Thermodynamic and structural consequences of flexible loop deletion by circular permutation in the streptavidin-biotin system. *Protein Science* **1998**, 7, (4), 848-59.
123. Chilkoti, A.; Stayton, P. S., Molecular Origins of the Slow Streptavidin-Biotin Dissociation Kinetics. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, (43), 10622-8.
124. Pazy, Y.; Kulik, T.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Livnah, O., Ligand exchange between proteins - Exchange of biotin and biotin derivatives between avidin and streptavidin. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, (34), 30892-30900.
125. Diamandis, E. P.; Christopoulos, T. K., The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clinical Chemistry* **1991**, 37, (5), 625-36.

126. Qureshi, M. H.; Wong, S. L., Design, production, and characterization of a monomeric streptavidin and its application for affinity purification of biotinylated proteins. *Protein Expression and Purification* **2002**, 25, (3), 409-15.
127. Morag, E.; Bayer, E. A.; Wilchek, M., Reversibility of biotin-binding by selective modification of tyrosine in avidin. *Biochemical Journal* **1996**, 316, 193-199.
128. Morag, E.; Bayer, E. A.; Wilchek, M., Immobilized nitro-avidin and nitro-streptavidin as reusable affinity matrices for application in avidin-biotin technology. *Analytical Biochemistry* **1996**, 243, (2), 257-263.
129. Gallizia, A.; de Lalla, C.; Nardone, E.; Santambrogio, P.; Brandazza, A.; Sidoli, A.; Arosio, P., Production of a soluble and functional recombinant streptavidin in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **1998**, 14, (2), 192-6.
130. Humbert, N. ; Approche combinatoire pour la production et la purification de la streptavidine en vue l'obtention de métalloenzyme artificielles. *Thèse de doctorat* University of Neuchâtel, Neuchâtel, 2005.
131. Humbert, N.; Zocchi, A.; Ward, T. R., Electrophoretic behavior of streptavidin complexed to a biotinylated probe: A functional screening assay for biotin-binding proteins. *Electrophoresis* **2005**, 26, (1), 47-52.
132. Kuhn, B.; Kollman, P. A., Binding of a diverse set of ligands to avidin and streptavidin: an accurate quantitative prediction of their relative affinities by a combination of molecular mechanics and continuum solvent models. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, (20), 3786-91.
133. Kada, G.; Falk, H.; Gruber, H. J., Accurate measurement of avidin and streptavidin in crude biofluids with a new, optimized biotin-fluorescein conjugate. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1999**, 1427, (1), 33-43.
134. Dalby, P. A., Optimising enzyme function by directed evolution. *Current Opinion in Structural Biology* **2003**, 13, (4), 500-505.
135. Skander, M.; Malan, C.; Ivanova, A.; Ward, T. R., Chemical optimization of artificial metalloenzymes based on the biotin-avidin technology: (S)-selective and solvent-tolerant hydrogenation catalysts via the introduction of chiral amino acid spacers. *Chemical Communications (Cambridge)* **2005**, (38), 4815-7.
136. Thomas, C. M.; Letondor, C.; Humbert, N.; Ward, T. R., Aqueous oxidation of alcohols catalyzed by artificial metalloenzymes based on the biotin-avidin technology. *Journal of Organometallic Chemistry* **2005**, 690, (20), 4488-4491.
137. Letondor, C.; Humbert, N.; Ward, T. R., Artificial metalloenzymes based on biotin-avidin technology for the enantioselective reduction of ketones by transfer hydrogenation. *Proceedings of the National Academy of Science of the U S A* **2005**, 102, (13), 4683-7.
138. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J., Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry* **1998**, 19, (14), 1639-1662.
139. Goodsell, D. S.; Morris, G. M.; Olson, A. J., Automated docking of flexible ligands: Applications of AutoDock. *Journal of Molecular Recognition* **1996**, 9, (1), 1-5.
140. Letondor, C.; Création de Métalloenzymes Artificielles Basées sur la technologie Biotine-Avidine pour la Réduction Asymétrique de Dérivés Carbonylés par transfert Hydrogénéant. *Thèse de doctorat* University of Neuchâtel, Neuchâtel, 2006.
141. Letondor, C.; Pordea, A.; Humbert, N.; Ivanova, A.; Mazurek, S.; Novic, M.; Ward, T. R., Artificial transfer hydrogenases based on the biotin-(strept)avidin technology: Fine tuning the selectivity by saturation mutagenesis of the host protein. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, (25), 8320-8328.
142. Morley, K. L.; Kazlauskas, R. J., Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends in Biotechnology* **2005**, 23, (5), 231-7.

143. Horsman, G. P.; Liu, A. M.; Henke, E.; Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J., Mutations in Distant Residues Moderately Increase the Enantioselectivity of *Pseudomonas fluorescens* Esterase towards Methyl 3-Bromo-2-methylpropanoate and Ethyl 3-Phenylbutyrate. *Chemistry a European Journal* **2003**, 9, (9), 1933-9.
144. Loo, T. W.; Clarke, D. M., Functional Consequences of Glycine Mutations in the Predicted Cytoplasmic Loops of P-Glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269, (10), 7243-7248.
145. SenGupta, D. J.; Lum, P. Y.; Lai, Y. R.; Shubochkina, E.; Bakken, A. H.; Schneider, G.; Unadkat, J. D., A single glycine mutation in the equilibrative nucleoside transporter gene, hENT1, alters nucleoside transport activity and sensitivity to nitrobenzylthioinosine. *Biochemistry* **2002**, 41, (5), 1512-1519.
146. Ferguson, N.; Pires, J. R.; Toepert, F.; Johnson, C. M.; Pan, Y. P.; Volkmer-Engert, R.; Schneider-Mergener, J.; Daggett, V.; Oschkinat, H.; Fersht, A., Using flexible loop mimetics to extend Phi-value analysis to secondary structure interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, 98, (23), 13008-13013.
147. Sambrook, J.; W. Russell, D., *Molecular Cloning a laboratory manual*. 3-rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001; Vol. 2.
148. Petrounia, I. P.; Arnold, F. H., Designed evolution of enzymatic properties. *Current Opinion in Biotechnology* **2000**, 11, (4), 325-330.
149. Novagene, *pET system manual*. 10th ed.; 2003.
150. Reetz, M. T.; Wilensek, S.; Zha, D.; Jaeger, K. E., Directed Evolution of an Enantioselective Enzyme through Combinatorial Multiple-Cassette Mutagenesis. *Angewandte Chemistry International Edition in English* **2001**, 40, (19), 3589-3591.
151. Kovacic, R. T.; Welch, J. T.; Franklin, S. J., Sequence-selective DNA cleavage by a chimeric metallopeptide. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (22), 6656-6662.
152. Carrio, M. M.; Villaverde, A., Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *Febs Letters* **2001**, 489, (1), 29-33.
153. Tsumoto, K.; Ejima, D.; Kumagai, I.; Arakawa, T., Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification* **2003**, 28, (1), 1-8.
154. Singh, S. M.; Panda, A. K., Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2005**, 99, (4), 303-310.
155. Sambrook, J.; Russel, D. W., *Molecular cloning a laboratory manual*. 3-rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001; Vol. 3.
156. Studier, F. W., Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification* **2005**, 41, (1), 207-234.
157. Grossman, T. H.; Kawasaki, E. S.; Punreddy, S. R.; Osburne, M. S., Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene* **1998**, 209, (1-2), 95-103.
158. Shockman, G. D.; Daneo-Moore, L.; Kariyama, R.; Massidda, O., Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis. *Microbial Drug Resistance* **1996**, 2, (1), 95-8.
159. Sambongi, Y.; Uchiyama, S.; Kobayashi, Y.; Igarashi, Y.; Hasegawa, J., Cytochrome c from a thermophilic bacterium has provided insights into the mechanisms of protein maturation, folding, and stability. *European Journal of Biochemistry* **2002**, 269, (14), 3355-3361.

Liste des figures et des tableaux

A : Figures

Figure 1.1. Prochiralité des cétones

Figure 1.2. Les énantiomères du propoxyphène

Figure 1.3. Obtention de la (*S*)-DOPA par le (*R*)-CAMP et le (*R, R*)-DIPAMP

Figure 1.4. Définition de l'excès énantiomérique

Figure 1.5. Hydrogénation de l'acide N- α -acétamidocinnamique avec le DIOP

Figure 1.6. Structure de (*S*) et (*R*) BINAP

Figure 1.7. Hydrogénation de l'acétophénone par le complexe BINAP/diamine

Figure 1.8. Principe général de transfert hydrogénéant

Figure 1.9. Transfert hydrogénéant des cétones par des complexes de Ruthénium (II) en tabouret de Piano

Figure 1.10. Etats de transition impliqués dans le mécanisme énantiodiscriminatif des cétones aromatiques

Figure 1.11. Réduction énantiosélective des cétones par des alcools déshydrogénases

Figure 1.12. Recyclage du cofacteur des alcools déshydrogénases

Figure 1.13. Hydrogénation asymétrique par des microorganismes

Figure 1.14. Etapes dans la mutagenèse dirigée

Figure 1.15. Résolution cinétique d'ester d'acide aminé à l'aide de Cuivre (II) accroché dans l'« ALBP »

Figure 1.16. Hydrogénation catalytique de l'acide N- α -acétamidoacrylique par un complexe de Rhodium (Rh) inséré dans l'avidine

Figure 1.17. Création de métalloenzymes artificielles à la base de la myoglobine

Figure 1.18. Structure de la biotine

Figure 1.19. Représentation des liaisons hydrogènes dans la streptavidine

Figure 2.1. Séquence de la streptavidine mature

Figure 2.2. Structure de HABA

Figure 2.3. Structure de la B₄F

Figure 2.4. Courbe de titrage permettant la quantification de la streptavidine en microplaques

Figure 3.1 : Distances moyennes (C α)-Ru pour le monomère A avec le catalyseur ([η^6 -(*p*-cymène) Ru (**Biot-*p*-L**)H]).

Figure 3.2: Visualisation des simulations « docking » entre la streptavidine et le [η^6 -(*p*-cymène)Ru (**Biot-*p*-L**)H]

Figure 3.3: Co-cristallisation de S112K et le [η^6 -(benzène)Ru(**Biot-*p*-L**)H]

Figure 3.4 Résultats de la mutagenèse de saturation S112X (64 clones)

Figure 3.5: Gel d'agarose TBE 1%. Criblage du plasmide N118A par la mutation silencieuse KpnI

Figure 3.6. Gel d'agarose TBE 1%. Amplifications du gène de la streptavidine / T114G à l'échelle de la colonie (de 1 à 10)

Figure 3.7. Gel d'agarose TBE 1 %. Criblage par Kpn I des dix colonies streptavidine/ T114G

Figure 3.8. Principe de « Designed Evolution »

Figure 3.9. Gel d'agarose 0.7 % TBE. Amplifications « Designed Evolution »

Figure 3.10: Gel d'agarose TBE 1%. Criblage par ScaI des amplifications mutagènes

Figure 3.11. Alignement entre le gène de la streptavidine type sauvage et la séquence du plasmide S112KK121Q

Figure 3.12. Carte de restriction de gène de la streptavidine « redesignée »

Figure 3.13. Alignement entre le gène de la streptavidine « redesignée » et le gène de la streptavidine type sauvage

Figure 3.14. Gel d'agarose TBE 1%. PCR mutagène apportant le site de restriction Avr II

Figure 3.15. Gel d'agarose TBE 1%. Amplifications du gène de la streptavidine après PCR mutagène « Avr II »

Figure 3.16. Gel d'agarose TBE 1%. Criblage de colonie /1/ par Avr II

Figure 3.17. Gel d'agarose TBE 1%. Vérification de l'insertion des mutations AvrII, SunI, MunI

Figure 3.18. Principe d'une enzyme de restriction artificielle, basée sur la technologie streptavidine biotine

Figure 3.19. Principe de la PCR en vue l'insertion de la séquence chimérique dans le gène de la streptavidine

Figure 3.20. Gel d'agarose 1 % TAE: Amplification de la streptavidine chimérique

Figure 3.21. Profil de croissance de *E. coli* exprimant la streptavidine type sauvage en milieu isotopique

Figure 3.22. Gel SDS-PAGE de l'expression de la streptavidine ^2H , ^{15}N

Figure 3.23. Gel SDS-PAGE de l'expression de T114G

Figure 3.24. Gel SDS-PAGE de l'expression N118A

Figure 3.25. Comparaison des gels SDS-B₄F (A) et SDS-PAGE (B)

Figure 3.26. Gels SDS-B₄F .Purification des protéines solubilisées par 2-imminobiotine

Figure 3.27. « ESI-MS » de la streptavidine type sauvage (^2H , ^{15}N).

Figure 3.28. Titrage indirect de la streptavidine type sauvage par exclusion de HABA par la biotine

Figure 3.29. Titrage direct de la streptavidine par « quenching » de la fluorescence de la B₄F dans les sites actifs de la streptavidine

Figure 3.30. Rendements de production de la streptavidine recombinante à grande échelle

Figure 3.31. Gel SDS-B₄F des mutants de la streptavidine exprimés en 10 ml

Figure 3.32. Gel SDS-B₄F des mutants de la streptavidine exprimés en 50 ml

Figure 3.33. Criblage des milieux connus pour l'expression de protéines recombinantes

Figure 3.34. Criblage des milieux commerciaux connus pour l'expression des protéines recombinantes

Figure 3.35. Effet de la température sur le rendement de production de la streptavidine à petite échelle

Figure 3.36A. Gel SDS-B₄F : Première et deuxième extraction de la streptavidine sur trois expressions différentes (a, b et c)

Figure 3.36B. Gel SDS-B₄F : Première, deuxième, troisième et quatrième extraction sur deux expressions différentes

Figure 3.37. Transférabilité de volume dans TP (A) et dans NZYM (B)

Figure 3.38. Principe d'une métalloenzyme, immobilisée sur biotine agarose

Figure 3.39. Niveaux de production pour les protéines exprimées à petite échelle

Figure 3.39A. Niveaux d'expression K121X

Figure 3.39B. Niveaux d'expression L124X

Figure 3.39C. Niveaux d'expression S112AK121X

Figure 3.39D. Niveaux d'expression S112KK121X

Figure 3.39E. Niveaux d'expression S112AL124X

Figure 3.39F. Niveaux d'expression S112KL124X

Figure 3.40. Tendances énantiosélectives [η^n -(C_nR_n) M (Biot-*q*-L) Cl] incorporés dans S112X pour les substrats 2a, 2b, 2c (voir la figure): n=5 et M=Ir, Rh, n=6 et M=Ru

Figure 3.41. Tendances énantiosélectives S121X, L124X, S112AK121X, S112KK121X,

S112AL124X, S112KL124X avec les catalyseurs [η^6 -(*p*-cymène)Ru(Biot-*p*-L)Cl] et

[η^6 -(benzène)Ru(Biot-*p*-L)Cl] pour les substrats *p*-Bromoacétophénone et 4-phényl-2-butanone

B : TABLEAUX

Tableau 1.1. Avantages et désavantages de la catalyse homogène et enzymatique

Tableau 2.1. Probabilités d'obtention des différents acides aminés par les différentes stratégies de mutagenèse de saturation

Tableau 2.2. Amorces pour la saturation S112X (amorces dégénérées) et amorces spécifiques

Tableau 2.3. Amorces pour l'exploration de la boucle 7-8

Tableau 2.4. Amorces pour la saturation K121X.

Tableau 2.5. Amorces pour la saturation L124X.

Tableau 2.6. Amorces pour le « redesign » du gène de la streptavidine

Tableau 2.7. Amorces pour la streptavidine chimérique

Tableau 2.8. Amorces pour l'amplification du gène de la streptavidine

Tableau 2.9. Mélange réactionnel pour les amplifications de type mutagenèse dirigée

Tableau 2.10. Conditions d'amplification de la streptavidine à l'échelle de la colonie

Tableau 2.11. Conditions d'amplification de la streptavidine à l'échelle du plasmide

Tableau 2.12. Conditions de ligation de la PCR de la streptavidine chimérique

Tableau 2.13. Programme PCR pour toutes les amplifications de type mutagenèse dirigée

Tableau 2.14. Programme PCR pour l'amplification du gène de la streptavidine cloné dans le pET11b

Tableau 2.15. Compositions des solutions pour la purification de la streptavidine

Tableau 2.16. Quantités de B₄F pour le titrage en microplaques

Tableau 2.17. Quantité de protéine pour le titrage en microplaques

Tableau 2.18. Détermination de la concentration de la streptavidine en extrait

Tableau 3.1 : Résultats du séquençage de 14 plasmides représentant les plasmides (K121X, L124X, S112AK121X, S112KK121X, S112AL124X, S112KL124X)

Tableau 3.2 : Comparaison du système de production en 10 l et le système de production en 50 ml