



**HAL**  
open science

## **Diels-alderases artificielles au service de la chimie verte**

Wadih Ghattas, Jean-Pierre Mahy, Rémy Ricoux, A. Jalila Simaan, Marius Réglie

► **To cite this version:**

Wadih Ghattas, Jean-Pierre Mahy, Rémy Ricoux, A. Jalila Simaan, Marius Réglie. Diels-alderases artificielles au service de la chimie verte. Techniques de l'Ingénieur, 2021, <10.51257/a-v1-in404>. <hal-03457927>

**HAL Id: hal-03457927**

**<https://hal.science/hal-03457927v1>**

Submitted on 18 Nov 2024

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

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



HAL Authorization

# Diels-alderases artificielles au service de la chimie verte

par **Wadih GHATTAS**

Chargé de recherche au CNRS (Institut de Chimie Moléculaire et des matériaux d'Orsay UMR 8182, Université Paris Saclay, Orsay)

**Jean-Pierre MAHY**

Professeur (Institut de Chimie Moléculaire et des matériaux d'Orsay UMR 8182, Université Paris Saclay, Orsay)

**Rémy RICOUX**

Ingénieur de recherche au CNRS (Institut de Chimie Moléculaire et des matériaux d'Orsay UMR 8182, Université Paris Saclay, Orsay)

**A. Jalila SIMAAN**

Directrice de recherche au CNRS (Institut des Sciences Moléculaires de Marseille UMR7313, Aix Marseille Univ, Centrale Marseille, Marseille)

et **Marius RÉGLIER**

Directeur de recherche émérite au CNRS (Institut des Sciences Moléculaires de Marseille UMR7313, Aix Marseille Univ, Centrale Marseille, Marseille)

France

Pour faire face aux conséquences de la cause anthropique du changement climatique, la chimie se voit contrainte de développer des procédés plus respectueux de l'environnement. Avec des usines cellulaires comme les micro-organismes, la biologie de synthèse s'inscrit dans cette perspective. En effet, la biologie de synthèse qui combine le pouvoir de régénération des micro-organismes avec le potentiel synthétique de leurs voies métaboliques est l'application des principes du développement durable au monde de la chimie. Bien que de nouvelles voies métaboliques soient découvertes régulièrement, l'utilisation industrielle de la chimie du vivant reste limitée à quelques grandes réactions. En particulier, les réactions de formation de liaisons C-C, pour laquelle la chimie de synthèse offre de très nombreuses variantes, sont peu développées en biocatalyse. Face à ce constat, un des défis de la chimie du XXI<sup>e</sup> siècle est d'enrichir le champ de la biocatalyse en rendant biocompatibles des réactions qui ne le sont pas (ou peu) actuellement.

Les enzymes artificielles provenant d'enzymes dont l'activité a été modifiée et/ou redirigée, ou d'enzymes créées *de novo*, sont des outils de choix pour cette nouvelle ère de la chimie. Le développement d'enzymes artificielles pour le bénéfice de la chimie fine va de pair avec des progrès spectaculaires dans des domaines variés de la biocatalyse, tels que l'immobilisation d'enzymes sur des surfaces pour conduire à des biocatalyseurs supportés, les techniques d'évolution dirigée, l'ingénierie des voies métaboliques, la catalyse *in cellulo/in vivo* etc. Ces dernières années, un nombre croissant d'enzymes artificielles ont été conçues, dont certaines qui catalysent une réaction de Diels-Alder (DA). Celles-ci ont fait l'objet d'une attention particulière car, jusqu'à la fin du XX<sup>e</sup> siècle, les réactions de DA étaient considérées comme appartenant au seul domaine de la chimie et leur introduction en biocatalyse représentait un défi majeur à relever. Après une introduction générale sur la biocatalyse et les développements récents de son utilisation à l'échelle industrielle, la réaction de Diels-Alder est

présentée ainsi que ses nombreuses applications en synthèse. La partie centrale de l'article s'oriente alors vers la découverte d'enzymes capables de catalyser la réaction de Diels-Alder dans les systèmes vivants pour se focaliser ensuite sur le développement de métalloenzymes artificielles capables de catalyser cette réaction. S'ensuit alors une discussion sur les avantages et les inconvénients des différents systèmes pour conclure sur les perspectives qu'ils offrent.

## Points clés

**Domaine :** biocatalyse

**Degré de diffusion de la technologie :** émergence

**Technologies impliquées :** biotechnologie, chimie bioorthogonale, catalyse, modélisation moléculaire

**Domaines d'application :** synthèse chimique

**Principaux acteurs français :**

- Pôles de compétitivité : pôle TERRALIA-PASS

- Centres de compétence : Les deux équipes auteurs de cet article, l'équipe de M. Salmain Sorbonne Université.

- Industriels : Tout industriel qui s'appuie sur la biocatalyse

**Autres acteurs dans le monde :** l'équipe de G. Roelfes, université de Groningen, Pays-Bas ; l'équipe de D. Baker, université de Washington, États-Unis ; l'équipe de P. C. Kamer, université de St. Andrews, Royaume-Uni ; et l'équipe de T. Hayashi, université de Osaka, Japon.

**Contact :** wadih.ghattas@universite-paris-saclay.fr et jalila.simaan@univ-amu.fr

Groningen  
-6

## 1. Biocatalyse

Dans un contexte de développement d'une chimie verte, c'est-à-dire d'une « chimie qui a pour but de concevoir et de développer des produits et des procédés chimiques permettant de réduire ou d'éliminer l'utilisation et la synthèse de substances dangereuses » [1], la biocatalyse s'est imposée sur ces vingt dernières années comme une alternative incontournable à la chimie classique [2] [3] [4] [5] [6] [7]. En effet, la biocatalyse intervient dans de nombreux procédés industriels dans les domaines de la chimie dite de commodité, comme par exemple la production de l'acrylamide par hydrolyse de l'acrylonitrile catalysée par la nitrile hydratase (procédé Nitto 30 000 t.an<sup>-1</sup>) [8] ou encore la production de diacides à longue chaîne par oxydation d'acides gras par des cytochromes P450 (Chinaby Cathay Biotech, 40 000 t.an<sup>-1</sup>) [9] [10]. Avec des tonnages plus modestes, la biocatalyse est également à la base de très nombreux procédés en chimie fine pour la pharmacie et l'industrie des arômes et des parfums. Ce dernier aspect de la biocatalyse industrielle a fait l'objet de la revue de T. Bornscheuer ~~et al.~~ [2].

Cet essor impressionnant de la biocatalyse à l'échelle industrielle est en partie dû à la nécessité de faire évoluer nos procédés chimiques classiques vers une chimie durable, mais surtout à l'apparition de nouveaux concepts fondamentaux et de techniques d'analyse de plus en plus performantes. En effet, la biocatalyse a bénéficié de la découverte de nouvelles enzymes grâce au séquençage des génomes, aux criblages à haut débit des activités enzymatiques, à l'accès aux gènes synthétiques, aux techniques de clonage pour la conception

9/

. an<sup>-1</sup>

et de ses collaborateurs

rationnelle et l'évolution dirigée d'activités enzymatiques. Avec ces nouveaux aspects de la biologie de synthèse, J. Keasling et ses collaborateurs ont réussi à reprogrammer par ingénierie métabolique une souche de levure pour lui faire synthétiser l'artémisinine, un antimalarique naturel isolé de la plante *Artemisia annua* [11] [12] [13]. Cette étude fondamentale a mené à la mise au point d'un procédé biocatalytique de fabrication de l'artémisinine par la société Sanofi-Avantis. Installée depuis 2013 à Gareggio (Italie), l'usine produit environ 50 t/an d'artémisinine.

Dans une perspective d'accroître et de diversifier le potentiel des activités enzymatiques du vivant [14], une nouvelle approche a émergé au début des années 2000. Il s'agit du domaine des enzymes artificielles [15] dont l'objectif est d'utiliser le potentiel du vivant pour introduire *ex nihilo* des activités enzymatiques copiées sur des réactions de la chimie classique. Focalisée sur la réaction de Diels-Alder, cette revue se rapporte à cette nouvelle perspective en biocatalyse.

## 2. Réaction de cycloaddition de Diels-Alder

La cycloaddition de Diels-Alder (DA) est une réaction emblématique qui a marqué la chimie de synthèse [16] [17]. Son impact en biologie est aussi important, car elle est devenue un outil efficace pour la modification chimique sélective des protéines dans l'étude de leurs fonctions *in vitro* et *in vivo* [18].

La réaction n'impliquant que des dérivés carbonés (homo-DA), (figure 1) conduit à la formation d'un dérivé cyclohexénique substitué. Une de ses variantes intéressante (hétéro-DA) (figure 1) est la formation de composés hétérocycliques par cycloaddition de diènes et diénophiles qui contiennent au moins un hétéroatome.

Le principal intérêt synthétique de la réaction de DA est sa capacité à créer, en une seule étape, 2 liaisons C-C, ainsi que 4 centres stéréogéniques dont les configurations relatives découlent de la stéréochimie (*E* vs *Z*) des précurseurs et de la géométrie (*exo* vs *endo*) de l'état de transition (ET). La réaction de DA entre dans la catégorie des réactions péri-cycliques thermiques concertées entre les 4 électrons  $\pi$  du diène et les 2 électrons  $\pi$  du diénophile. Sa régio- et sa stéréosélectivité sont régies par les règles de Woodward-Hoffmann qui impliquent la conservation de la symétrie des orbitales frontières HO (**Haute Occupée**) et BV (**Basse Vacante**) telles que représentée sur les figures 2b et 2c [19].

Dans les réactions de DA dites « normales » ou à demande électronique normale, *i. e.* impliquant un diénophile substitué par un **groupement attracteur d'électrons** (EWG, Z) et un diène portant un **groupement donneur d'électrons** (EDG, X), la régio- et la stéréosélectivité sont contrôlées par une interaction suprafaciale des deux partenaires avec le recouvrement de

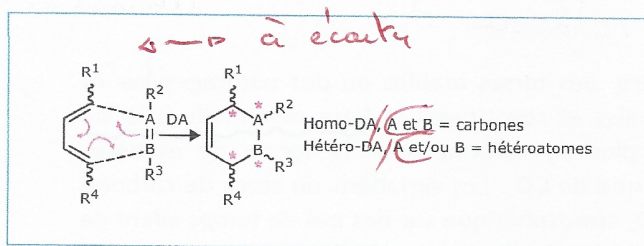


Figure 1 – Réaction de Diels-Alder

. am<sup>-1</sup> h

⚡

⚡  
y/

i/

augmente taille de la figure

⋮  
⋮

1 l'HO du diène avec la BV du diénophile. La régiosélectivité, *ortho vs. méta*, est contrôlée par le recouvrement maximal entre les orbitales atomiques affectées du plus grand coefficient de l'HO et de la BV (figures 2a et 2c). [20] Pour l'homo du diène, le plus grand coefficient étant celui de l'orbitale localisée sur le carbone C<sub>γ</sub>, et pour la BV du diénophile celui de l'orbitale localisée sur l'atome C<sub>β</sub>, c'est la formation de l'ortho-adduit qui est favorisée. Pour l'ortho-adduit, le stéréoisomère *endo* est cinétiquement favorisé en raison d'interactions secondaires favorables qui stabilisent un état de transition *endo* (figure 2c).

12 Les réactions de DA à demande électronique normale nécessitent souvent des températures élevées. Plusieurs approches

91 - 3

augmenta taille de tous les schémas de cette figure

é/

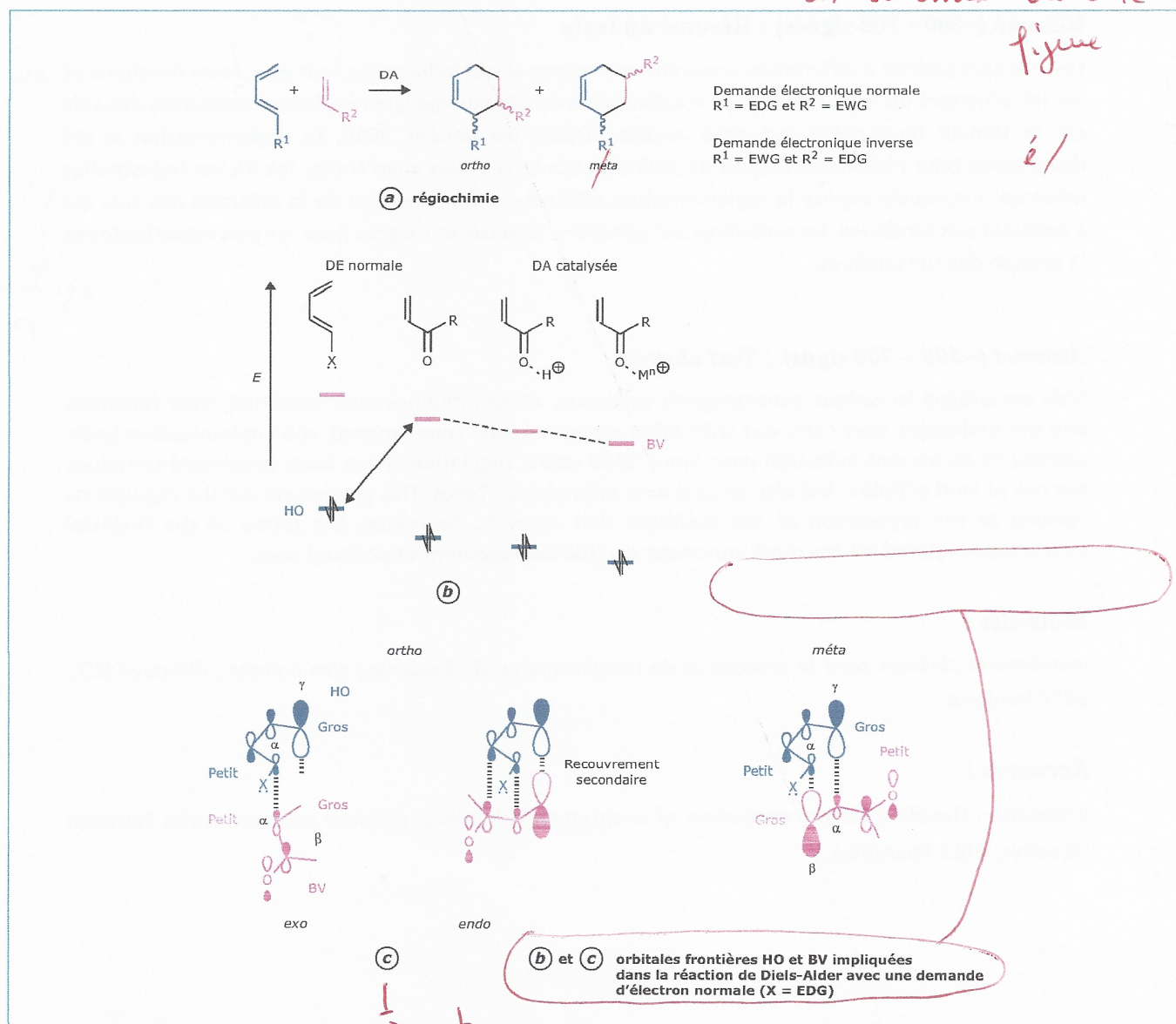


Figure 2 - Réaction de Diels-Alder

à centier

1 ont été développées pour tenter d'abaisser l'énergie d'activation  
 2 et accélérer la réaction. Notamment, les acides de Brønsted ou  
 3 de Lewis, qui diminuent l'énergie de la BV du diénophile, ont  
 4 été largement utilisés dans les réactions de DA catalysées  
 5 (figure 2b) [21]. Les effets électrostatiques ont également été  
 6 retenus dans une approche organocatalytique [22]. En solu-  
 7 tion aqueuse, l'accélération des réactions DA par confinement  
 8 hydrophobe [23] a été obtenue dans les zéolites [24] ou à  
 9 l'aide de molécules macrocycliques telles que les cyclodex-  
 10 trines, [25] les calixarènes [26] et les cucurbituriles [27].

11 Les réactions DA ont également fait l'objet d'importants  
 12 développements en synthèse asymétrique avec l'utilisation  
 13 d'auxiliaires chiraux sur les réactifs ou de ligands chiraux dans  
 14 les réactions de DA métallo-catalysées, [28]. Dans ce contexte,  
 15 en ancrant un cofacteur métallique respectivement sur l'ARN,  
 16 l'ADN et des G-quadruplexes d'ADN, Jäschke [29] et Feringa et  
 17 Roelfs [30] et [27] [31]) ont introduit le concept d'ARN/ADN-  
 18 zymes qui a conduit au développement de catalyseurs efficaces  
 19 dans les réactions énantiosélectives de DA [32] [33] [34].

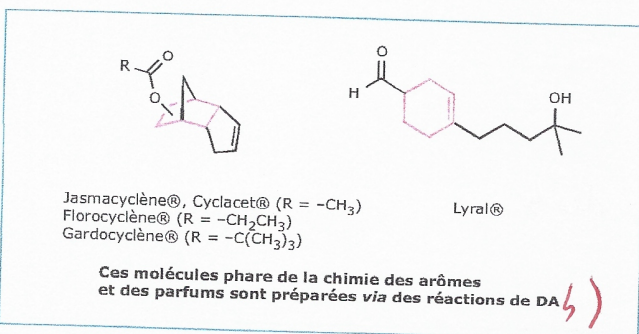
20 **Réaction de Diels-Alder :**

21 une cycloaddition [4 + 2] d'un diène conjugué et d'un alcène  
 22 (diénophile).

23 **2.1 Applications industrielles**

24 La réaction de DA permet la synthèse d'une variété de com-  
 25 posés organiques d'origine naturelle [16]. La mise en œuvre  
 26 de cette réaction pour la production à l'échelle industrielle est  
 27 la preuve de sa robustesse et son efficacité [35].

28 La réaction de DA est largement utilisée dans l'industrie des  
 29 arômes et des parfums [36]. En effet, le cyclopentadiène et le  
 30 1,3-butadiène sont les précurseurs d'une large gamme de subs-  
 31 tances volatiles telles que le jasmacyclène, le florocyclène, le  
 32 gardocyclène et le lyral qui sont préparés à l'échelle de plu-  
 33 sieurs tonnes chaque année par des processus qui impliquent  
 34 une réaction de DA (figure 3). Ainsi, la réaction de DA est  
 35 largement utilisée pour l'élaboration de fragrances dans les  
 36 savons, les produits d'hygiène, les préparations cosmétiques,  
 37 les assainisseurs d'air, les détergents textiles et les produits de  
 38 nettoyage [37]. Étant donné que la perception de l'odeur et  
 39 de l'arôme est un phénomène subjectif, la disponibilité d'une  
 40 large gamme de parfums abordables avec une longue durée de  
 41 conservation est souhaitable. La réaction de DA semble être  
 42 bien adaptée pour poursuivre ces objectifs, car elle permet la  
 43 **construction efficace de structures cycliques à six chaî-**  
 44 **çons** avec divers profils olfactifs [17].



51 **Figure 3 - Structure du jasmacyclène, du florocyclène,**  
 52 **du gardocyclène et du lyral**

Handwritten notes in red ink:

- 1, 4, 5
- 9/ 5
- 9/ 5 et les auteurs de
- 4/

Handwritten note in black ink:

n'est-il pas interdit depuis 2017 dans les cosmétiques ?

Handwritten note in red ink:

0 4

Handwritten note in red ink:

augmenter taille figure

Handwritten note in red ink:

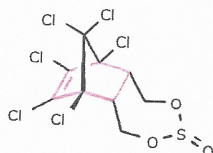
non bold

## INNOVATION

1 De nombreuses substances olfactives ont ainsi été préparées  
2 par la réaction d'un diène – souvent dérivé du cyclopentadiène,  
3 du butadiène ou du cyclohexadiène – avec un dérivé acrylique.  
4 Ces matières premières disponibles en grande quantité et à  
5 bas prix sont compatibles avec les directives de l'industrie des  
6 arômes et des parfums. Les composés sont obtenus sous  
7 forme d'un mélange de diastéréoisomères et/ou de régiolo-  
8 mères et sont habituellement purifiés par distillation. La distil-  
9 lation est en effet la méthode de choix pour isoler des  
10 composés volatils, contrairement aux industries pharmaceu-  
11 tiques ou agrochimiques, où la cristallisation (souvent de compo-  
12 sés hétéroaromatiques) est l'option préférée. Dans le cadre  
13 d'une utilisation intensive de la distillation sous pression  
14 réduite, les unités de production correspondantes sont  
15 capables de fonctionner sous un vide supérieur à la norme de  
16 30-100 mbar couramment utilisée dans une usine chimique.  
17 Certains produits sont commercialisés sous la forme d'un  
18 mélange défini de composés de structures apparentées aux  
19 propriétés olfactives uniques. Les informations concernant la  
20 composition de chaque ingrédient olfactif sont souvent limitées  
21 aux informations de pureté par chromatographie phase  
22 gazeuse, généralement appelées « somme d'isomères ». Ceci  
23 contraste avec les substances pharmaceutiques qui sont haute-  
24 ment réglementées [38]. Les autorités imposent en effet de  
25 cibler les puretés diastéréoisomères et énantiomériques aussi  
26 élevées que possible, avec des limites supérieures acceptables  
27 fixées par une évaluation toxicologique préliminaire.

28 En dépit de son utilisation pour la synthèse d'arômes et de  
29 colorants, la réaction de DA semble sous-utilisée dans le reste  
30 du monde industriel chimique. Par exemple, les réactions de for-  
31 mation de liaisons C-C représentent environ 11,5 % de l'ensemble  
32 du répertoire réactionnel utilisé en chimie médicinale. Dans ce  
33 groupe, les réactions catalysées par des complexes de palladium  
34 représentent environ 60 % des occurrences, tandis que la réac-  
35 tion de DA ne représente que 1,8 % du nombre total de réac-  
36 tions [39]. La réaction de DA est néanmoins utilisée à l'échelle  
37 industrielle pour la préparation de plusieurs composés  
38 notables comme les vitamines D2 et D3, la vitamine B6, la  
39 médrogestone, les **provitamines** K3 et K4, et plusieurs dérivés  
40 d'anthraquinone, d'anthracène et de prostaglandines de type E et  
41 F. La situation est similaire en agrochimie où parmi les rares  
42 exemples d'utilisation de la réaction de DA à l'échelle industrielle,  
43 nous trouvons la synthèse du célèbre endosulfan (figure 4) [40].

44 Cet insecticide organochloré est suspecté d'avoir entraîné la  
45 mort de centaines de personnes depuis 1970, il est interdit  
46 dans l'EU depuis 2005. Pendant les années 1990-1980, l'endo-  
47 sulfan a été préparé à l'échelle de 10 000 t/an en utilisant la  
48 réaction de DA.



49 Cet insecticide organochloré est suspecté d'avoir entraîné  
50 la mort de centaines de personnes depuis 1970,  
51 il est interdit dans l'EU depuis 2005. Pendant les années  
52 1990-1980, l'endosulfan a été préparé à l'échelle  
53 de 10 000 t/an en utilisant la réaction de DA

54 Figure 4 – Structure de l'endosulfan

1 Pour expliquer le faible nombre de réactions de DA  
 2 menées à l'échelle industrielle dans les industries pharma-  
 3 ceutiques et agrochimiques, nous pouvons suspecter des probl-  
 4 èmes liés à l'instabilité des réactifs et à la synthèse en  
 5 réacteur discontinu utilisée pour ce type de réaction bimolécu-  
 6 laire. De plus, les précurseurs qui permettent ces transforma-  
 7 tions efficaces peuvent être difficiles d'accès à l'échelle de la  
 8 production, d'un point de vue technique ou économique.  
 9 Évaluer la sécurité de cette réaction avec des substrats sujets à  
 10 la polymérisation, maîtriser la synthèse complexe de réactifs  
 11 élaborés de DA et contrôler la sélectivité de la réaction sont en  
 12 effet de véritables défis. Cependant, ces objectifs ne sont pas  
 13 spécifiques à la réaction de DA, mais sont plutôt typiques de la  
 14 mise à l'échelle de toute réaction chimique, et les industries des  
 15 arômes et parfums ont prouvé que la réaction de DA était un  
 16 atout (voir préalablement). La rareté des exemples de réactions  
 17 de DA à grande échelle dans l'industrie pharmaceutique reflète  
 18 plutôt davantage la démarche suivie dans l'industrie pour la  
 19 découverte de médicaments qui s'appuie sur des bibliothèques de  
 20 composés émergent d'un ensemble de réactions préférées  
 21 (i.e. couplage de Suzuki et formation d'amide) [41] [42]. Les  
 22 développements dans le domaine de la catalyse asymétrique de  
 23 la réaction de DA, y compris l'utilisation d'enzymes artificielles  
 24 apparues ces dernières années, n'ont pas encore été appliqués  
 25 à grande échelle [43]. Dans le contexte des obstacles crois-  
 26 sants au développement de substances actives innovantes,  
 27 l'utilisation impartiale de la panoplie complète de réactions  
 28 chimiques doit être implémentée pour ouvrir des voies efficaces  
 29 vers de nouveaux composés chimiques prometteurs.

r h

31 Une provitamine est une substance issue de l'alimentation  
 32 pouvant être transformée en vitamine par l'organisme.

. h

À retenir

- La réaction de DA crée, en une seule étape, 2 liaisons C-C ainsi que 4 centres stéréogéniques.
- La réaction de DA est une réaction péricyclique thermique concertée entre les 4 électrons  $\pi$  du diène et les 2 électrons  $\pi$  du diénophile.
- La régio- et la stéréo-sélectivité de la réaction de DA sont régies par les règles de Woodward-Hoffmann qui impliquent la conservation de la symétrie des orbitales frontières.
- La réaction DA est largement utilisée dans les industries des arômes et parfums.

, h

des h

3. Réaction de cycloaddition de Diels-Alder biocatalysée

56 Jusqu'à la fin du siècle dernier, les réactions DA semblaient  
 57 exister uniquement dans le domaine de la chimie de synthèse.  
 58 Mais en 2000, Vederas [44] et Watanabe [45] ont décrit pour  
 59 la première fois dans la littérature deux enzymes multifonctionnelles présentant des activités Diels-Aldérase (DAase). Il  
 60 fallut attendre 2011, pour que la première vraie DAase, SpnF,  
 61 soit découverte par le groupe de Liu [46] ouvrant ainsi la voie  
 62 à la découverte d'autres DAases [47] [48] [49] [50] [51] [52]  
 63 [53]. Au cours des 20 dernières années, un nombre croissant  
 64 de DAases supposées ont été décrites. Cependant, peu d'entre  
 65 elles ont clairement été identifiées comme DAases et la ques-  
 66 tion concernant leur mécanisme -concerté vs. en deux étapes-  
 67 est encore débattue.

d/ a/

g/

3.1 Découverte de Diels-aldérases naturelles

Jusqu'à récemment, les DAases décrites dans la littérature ne catalysaient que des cycloadditions intramoléculaires. Récemment, une **DAase catalysant des réactions intermoléculaires (MaDA)**, impliquée dans la biosynthèse de la chalconoracine avec une efficacité et une énantiosélectivité élevées, a été rapportée [54]. Fait intéressant, MaDA présente une promiscuité de substrats qui offre des opportunités d'évolution enzymatique pour l'utilisation de substrats non naturels et ouvre la voie à une utilisation en biocatalyse.

Des structures aux rayons X de plusieurs DAases naturelles ont été obtenues (LepI [55], MaIC [56], Spnf [57], AbyU [58], PyrI4 [59], PyrE3 [60]). Dans la plupart des cas, les structures aux rayons X indiquent que ces enzymes agissent comme une matrice [61] qui lie les substrats dans une poche hydrophobe et oblige le diène et le diénophile à adopter une conformation proche de celle de l'ET (figure 5). Des approches de modélisation moléculaire ont suggéré qu'à l'intérieur de la cavité, les effets électrostatiques contribuaient à la polarisation du diène et du diénophile abaissant l'enthalpie d'activation par la stabilisation des redistributions de charge dans l'ET [58].

Alors que les structures 3D suggèrent des résidus impliqués dans la fixation/activation des substrats, la mutagenèse dirigée de ces résidus n'a jamais complètement éliminé les activités DAase. Ceci est illustré par l'exemple de PyrI4. La **structure cristallographique de PyrI4** a été résolue en présence du produit de la réaction de DA qui se trouve dans une cavité hydrophobe où les résidus Gln115 et His117 semblent responsables de l'activation du précurseur diénophile (figure 6) [59]. Cependant, la mutation de Gln115 ou H117 en alanine a entraîné respectivement une diminution de seulement 30 % et 6 % de l'activité enzymatique ( $k_{cat}$ ), sans influence significative sur l'affinité du substrat ( $K_M$ ). Ceci peut être attribué à la flexibilité de la poche catalytique qui peut adopter d'autres conformations qui mènent à de nouvelles interactions avec les substrats, et ainsi à leur activation. Bien que les données de structure et de mutagenèse ne soient pas disponibles pour toutes les DAases, la plasticité de la poche protéique semble être une caractéristique commune aux DAases naturelles.

3.2 Opportunités et limites des Diels-aldérases naturelles

A part MaDA, toutes les DAases naturelles catalysent des réactions intramoléculaires peu utiles pour la biocatalyse. Or la réaction DA est très importante pour la synthèse chimique, d'où le besoin de développer des DAases artificielles qui combleraient le manque de DAases naturelles dans la transition vers

⚡  
E'

Mis à

augmenter taille de la figure

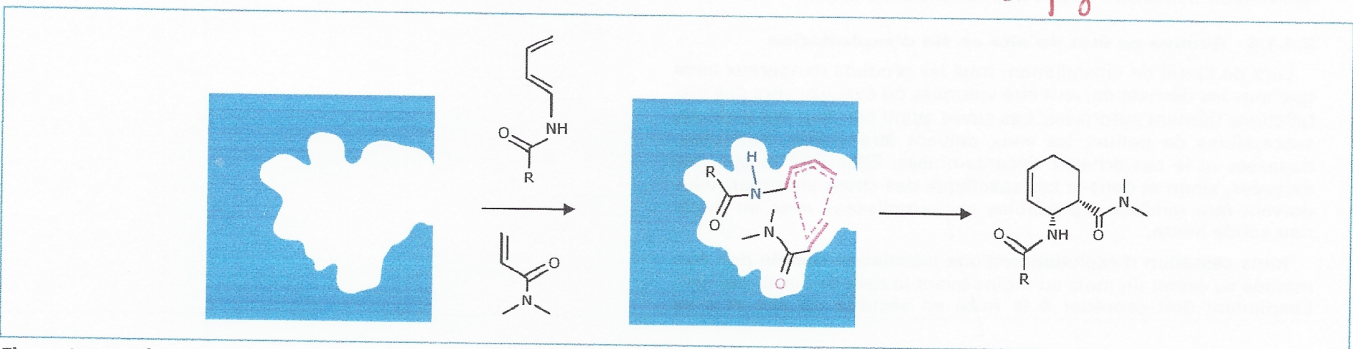


Figure 5 – Schéma montrant l'effet matrice des DAases

à centre horizontalement

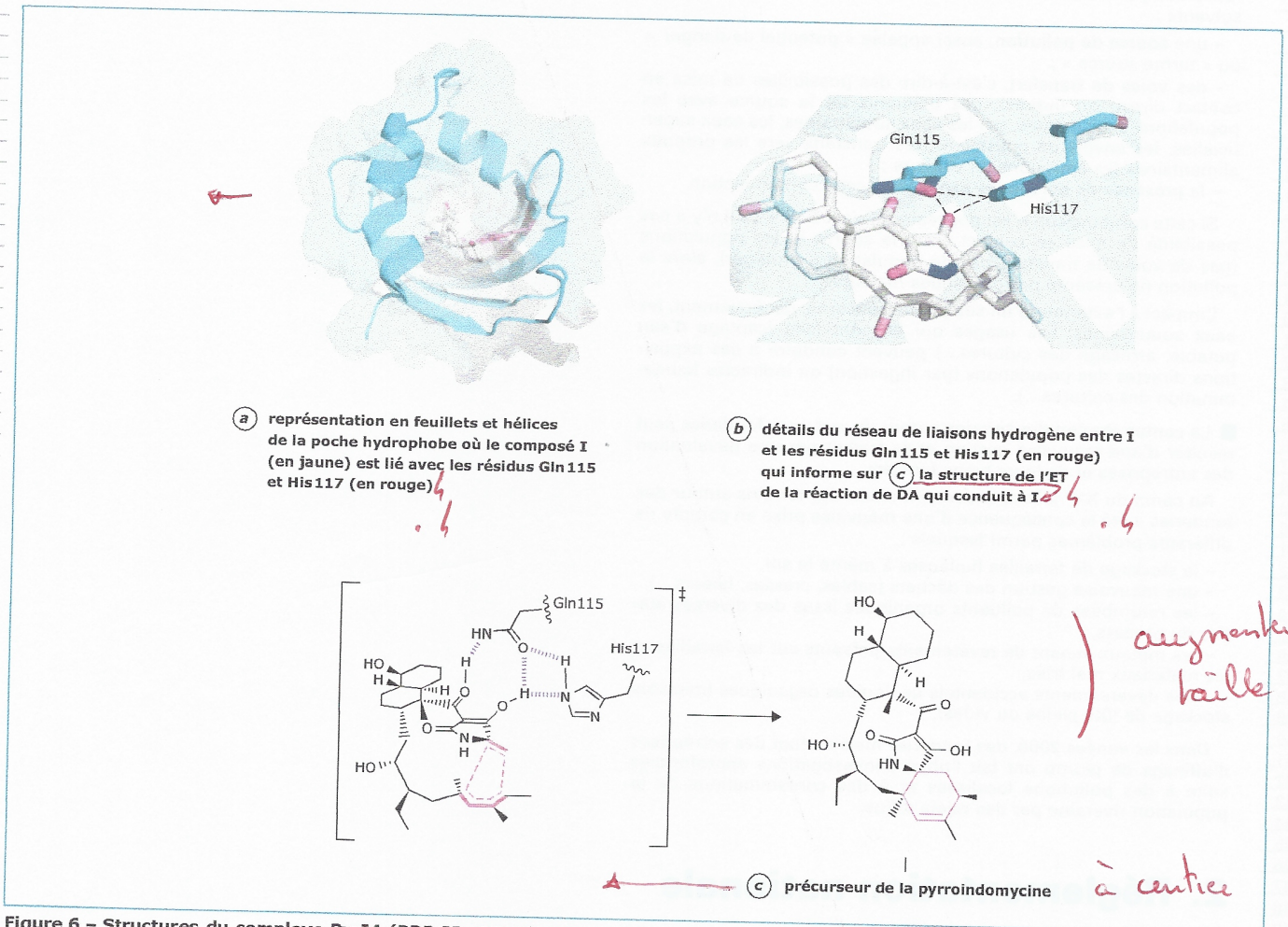


Figure 6 - Structures du complexe PyrI4 (PDB ID: 5BU3)-produit I (un précurseur de la pyrroindomycine)

une chimie plus verte. Nos connaissances des caractéristiques fonctionnelles des DAases naturelles, ainsi que des catalyseurs synthétiques sont la base de la conception de DAases artificielles. Pour être efficace, un catalyseur de la réaction de DA doit donc répondre au cahier des charges suivants :

- avoir une cavité capable d'accepter le diène et le diéno-phile dans des positions favorables à l'induction d'une sélectivité
- être capable de stabiliser l'ET de la réaction pour abaisser l'énergie d'activation. Dans ce contexte, un paramètre clé pour évaluer l'efficacité d'un catalyseur est la vitesse d'accélération ou **molarité effective** qui compare les vitesses des réactions catalysées vs non catalysées dans les mêmes conditions expérimentales.

La **Molarité Effective (ME)** exprimée en concentration molaire est le rapport entre la constante de **vitesse du premier ordre**  $k_{cat}$  ( $\text{min}^{-1}$ ) et la **constante de vitesse du second ordre**  $k_{unecat}$  ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) déterminée pour la réaction de DA non catalysée.

À retenir

- La première DAase naturelle a été découverte en 2011, elle catalyse une réaction intramoléculaire.
- Seule MaDA découverte en 2020 catalyse une cycloaddition de DA intermoléculaire.
- Des études structurales indiquent que les DAases agissent comme des matrices qui lient les substrats dans une poche hydrophobe, et obligent le diène et le diénophile à adopter une conformation proche de celle de l'ET.

4. Diels-alderases artificielles sans métal

Deux approches ont été utilisées pour générer des DAases artificielles sans ion métallique : l'utilisation d'anticorps catalytiques ou la conception d'enzyme *in silico*. Comme mentionné précédemment, les propriétés catalytiques des enzymes pour une réaction donnée sont dues à la stabilisation de l'ET de cette réaction qui conduit à une diminution de son énergie d'activation. Il a été montré que des anticorps sélectionnés contre un ET ou un mime de cet ET possédaient une activité catalytique équivalente à celle des enzymes. C'était le début de l'ère des anticorps catalytiques et donc des DAases artificielles. Ainsi, en utilisant le **système immunitaire des mammifères**, plusieurs groupes ont réussi à générer des anticorps spécifiques pour catalyser la réaction de DA. Avec le même objectif, d'autres groupes ont choisi la **conception d'enzymes *in silico*** (ou *de novo*), qui a fait des progrès remarquables au cours des dernières années grâce au développement des outils de la modélisation moléculaire, permettant une prédiction de plus en plus précise de la structure tertiaire des protéines, de leur stabilité et des interactions protéine-protéine ou protéine-ligand [62].

4.1 Utilisation des anticorps catalytiques

La stratégie générale implique la génération d'anticorps monoclonaux sélectionnés pour lier une molécule appelée haptène qui imite l'ET de la réaction (figure 7) [63].

Le premier anticorps capable de catalyser une réaction de DA a été rapporté en 1989 par Hilvert et al. [64]. Cet anticorps (**1E9**) a été dirigé contre le dérivé endo-hexachloronorbornène **1**, un analogue stable de l'état de transition de la cycloaddition du dioxyde de tétrachlorothiophène sur le N-éthylmaléimide (figure 8). **1E9** s'est avéré capable de catalyser la réaction de DA avec un  $k_{cat}$  de  $13 \text{ min}^{-1}$  et une **efficacité molaire (EM)** de  $10^3 \text{ M}$ . Le produit de la réaction DA perd spontanément  $\text{SO}_2$ , ce qui conduit à un produit qui ne ressemble pas à l'haptène **1**, et évite ainsi l'inhibition par le produit. La structure 3D du fragment de l'anticorps (Fab) **1E9**, complexé avec une molécule d'haptène **1**, a été résolue. Elle a révélé que la poche de liaison de l'anticorps fournissait une complémentarité de forme significative avec l'haptène, *via* des contacts de van der Waals, du  $\pi$ -stacking entre le résidu Trp H50 et le substituant maléimide, et une liaison H entre un groupe carbonyle du substituant maléimide, et le résidu Asn H35 [65]. Il a été montré à l'aide de calculs de mécanique quantique que la très bonne activité catalytique observée pouvait être expliquée par le degré élevé de complémentarité de forme entre **1E9** et l'état de transition de la réaction [66].

Par la suite, le groupe de Schultz [67] a décrit la génération d'anticorps dirigés contre le bicyclo[2.2.2]octane haptène **2**, conçu pour mimer l'état de transition « bateau » de la cycloaddition

progrès remarquablement

64 ou 66 ?

si c'est 66, 64 n'est plus cité,

non définie ?

à augmenter un peu

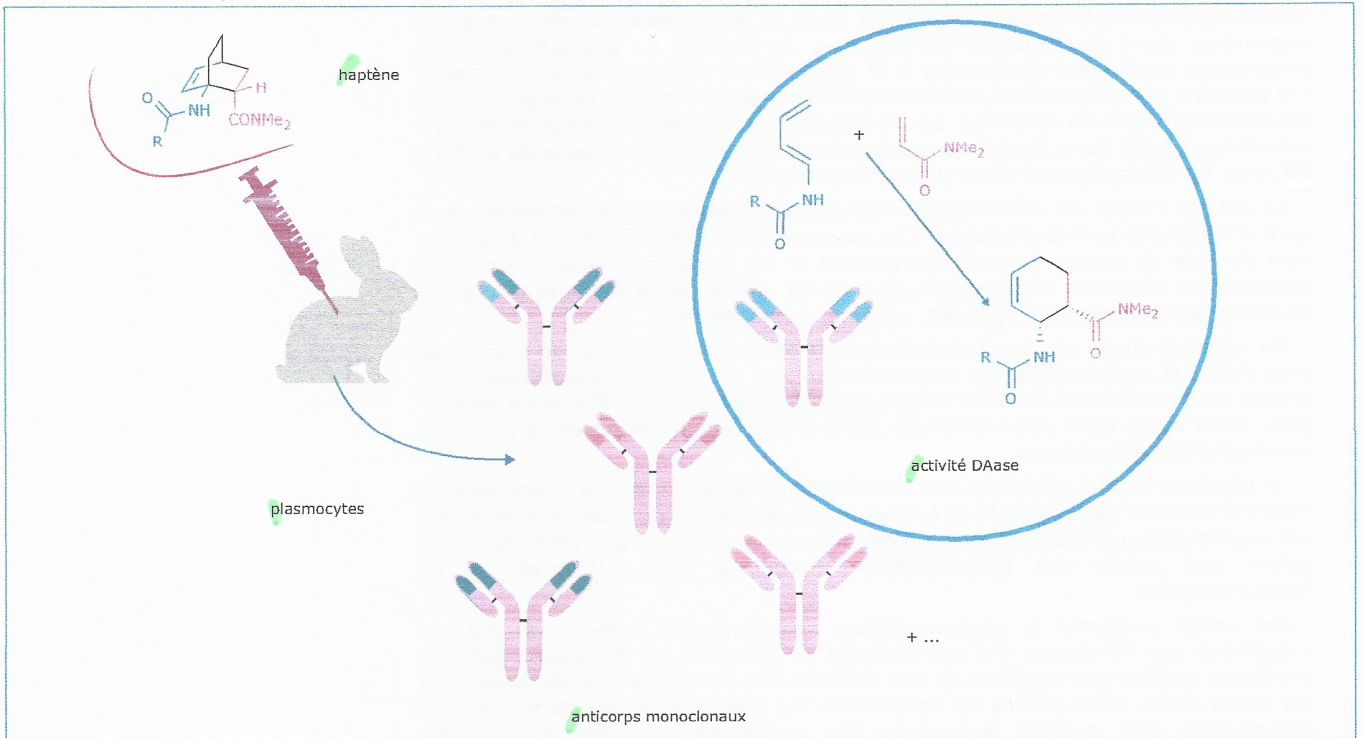


Figure 7 - Stratégie utilisée pour générer des anticorps monoclonaux catalytiques

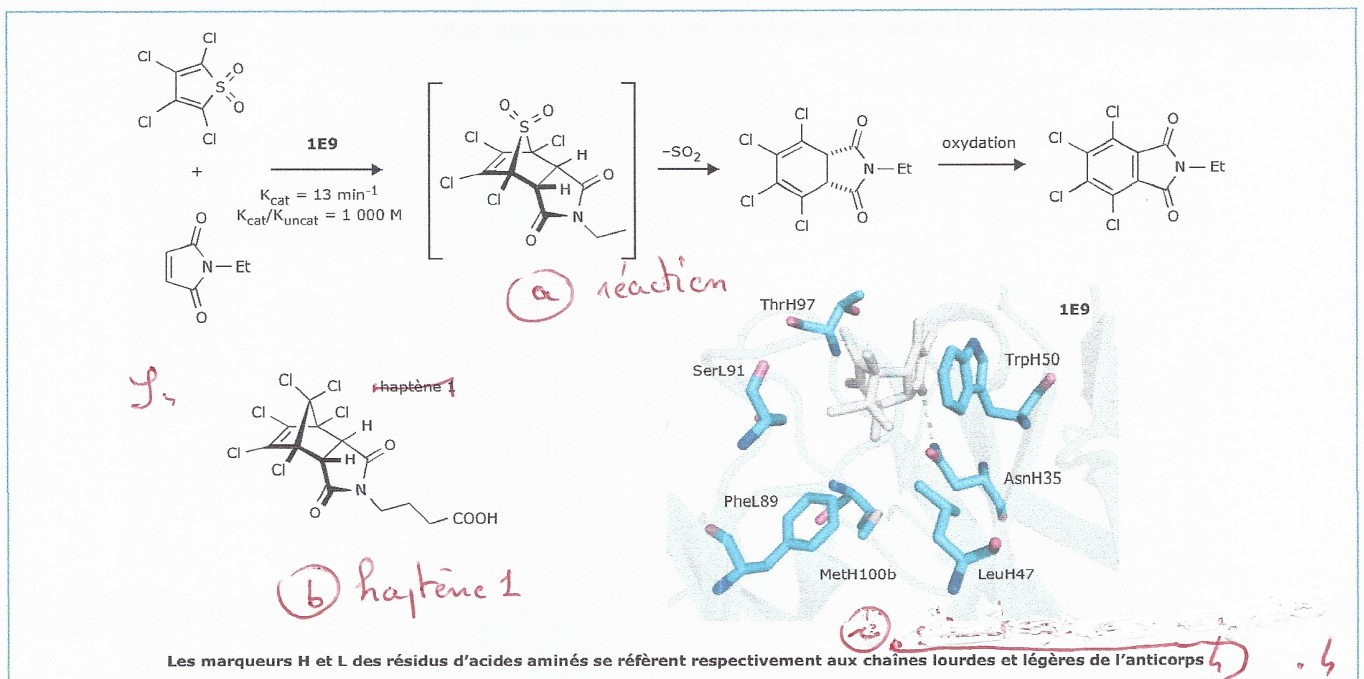


Figure 8 - Réaction de Diels-Alder catalysée par l'anticorps 1E9 dirigé contre l'endo-hexachloronorborene 1 et structure aux rayons X de l'anticorps 1E9 contenant l'haptène 1 (PDB ID : 1C1E) [65]

## INNOVATION

de DA du diène sur le diénophile correspondant (figure 9). Un anticorps sur les dix testés (**39-A11**) s'est avéré capable de catalyser la formation du produit *endo* avec un  $k_{cat}$  de  $40 \text{ min}^{-1}$ . La structure tridimensionnelle du complexe entre **39-A11** et l'haptène **2** a été obtenue par étude de diffraction des rayons X [68] [69]. Elle a permis de conclure que l'anticorps liait les substrats dans une conformation réactive réduisant vraisemblablement les degrés de liberté de translation et de rotation. Le mécanisme de la liaison stéréosélective d'haptènes énantiomères par l'anticorps **39-A11** a été étudiée par Zhang *et al.* à l'aide de docking moléculaire complétées par des calculs de mécanique quantique [70]. Sur la base de ces données, l'origine de la stéréosélectivité de **39-A11** a été attribuée à la présence d'une liaison H entre un oxygène du maléimide et Asn H35 stratégiquement positionnée et au  $\pi$ -stacking du maléimide avec Trp H50 au site de liaison de l'anticorps (figure 9).

Après ces premiers exemples, plusieurs groupes ont employé une stratégie similaire et ont produit des anticorps pour catalyser

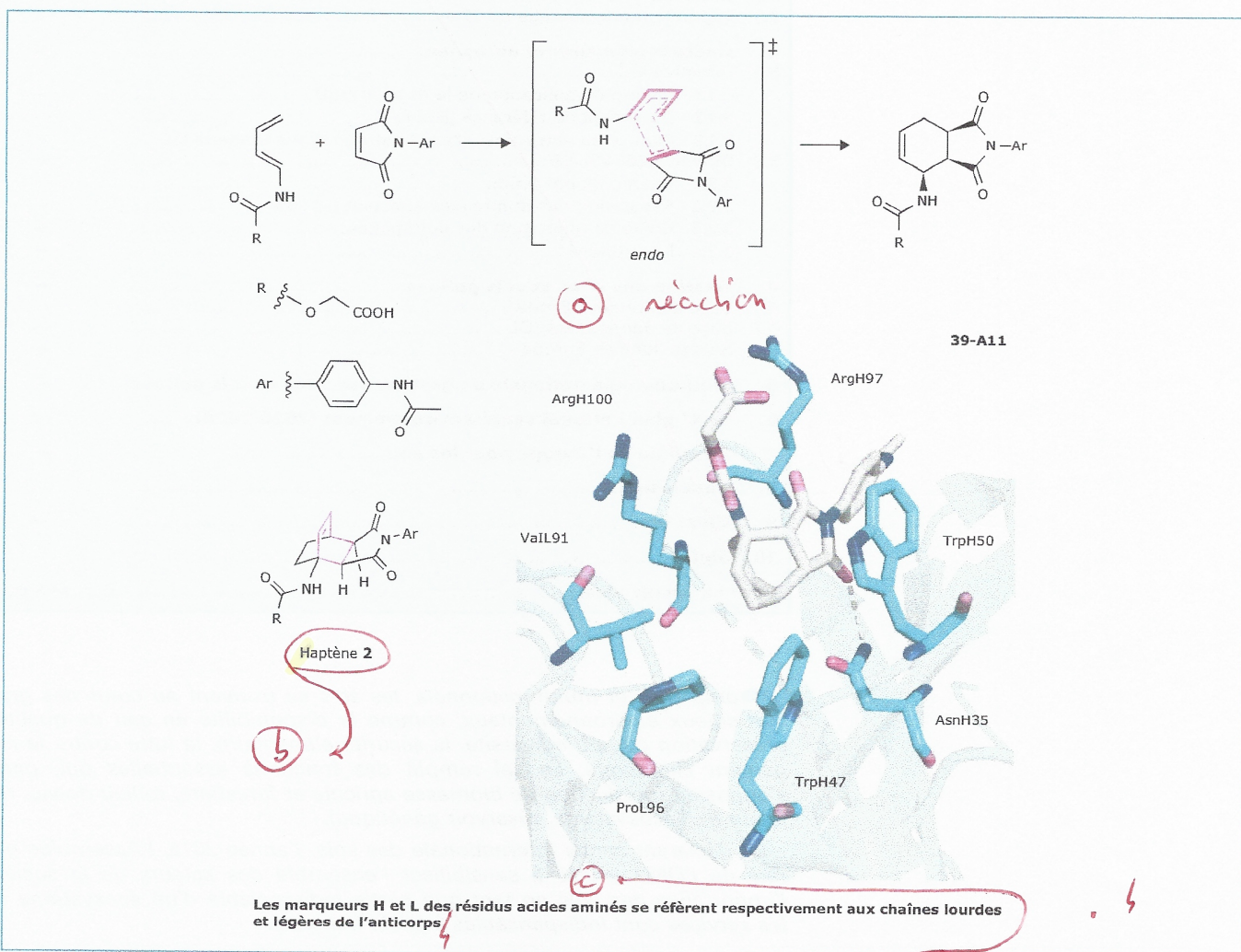


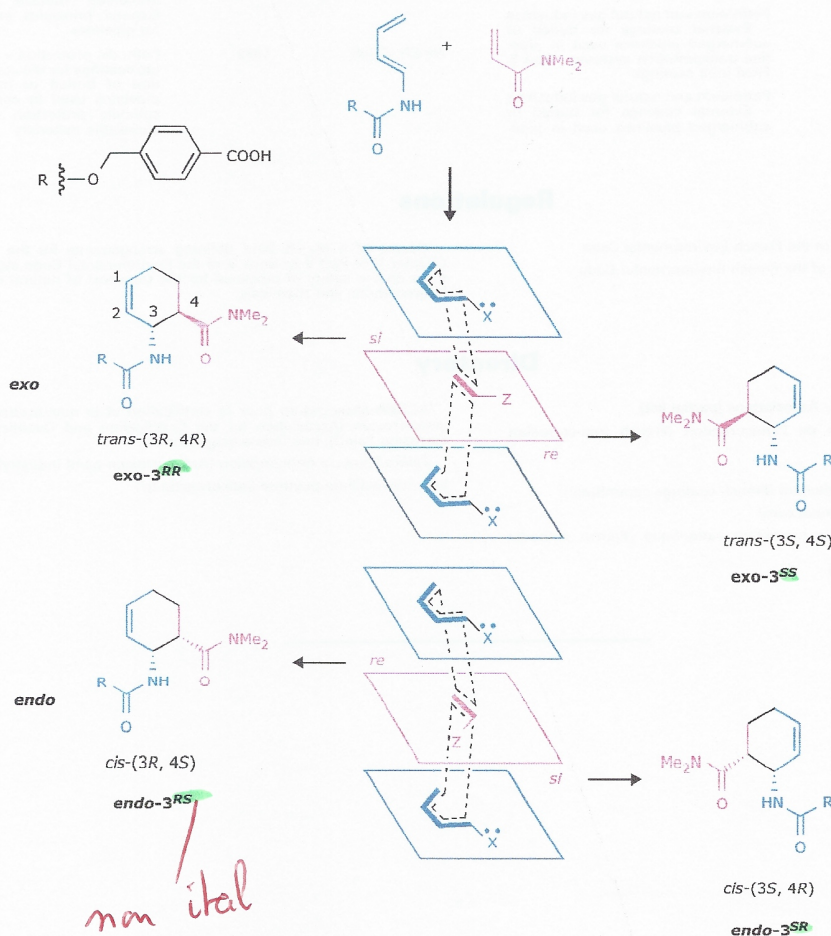
Figure 9 – Réaction de DA catalysée par l'anticorps 39-A11 dirigé contre l'haptène bicyclique **2** et structure aux rayons X de l'anticorps 39-A11 contenant l'haptène **2** (PDB ID : 202W)

des cycloadditions d'homo-DA [71] [72], d'hétéro-DA [73], ainsi que de aza-DA [74] [75]. Parmi tous ces exemples, il faut citer les anticorps développés pour catalyser la réaction de DA du trans-1-N-acylamino-1,3-butadiène avec le N,N-diméthylacrylamide conduisant à l'adduit 3 (figure 10), réaction qui a également été utilisée comme modèle pour la conception de DAases par une approche in silico (§ 3.2).

Des anticorps ont été générés en utilisant deux stratégies [71] [72]. La première, rapportée par Gouverneur *et al.*, impliquait la génération d'anticorps monoclonaux dirigés contre deux diastéréoisomères d'un haptène bicyclique rigide utilisés comme analogues d'ET pour cette réaction (4 et 5 sur la figure 11a) [71]. Un anticorps 7D4, dirigé contre l'haptène 4 s'est avéré capable de catalyser préférentiellement l'addition selon la voie favorisée *endo* et alors qu'un autre anticorps, 22C8, dirigé contre l'haptène 5, catalysait la réaction selon la voie défavorisée *exo* pour donner sous des formes énantiomériquement pures les produits d'addition *cis* et *trans* (Tableau 1,

même molécule que celle de la figure 10?

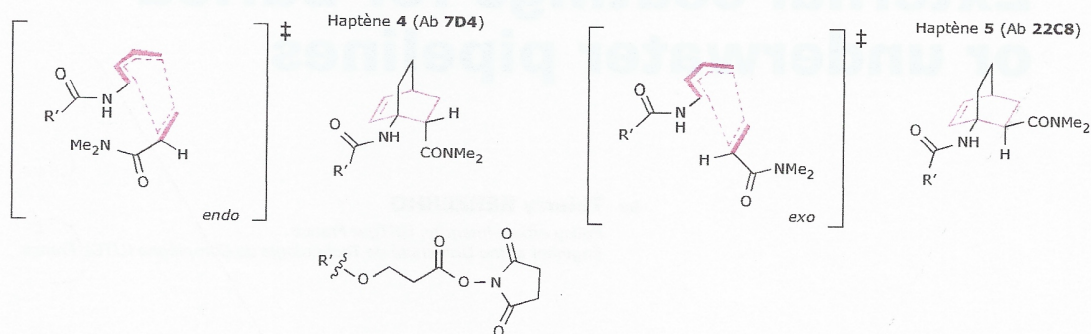
L'4 9 //  
, 5



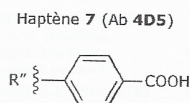
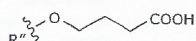
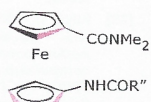
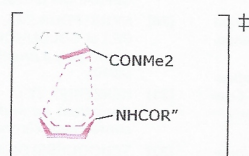
non ital

Figure 10 - Différents isomères pouvant être obtenus par la réaction de DA du 4-carboxybenzyl trans-butadiène-1-carbamate et du N,N'-diméthylacrylamide (X = NHCOR et Z = CONMe<sub>2</sub>)

non bold



a) par les anticorps 22C8 et 7D4 dirigés contre les haptènes bicycliques 4 et 5



b) par les anticorps 13G5 et 4D5 dirigés contre les haptènes 6 et 7 dérivés du ferrocène, Structure RX du 13G5 avec l'inhibiteur 1-carboxy-1'-[(diméthylamino) carbonyl] (PDB ID : 1A3L)

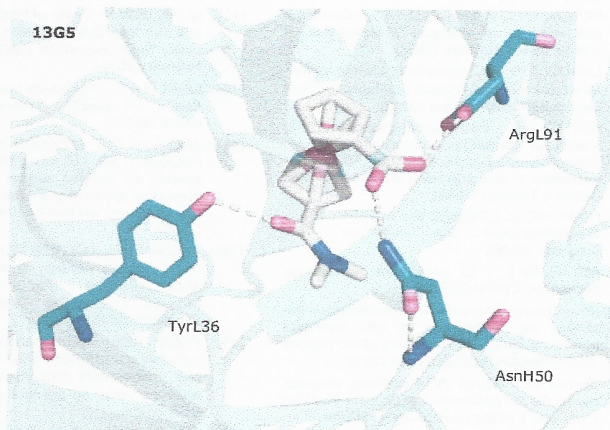


Figure 11 – Réaction de DA du 4-carboxybenzyl trans-buta-1,3-diène-1-carbamate et du *N, N'*-diméthylacrylamide catalysé

entrées 1 et 2). La comparaison des structures aux rayons X des haptènes 4 et 5, avec les structures calculées des états de transition correspondant aux voies *endo* et *exo*, a montré qu'ils constituaient d'excellents mimes de ces états de transition. Le principal résultat de cette étude est donc la génération d'un catalyseur pour la réaction de DA selon le processus *exo* cinétiquement défavorisé. Dans ce cas particulier, il a été suggéré que l'énergie de liaison devait être utilisée pour rediriger la réaction selon le chemin de plus haute énergie. Les besoins énergétiques pour le contrôle de la stéréochimie dans les réactions de DA sont généralement d'environ 20 kcal.mol<sup>-1</sup>, énergie qui peut être facilement fournie par la liaison des substrats à l'anticorps.

non bield

**Tableau 1 – Paramètres cinétiques et régio- et stéréo-sélectivités observées pour la réaction DA du 1-carbamyl-trans-1,3-butadiène 4-carboxybenzyl et le *N,N'*-diméthylacrylamide catalysée pas des anticorps monoclonaux (entrée 1-4) et les enzymes artificielles (entrée 5-9)**

Entrée	Catalyseur	endo:exo [ee (%)] <i>non bold</i>	Constante de vitesse du 1 <sup>er</sup> ordre $k_{cat} \times 10^{-3}$ (min <sup>-1</sup> ) <i>non bold</i>	Efficacité catalytique EC (M <sup>-2</sup> . min <sup>-1</sup> ) [M <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup> ] <i>non bold</i>	Efficacité molaire EM (M) <i>non bold</i>
1	7D4	endo uniquement [endo-3 <sup>RS</sup> > 98 %]	3,44	2108 [35]	48
2	22C8	exo uniquement [exo-3 <sup>SS</sup> > 98 %]	3,17	604 [10]	18
3	13G5	exo > 98 % [exo-3 <sup>SS</sup> > 95 %]	1,2	nd	6,9
4	4D5	endo > 98 % [endo-3 <sup>RS</sup> > 95 %]	3,48	nd	4,9
5	DA_20_00	-	1,66	3,6 [0.06]	4
6	DA_20_10	-	35	366 [6]	94
7	DA_20_20	endo uniquement [endo-3 <sup>RS</sup> > 99 %]	75	2 040 [34]	199
8	CE6	-	36,7	5 220 [87]	97
9	CE20	-	180	32 400 [540]	478

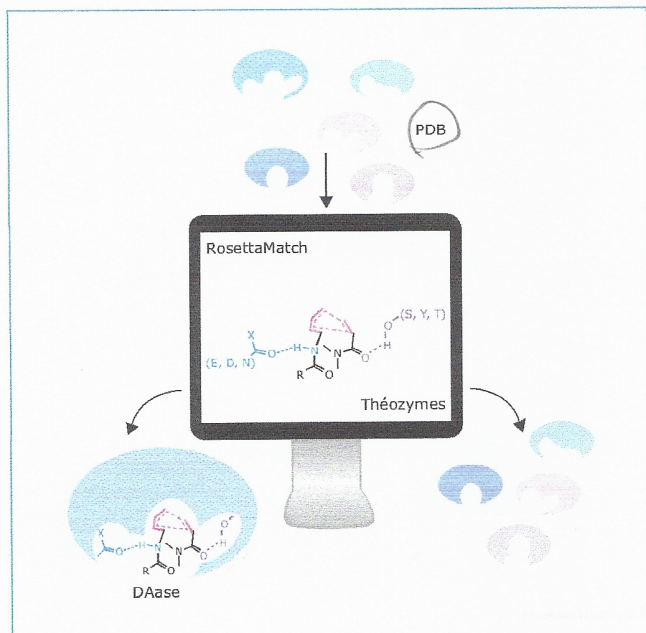
Dans une autre approche originale pour produire des anticorps à activité DAase qui puissent catalyser la formation d'exo- ou d'endo-cycloadduits, Janda et ses collègues ont utilisé des haptènes **6** et **7** dérivés du ferrocène [72]. Ces haptènes flexibles, avec des noyaux cyclopentadiényles capables de tourner librement en solution, ont été conçus en supposant que le système immunitaire pourrait geler un conformère qui imite l'état de transition de la réaction de DA. L'anticorps **4D5** dirigé contre l'haptène **7** catalyse l'endo-cycloaddition favorisée (tableau 1, entrée 4). L'anticorps **13G5**, dirigé contre **6**, s'est avéré capable de catalyser la réaction d'exo-cycloaddition défavorisée entre le diène, correspondant et le diénophile (figure **11b**) avec une diastéréosélectivité (tableau 1, entrée 3). La structure cristalline du Fab **13G5** complexé à la forme acide de l'haptène **6** a été déterminée [76]. Elle a révélé que le ferrocène était complètement enfoui dans l'anticorps, avec la rotation des cyclopentadiényles restreinte par des contraintes stériques imposées par des liaisons hydrogène spécifiques au sein du site de liaison de l'anticorps. L'anticorps **13G5**, ainsi que d'autres anticorps monoclonaux issus du même processus d'immunisation, ont pu être utilisés par Cannizzaro *et al.* à des fins synthétiques pour produire l'adduit de DA énantiomériquement pur [77]. Des calculs de mécanique quantique ont ensuite été utilisés pour rationaliser les effets des différents résidus catalytiques sur les états de transition et sur l'énantiosélectivité observée. Ces études suggèrent que l'haptène **6** utilisé pour le criblage d'anticorps ressemble beaucoup au complexe de Van der Waals des réactifs.

Un **anticorps monoclonal** est une glycoprotéine produite par une seule et même lignée de lymphocytes B qui se trouve activée en présence d'un antigène. L'anticorps monoclonal possède une affinité spécifique envers cet antigène qui est le plus souvent une autre protéine.

1 **4.2 Enzymes générées par une approche**  
 2 ***in silico***  
 3

4 ■ La stratégie générale pour concevoir une enzyme *in*  
 5 *silico* consiste à optimiser par des calculs l'ET de la réaction  
 6 désirée, puis à générer des sites actifs minimaux contenant  
 7 des résidus d'acides aminés judicieusement sélectionnés pour  
 8 stabiliser cet ET par des interactions non covalentes. Ces sites  
 9 actifs minimaux sont nommés « théozymes ». Des protéines  
 10 qui s'adaptent à ces théozymes et leur fournissent une protec-  
 11 tion contre le milieu extérieur sont ensuite sélectionnées *in*  
 12 *silico* pour être ensuite optimisées. L'ensemble d'algorithmes  
 13 et d'outils de prédiction de structures macromoléculaires  
 14 ROSETTA, dont le développement a été initié par le groupe de  
 15 David Baker à l'université de Washington, a été au centre du  
 16 travail détaillé ci-après.

17 ■ Le seul exemple de DAase généré par cette approche  
 18 a été décrit par le groupe de David Baker [78]. La réaction  
 19 modèle choisie est celle déjà utilisée pour développer des  
 20 anticorps catalytiques : il s'agit de la réaction de DA entre  
 21 le 4-carboxybenzyl-*trans*-1,3-butadiène-1-carbamate et la  
 22 *N,N'*-diméthylacrylamide pour produire l'énantiomère *endo-3RS*  
 23 (figure 10). Suivant la procédure décrite ci-dessus et sché-  
 24 matisée en figure 12, la structure de l'ET de plus basse  
 25 énergie conduisant au produit *endo-3RS* a été optimisée  
 26 par calculs et des résidus d'acides aminés ont été introduits  
 27 pour activer le diène (une glutamine ou une asparagine  
 28 pour effectuer une liaison hydrogène avec le groupe N-H du  
 29 carbamate) et le diénophile (une sérine, une thréonine ou  
 30 une tyrosine pour engager une liaison hydrogène avec l'oxy-  
 31 gène du groupement carbonyle de l'amide). Pour chacune  
 32 de ces structures calculées, un ensemble de conformères a  
 33 été généré en permettant la rotation autour de certaines  
 34 liaisons et en variant les paramètres géométriques des liai-  
 35 sons hydrogène.  
 36



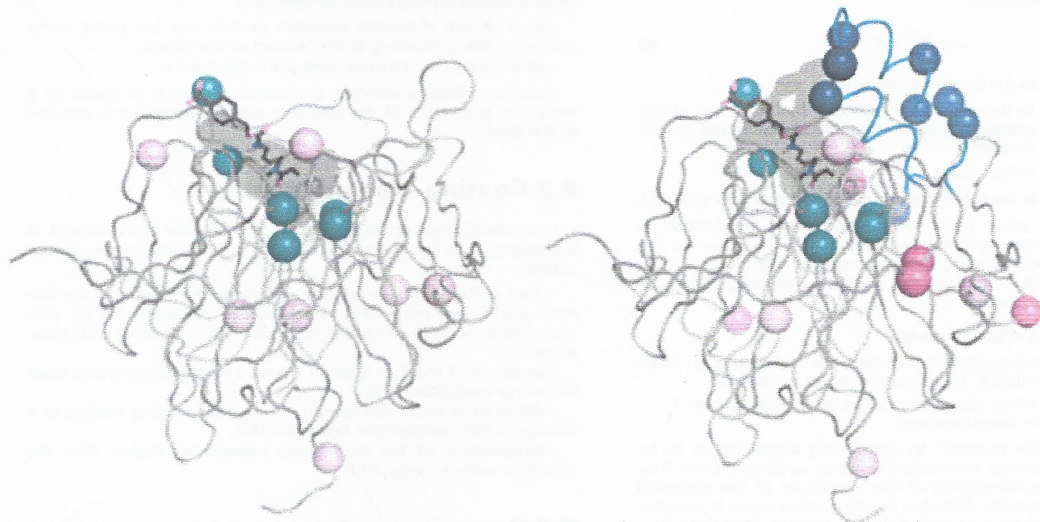
67 Figure 12 – Stratégie utilisée pour la génération d'une DAase  
 68 *de Novo*

1 Les résultats obtenus conduisent à un ensemble de « théo-  
 2 zymes » constitué des sites actifs minimaux capables de cata-  
 3 lyser la réaction désirée. Ces théozymes ont ensuite été  
 4 confrontés à une banque de 207 protéines de structures dif-  
 5 férentes en utilisant le programme RosettaMatch [79] [80].  
 6 Les protéines hôtes sélectionnées ont ensuite été optimisées ;  
 7 pour cela, des mutations ont été effectuées *in silico* afin  
 8 d'optimiser les interactions avec les états de transition ciblés  
 9 [79] [81] ~~cible~~ sur la base de la géométrie du site actif et de  
 10 la stabilisation de l'ET. Les gènes synthétiques correspondants  
 11 ont été commandés et les protéines ont été exprimées dans  
 12 *Escherichia coli*. Deux d'entre elles se sont avérées capables  
 13 de catalyser la réaction de DA désirée. Dans les deux cas, les  
 14 acides aminés catalytiques sont une glutamine et une tyro-  
 15 sine. Les performances catalytiques de la meilleure des deux  
 16 enzymes artificielle (DA\_20\_00) restent toutefois modestes  
 17 avec un  $k_{cat}$  de  $1,66 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  et un EM = 4 M (tableau 1,  
 18 entrée 5). Des expériences de mutagenèse dirigée ciblant des  
 19 résidus du site actif ont été réalisées pour améliorer l'efficacité  
 20 catalytique menant à l'enzyme DA\_20\_10 ( $k_{cat} = 35 \times 10^{-3}$   
 21  $\text{min}^{-1}$  et EM = 94 M (tableau 1, entrée 6)). Il est à noter que,  
 22 dans tous les cas, le produit endo-3<sup>RS</sup> a été obtenu avec un  
 23 ee > 99 % confirmant la pertinence de l'approche.

■ Après cette preuve de concept réussie, différentes stratégies  
 ont été employées pour améliorer les performances cataly-  
 tiques des enzymes générées par cette approche. Tout  
 d'abord, le groupe de David Baker a utilisé un jeu en ligne,  
 Foldit, pour améliorer l'enzyme DA\_20\_10 [82]. Développé en  
 2008, Foldit (plie-le en Anglais) est un jeu *crowdsourcing* (ou  
 production participative) qui utilise la créativité et le savoir-faire  
 d'un grand nombre de joueurs volontaires, non nécessairement  
 experts, pour résoudre des tâches complexes centrées sur le  
 repliement des protéines, la prévision de structure et les interac-  
 tions protéine-protéine ou protéine-ligand [83]. Il a ainsi été  
 demandé aux joueurs d'améliorer les performances de la DAase  
 artificielle en remodelant certaines boucles du site actif, pour  
 que les substrats soient moins exposés au solvant et pour per-  
 mettre des interactions stabilisantes supplémentaires. Pour  
 cela, les joueurs ont été autorisés à supprimer ou à insérer des  
 résidus sur ces boucles, ainsi qu'à muter des résidus du site  
 actifs. De cette manière, 70 000 séquences ont été générées et  
 les *design* de plus faibles énergies ont été visualisés et triés par  
 les chercheurs.

Au final, 4 *designs* ont été sélectionnés pour être optimisés  
 par des joueurs « confirmés ». Les protéines ont été exprimées  
 et testées pour être à nouveau optimisées par les joueurs de  
 Foldit. Après plusieurs itérations, une enzyme possédant des  
 propriétés catalytiques nettement améliorées a été obtenue  
 (CE6) (tableau 1 entrée 8). La structure cristallographique de  
 ce variant a été résolue et il apparaît que la position des rési-  
 dus catalytiques est inchangée. Par contre, une structure héli-  
 coïdale de 24 résidus (comprenant une large insertion de  
 13 acides aminés) est positionnée comme un couvercle aud-  
 dessus du site actif ce qui confère une plus grande stabilité à  
 la liaison des substrats à l'intérieur de la cavité. La deuxième  
 stratégie pour améliorer les performances de la DAase a été  
 développée par le groupe de Daniel Hilvert (Zürich, Suisse)  
 [84]. Les auteurs ont réalisé plusieurs cycles d'évolution diri-  
 gée par « error prone PCR » (ePCR) à partir des séquences  
 des enzymes DA\_20\_10 puis CE6. Dans un premier temps,  
 en partant de DA\_20\_10, une mutation systématique de tous  
 les résidus susceptibles d'interagir avec les substrats ou les  
 résidus catalytiques a été effectuée. Le meilleur mutant pré-  
 sente 6 mutations (sphères vertes, figure 13.) Puis, après  
 8 cycles d'évolution dirigée par ePCR, le descendant le plus  
 actif (DA\_20\_20) cumule 13 mutations : les 6 mutations pré-  
 cédemment décrites, 5 en surface et 2 situées dans le cœur

sh  
 9  
 sh  
 . /  
 , s  
 ) pas très clair  
 9 / , s  
 D. +



**a** cas de DA<sub>20\_20</sub> : identification des mutations générées par évolution des résidus du site actif (sphères vertes) et par évolution dirigée de l'ensemble de la protéine (sphères jaunes). Les mutations sont reportées sur la structure de l'enzyme DA<sub>20\_00</sub> (PDB 3I1C)

**b** cas de CE20 : mutations précédentes combinées à celles du couvercle introduites par les joueurs Foldit, et aux mutations générées par ePCR sur la protéine entière (boules rouges) et sur le couvercle (boules bleues). Les mutations sont reportées sur la structure de l'enzyme CE6 (PDB 3U0S). (figure reproduite avec permission de la référence Preiswerk et al. [84])

Figure 13 - Optimisation des DAases générées *in silico*

hydrophobe de la protéine (sphères jaunes, figure 13). L'efficacité catalytique de DA<sub>20\_20</sub> est 5,5 fois plus élevée que celle de DA<sub>20\_10</sub> (tableau 1, entrée 6). Afin d'améliorer davantage les propriétés des DAases artificielles, les 13 mutations obtenues ci-dessus ont été introduites dans l'enzyme CE6 générée par les joueurs Foldit, et le variant a été soumis à plusieurs tours d'évolution dirigée. Le descendant le plus performant, CE20, présente des substitutions additionnelles dans la séquence de la protéine entière et dans celle du couvercle (sphères rouges et bleues, figure 13). Les propriétés catalytiques de CE20 sont nettement améliorées ( $k_{cat} = 180 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ,  $CE = 540 \text{ M}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  et  $ME = 478 \text{ M}$ , figure 14f) et l'enzyme affiche une efficacité catalytique près de 100 fois supérieure à celle du design initial (tableau 1, entrée 9). Ce variant a permis la synthèse à plus grande échelle (jusqu'à 30 mg) du produit **endo-3<sup>RS</sup>** en solution aqueuse et à température ambiante avec plus de 90 % de conversion.

La structure de CE20 en présence d'un analogue de substrat a été résolue par diffraction des rayons X et permet de mieux comprendre les bases structurales des améliorations évolutives (figure 14a). Les résidus catalytiques et la forme du site actif ont été conçus avec succès dans les théozymes initiaux, en effet les chaînes latérales des résidus catalytiques (Tyr134 et Gln208) adoptent des positions similaires dans les descendants successifs (figure 14b). Par contre, la stabilisation du substrat dans la poche catalytique a été optimisée. La première enzyme DA<sub>20\_00</sub> avait un site actif très ouvert dans lequel les substrats n'étaient pas étroitement liés (figure 14c). L'insertion d'un couvercle (CE6) (figure 14d) et des évolutions de ce couvercle et du site actif ont conduit à une enzyme (CE20) affichant une poche hydrophobe profonde

de signe les 2 figures?

Hilvert  
(idem ligne 58  
page 17)

./

./

1 dans laquelle les substrats sont parfaitement logés (figure 14e).  
 2 Il est intéressant de noter que les performances de **CE20** sont  
 3 comparables à celles des DAases naturelles. En effet, l'**effica-**  
 4 **cité catalytique (EC)** de **CE20** ( $540 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) est comparable  
 5 à celle de MaDA ( $120 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), la seule DAase catalysant une  
 6 réaction de DA intermoléculaire (§ 3.1).

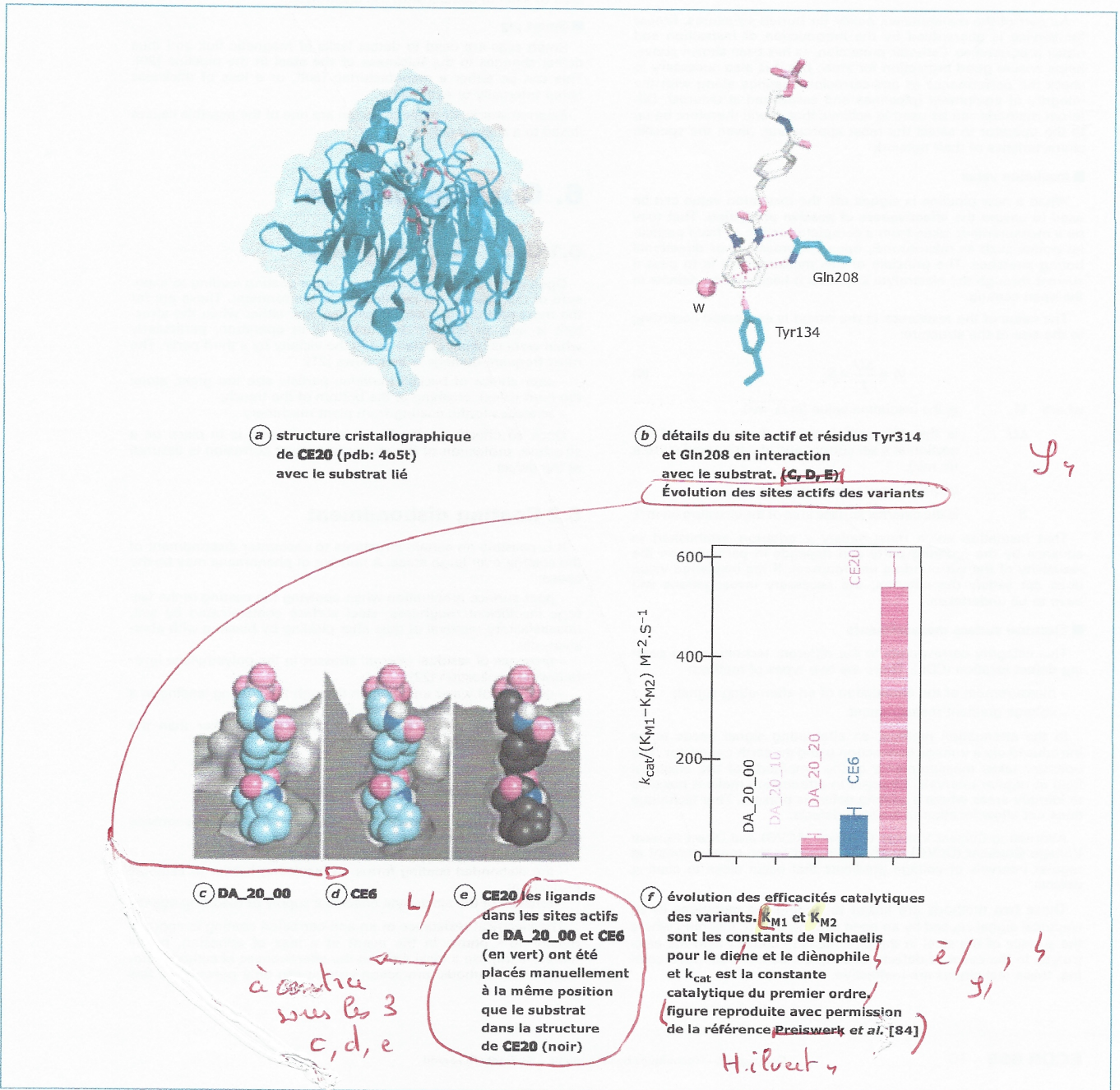


Figure 14 – Comparaison des DAases générées *in silico*

1 L'évolution dirigée est une biotechnologie mimant l'évo-  
 2 lution naturelle de façon accélérée afin de modifier les pro-  
 3 priétés d'une protéine par modification de la séquence de  
 4 son gène et sélection des variants désirés. L'évolution diri-  
 5 gée consiste à créer de la diversité génétique à partir d'un  
 6 gène initial et à sélectionner les meilleurs variants pour une  
 7 propriété donnée (stabilité, activité, etc.). Il existe plusieurs  
 8 techniques pour créer de la diversité génétique.  
 9

la ↘

10  
 11  
 12 **Error-prone PCR (ePCR)** est une méthode de PCR  
 13 (*Polymerase Chain Reaction*) utilisant une polymérase peu  
 14 fidèle permettant de générer des mutations aléatoires dans  
 15 une séquence d'ADN.  
 16

17  
 18  
 19 L'efficacité catalytique (EC) est le rapport entre la  
 20 vitesse du premier ordre  $k_{cat}$  ( $s^{-1}$ ) et le produit des  
 21 constantes de Michaelis du diène ( $K_{Mdiene}$ ,  $M^{-1}$ ) et du  
 22 diénophile ( $K_{Mdiénophile}$ ,  $M^{-1}$ ).  
 23

e/

## 24 4.3 Opportunités et limites

25  
 26 La conception *in silico* d'enzymes artificielles a abouti, après  
 27 plusieurs optimisations successives, à des exemples de DAases  
 28 artificielles remarquables présentant des propriétés cinétiques  
 29 comparables à celles des enzymes naturelles. Ceci a été accom-  
 30 pli grâce à (i) la conception pertinente d'une enzyme *in silico* et  
 31 (ii) différentes étapes d'optimisation (*in silico* et par évolution  
 32 dirigée). Ceci permet de souligner l'importance des techniques  
 33 d'évolution et d'optimisation dans la conception de biocataly-  
 34 seurs efficaces. Il est à noter que, au travers du jeu en ligne  
 35 Foldit, la créativité humaine et la production participative ont  
 36 permis de répondre avec succès à un défi à l'échelle moléculaire.  
 37 Cette approche est désormais utilisée à plus large échelle. En  
 38 effet, la conception *in silico* d'enzymes se retrouve régulièrement  
 39 face à de nouveaux défis, qui sont proposés aux joueurs de Foldit  
 40 (environ 200 000 joueurs en 2012 et plus de 850 000 joueurs en  
 41 2021). Il est notamment actuellement proposé aux joueurs de  
 42 concevoir une protéine avec une activité antivirale contre le  
 43 coronavirus SARS-cov-2.  
 44

97

45  
 46 Malgré les perspectives offertes par les anticorps catalytiques  
 47 pour la catalyse des réactions DA, cette approche est limitée à  
 48 une seule famille de structure protéique, et a été abandonnée  
 49 au profit de la conception *in silico* d'enzymes artificielles. En  
 50 effet, la difficile synthèse des molécules d'haptène, la produc-  
 51 tion d'anticorps monoclonaux spécifiques par immunisation de  
 52 mammifères ainsi que l'impossibilité à optimiser les catalyseurs  
 53 obtenus apparaissent comme des limitations sévères au dével-  
 54 oppement de DAases à base d'anticorps. Cependant, cette  
 55 approche pourrait redevenir intéressante à la lumière des pro-  
 56 grès récents dans la production d'anticorps monoclonaux par la  
 57 technologie de *phage display*, contournant ainsi le long proces-  
 58 sus d'immunisation et offrant la possibilité de faire évoluer les  
 59 anticorps vers de meilleurs catalyseurs [85].  
 60

↘, ↘

61  
 62 La technologie de **phage display** est une technique de  
 63 microbiologie modifiant le génome d'un bactériophage par  
 64 fusion d'un gène d'une protéine de surface du virus avec un  
 65 gène codant pour des protéines souhaitées. Ces protéines se  
 66 trouvent exprimées et ainsi affichées à la surface des virus  
 67 permettant leur criblage pour une propriété recherchée.  
 68

### À retenir

- La production d'anticorps monoclonaux contre un analogue stable de l'ET a permis la production d'anticorps catalytiques ou AbZymes capables de catalyser sélectivement et efficacement la réaction de DA.
- La détermination *in silico* de théozymes (sites actifs minimaux contenant les résidus d'acides aminés sélectionnés pour stabiliser l'ET), associée à des méthodes d'évolution dirigée des protéines a permis l'élaboration de DAases artificielles avec des activités encore supérieures.

## 5. Métallo-Diels-Aldérase Artificielles

À notre connaissance, aucune métallo-DAase naturelle n'a encore été mise en évidence. En effet, alors que la macrophosphate synthase contenant du magnésium(II) avait été initialement considérée comme une métallo-DAase, il a été démontré plus tard qu'elle catalysait une addition séquentielle de type Michael-aldol [86] [87]. Néanmoins, les premières hypothèses proposant que le mécanisme de fonctionnement de cette enzyme implique la coordination bidentate du diénophile sur le magnésium(II) ont certainement inspiré la préparation de métallo-DAases artificielles. La grande majorité de ces dernières ont été conçues pour la catalyse de la cycloaddition de 2-azachalcones (**8a-f**) sur des cyclopentadiène (CP) (figure 15). Le mécanisme de catalyse proposé débute par la coordination bidente du diénophile **8a-f** sur le centre métallique par l'azote et l'oxygène des groupements pyridine et carbonyle, respectivement. En raison de l'acidité de Lewis du métal, cette coordination appauvrit le diénophile en électrons et le rend donc plus réactif (figure 2). Comme il a été démontré que le cuivre(II) était le métal de transition biocompatible le plus efficace pour la catalyse de cette cycloaddition, la plupart des métallo-DAases artificielles ont été préparées en incorporant du cuivre (II) ou ses complexes dans des protéines (§ 2).

### 5.1 Utilisation de cavités protéiques

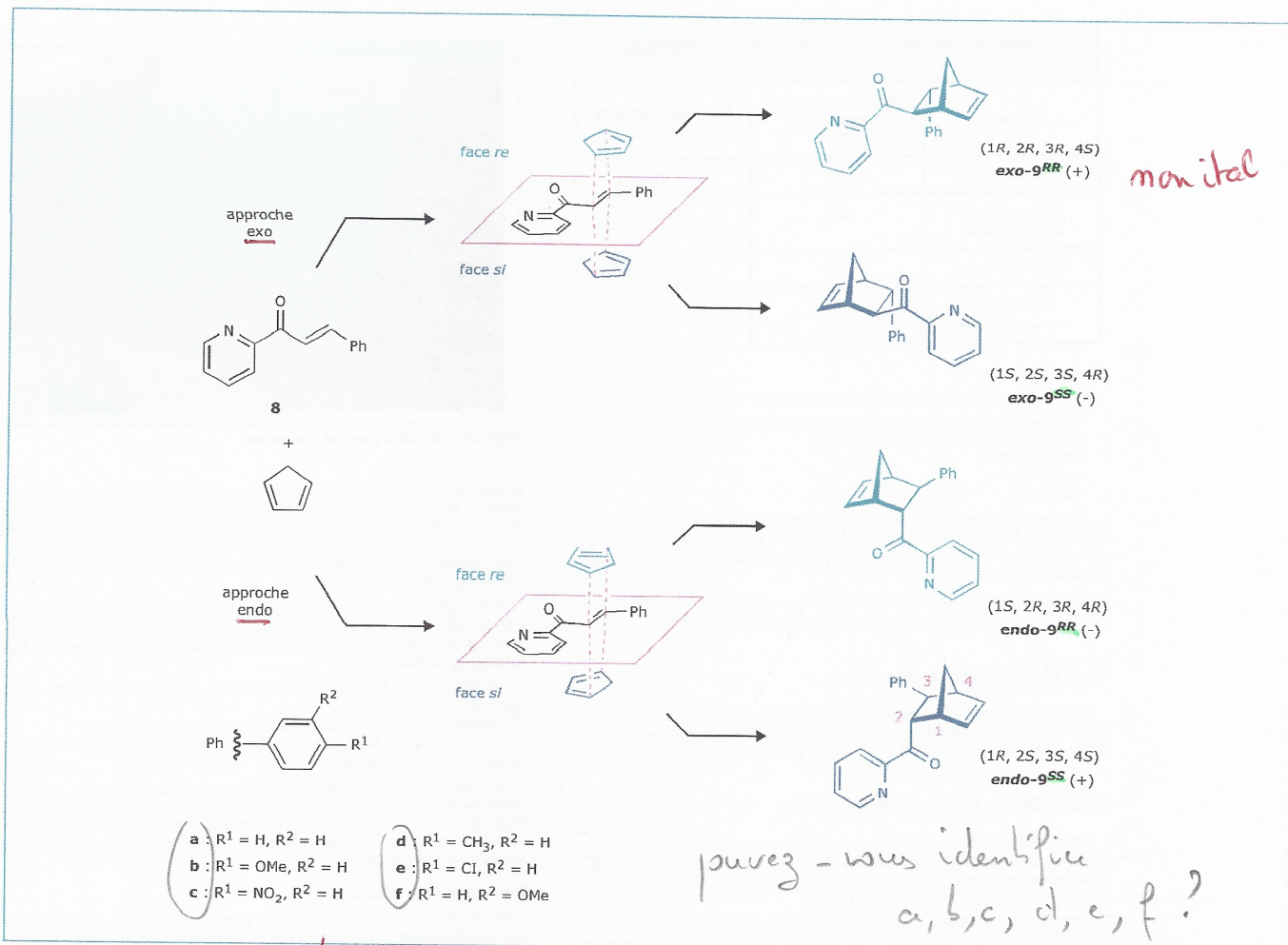
Ce paragraphe décrit quelques exemples majeurs d'enzymes artificielles obtenues en incorporant des métaux de transition ou leurs complexes dans des protéines. Il existe trois stratégies pour préparer de telles métallo-enzymes artificielles :

- l'ancrage supramoléculaire d'un cofacteur métallique dans une protéine *via* la stratégie « hôte-invité » ou la stratégie « cheval de Troie »
- l'ancrage par liaison covalente d'un cofacteur métallique à une protéine (et)
- l'insertion d'un ion inorganique dans une protéine par liaisons de coordination (figure 16).

#### 5.1.1 Ancrage supramoléculaire

L'insertion supramoléculaire de cofacteurs métalliques dans les protéines peut être réalisée en suivant soit la stratégie « hôte-invité », soit la stratégie « du cheval de Troie » (figure 17a et 17b). La première stratégie repose sur l'affinité intrinsèque d'une protéine pour un cofacteur métallique tandis que la seconde repose sur la liaison covalente du cofacteur métallique à une entité connue pour se lier fortement à la protéine hôte.

■ Le premier exemple de métallo-DAase artificielle préparée en suivant la stratégie hôte-invité a été rapporté par Reetz *et al.* [88]. Puisque les albumines sont des protéines qui



45 **Figure 15 - Diastéréo- et énantiosélectivités de la réaction DA des 2-azachalcones (8a-f) et le cyclopentadiène (CP)**

46  
47  
48 peuvent lier différentes molécules, notamment les complexes  
49 métalliques, un complexe de phtalocyanine de cuivre(II)  
50 hydrosoluble (**10**) (figure 17) a été incorporé dans différentes  
51 albumines sériques. Pour la métallo-DAase à base d'albumine  
52 de sérum bovin (BSA **10**), les produits de la réaction  
53 de DA ont été obtenus avec une conversion de 80 %, un  
54 rapport *endo:exo* de 96:4 et un excès énantiomérique (*ee*)  
55 de 93 % (Tableau 2, entrée 1). La catalyse a ensuite été  
56 explorée avec d'autres sources d'albumine sérique en particu-  
57 lier humaines et porcines (HSA et PSA). Les métallo-  
58 protéines obtenues ont fourni des conversions atteignant  
59 respectivement 89 et 87 %, mais sans amélioration ni du rap-  
60 port *endo:exo* ni de l'*ee*. La DAase BSA **10** a ensuite été uti-  
61 lisée pour cribler la réaction avec les autres substrats (**8b-e**).  
62 C'est pour le diénophile **8d** que les meilleurs résultats ont été  
63 obtenus avec 91 % de conversion et un *ee* de 98 %.

64  
65 La stratégie du cheval de Troie a été utilisée avec succès  
66 pour générer une métallo-DAase basée sur un variant de la  
67 néocarzinostatine (NCS) [89]. La NCS est un membre de la  
68 famille des énediynes-chromoprotéines qui lient un chromophore

17a 4

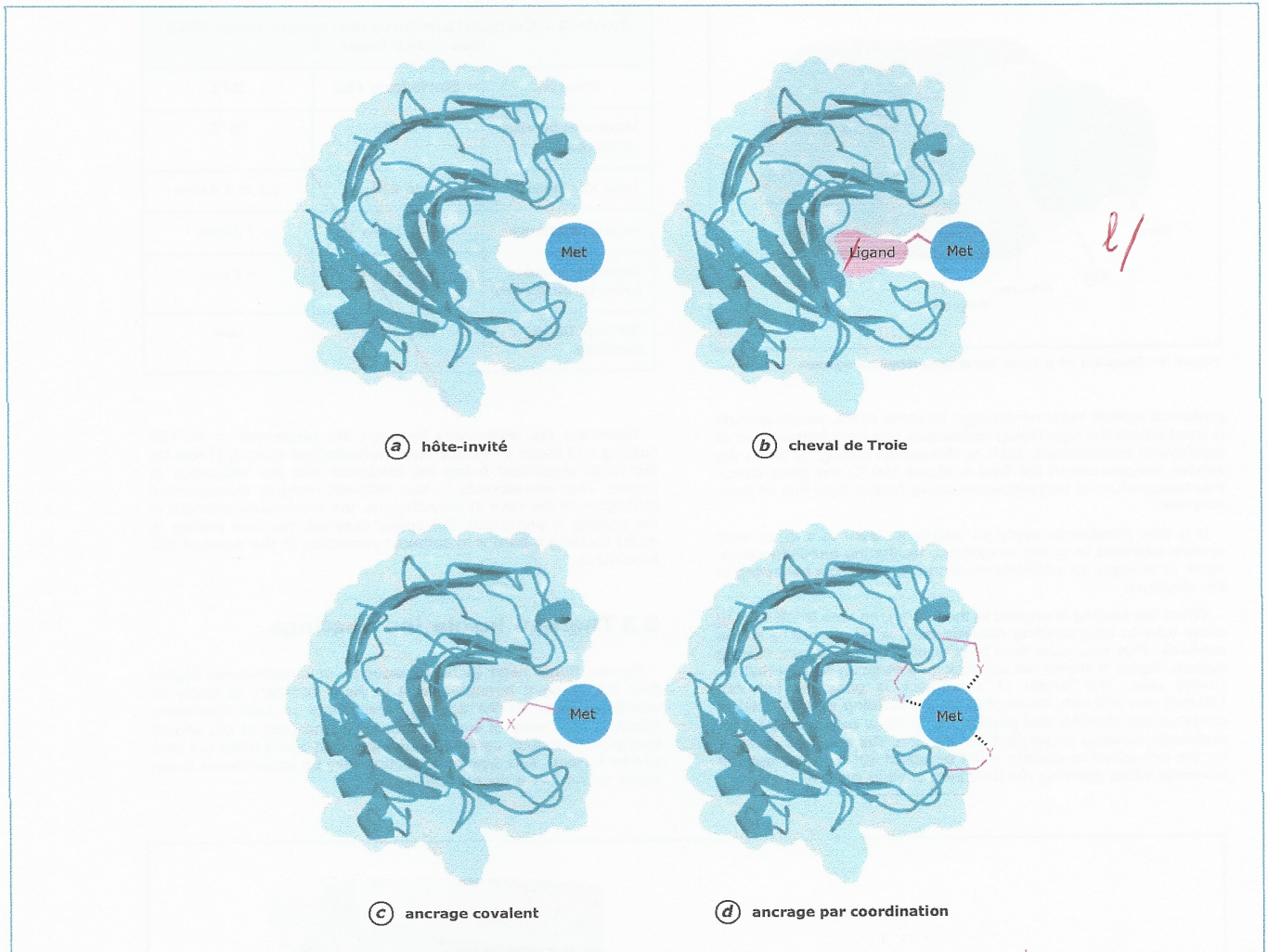


Figure 16 - Les différentes stratégies utilisées pour préparer des Diels-Aldères artificielles

énédiyne spécifique. Un variant de la NCS (NCS-3.24) a été développé pour changer son affinité pour son chromophore énédiyne naturel en affinité pour la testostérone. La NCS-3.24 a été placée en présence d'un complexe 1,10-phénanthroline de cuivre(II) lié à la testostérone (**11a**) (figure 18). La formation de l'enzyme artificielle (NCS-3.24 **11a**) a été mise en évidence par l'extinction de la fluorescence intrinsèque de la protéine lors de la liaison du conjugué testostérone-complexe de cuivre(II) (**11a**). La catalyse de la cycloaddition de **8a** et CP par NCS-3.24 **11a** a fourni des produits avec 83 % de conversion, un rapport *endo:exo* de 81:19, mais sans ee (tableau 2, entrée 2). La modélisation moléculaire a révélé que le complexe métallique était situé à la surface de la protéine interagissant avec seulement quelques résidus d'acides aminés, rationalisant ainsi la mauvaise sélectivité de la réaction.

Ghantas *et al.* ont préparé et caractérisé une métalloenzyme artificielle basée sur le récepteur d'adénosine A<sub>2A</sub> intégré dans la membrane cytoplasmique de cellules humaines vivantes. [90]

Ma n'est pas indiqué sur la figure 18

le tableau 2 est à placer entre la figure 17 et la figure 18

Tableau 2 – Diastéréo- et énantio-sélectivités obtenues par la catalyse de la réaction de DA de **8a** et le cyclopentadiène par les différentes métalloDAases artificielles

Entrée	Catalyseur	$K_{cat}$ ou $k_{obs}$ [T°C]	Conversion (%)	Rapport endo:exo	Excès énantiomérique (%)
1	BSA <b>c 10</b>	$3,7 \times 10^{-3} M^{-1} \cdot min^{-1}$ / [3 °C]	80	96:4	93 (nd)
2	NCS-3.24 <b>c 11a</b>	$0,11 M^{-1} \cdot min^{-1}$ / [4 °C]	83	81:19	pas d'ee
3	A <sub>2A</sub> <b>c 11b</b>	Nd	28	82:18	19 ( <b>endo-13<sup>RR</sup></b> )
4	SCP-2L_V83C- <b>13</b> SCP-2L_V83C- <b>14</b> SCP-2L_A100C- <b>13</b> SCP-2L_A100C- <b>14</b>	Nd	19	88:12	25 ( <b>endo-13<sup>SS</sup></b> )
			87	93:7	4 ( <b>endo-13<sup>SS</sup></b> )
			43	92:8	pas d'ee
			76	95:5	5 ( <b>endo-13<sup>RR</sup></b> )
5	FhuA- <b>15a</b> FhuA- <b>15b</b> FhuA- <b>15c</b>	Nd	64	98:2	pas d'ee
			69	96:4	
			15	66:34	
6	GTL_S114C- <b>16</b> GTL_S196C- <b>16</b>	Nd	99	99:1	18 ( <b>endo-13<sup>RR</sup></b> )
			98	99:1	92 ( <b>endo-13<sup>RR</sup></b> )
7	LmrR_M89C- <b>16</b> LmrR_M89C- <b>17</b>	Nd	55	63:37	66 ( <b>endo-13<sup>RR</sup></b> ) ;
			93	95:5	90 ( <b>exo</b> ) 97 ( <b>endo-13<sup>SS</sup></b> )
8	A3_Y26C- <b>16</b> A3_F119C- <b>16</b> A3_A3')_F119C- <b>16</b> (A3_A3')_F119C- <b>18</b>	Nd	16	92:8	7.5 ( <b>endo-13<sup>RR</sup></b> )
			11	86:14	62 ( <b>endo-13<sup>RR</sup></b> )
			15	93:7	52 ( <b>endo-13<sup>RR</sup></b> )
			38	92:8	5 ( <b>endo-13<sup>RR</sup></b> )
9	tHisF-HHD	Nd	73	93:7	46 (nd)
10	mTFP <sup>EHH</sup> mTFP <sup>CHH</sup> mTFP <sup>CHH</sup> [pH = 6]	Nd	99	92:8	15 (nd)
			89	94:6	< 4 (nd)
			97	93:7	26 ( <b>endo-13<sup>SS</sup></b> )
11	bPP_Y7H bPP_Y719 <sup>P</sup> bPP_Y719 <sup>m</sup>	$10,2 M^{-1} \cdot min^{-1}$ / (5 °C)	96	95:5	3
			65		6
			>99		83 ( <b>endo-13<sup>RR</sup></b> )
12	ACCO-Cu	$50 \times 10^{-3} min^{-1}$ / (4 °C)	>99	99:1	95 ( <b>endo-13<sup>RR</sup></b> )
13	NB- <b>20</b> NB4-Pyr [conf. (R)] NB6-Pyr [conf. (S)]	Nd	22	90:10	pas d'ee
			56	95:5	69 ( <b>endo-13<sup>SS</sup></b> )
			40	92:8	nd

Pour cela, la stratégie de cheval de Troie a été suivie et un **antagoniste** du récepteur a été lié de manière covalente au complexe 1,10-phénanthroline de cuivre (II) *via* un espaceur court ou un espaceur long (**11b-c**) (figure 18). L'affinité du récepteur pour ces conjugués a été évaluée par compétition avec un radioligand et des constantes de l'ordre du nanomolaire, similaires ainsi à celle de l'antagoniste initial, ont pu être mesurées. De plus, le temps de résidence des conjugués dans le récepteur a été estimé à plus de trois jours en utilisant une approche de microscopie de fluorescence. Les cellules portant les enzymes artificielles ont été utilisées pour catalyser la cycloaddition de DA de **8a-c** et CP. Les résultats ont révélé qu'aucune sélectivité n'était observée avec le conjugué le plus long (**11c**), suggérant que le complexe se trouvait à l'extérieur de la poche de liaison du récepteur. Avec le conjugué le plus court (**11b**), un ee de 28 % a été relevé avec le substrat **8c** (tableau 2, entrée 3).

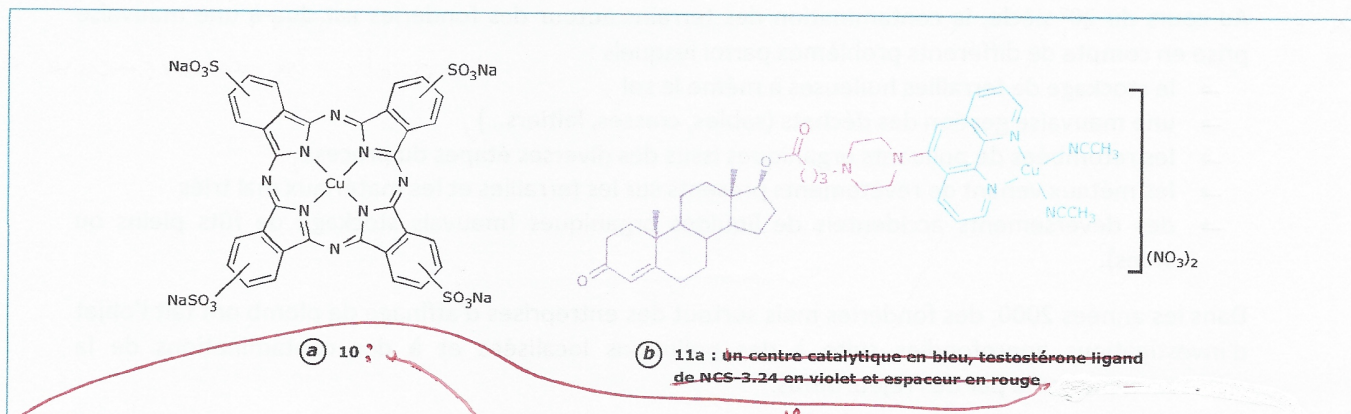


Figure 17 - Complexe phthalocyanine-cuivre(II) utilisé en association avec l'albumine sérique et la molécule cheval de Troie (11) utilisée en association avec la NCS-3.24 un centre catalytique en bleu, testosterone ligand de NCS-3.24 en violet et espaceur en rouge

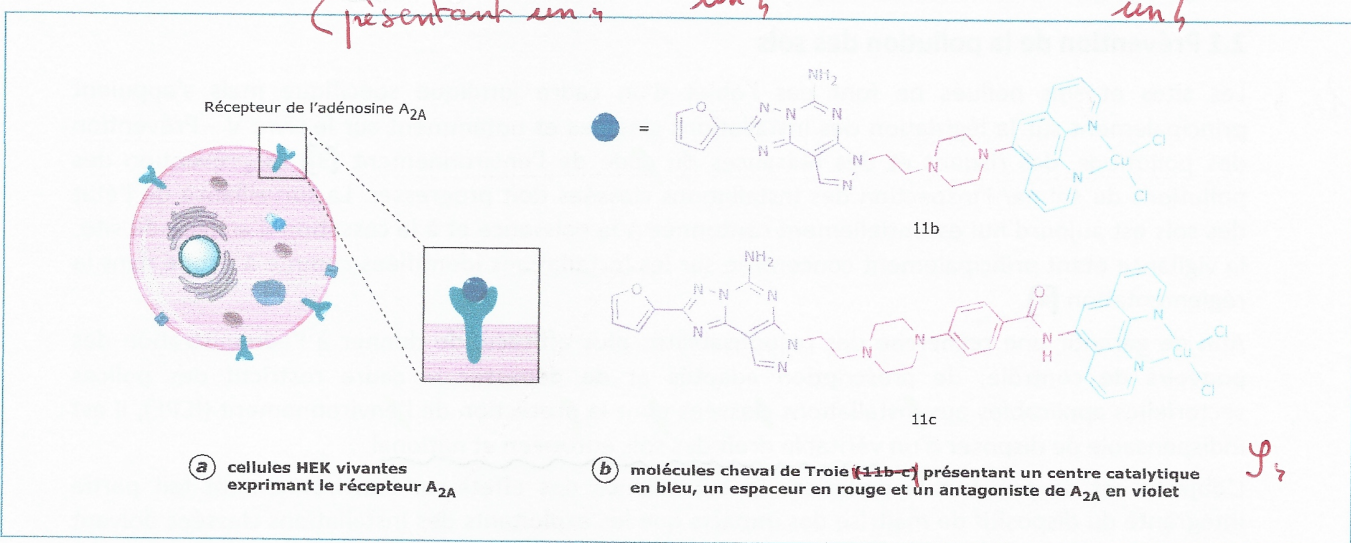


Figure 18 - Métallo-DAases artificielles basées sur le récepteur de l'adénosine A<sub>2A</sub> intégré dans les membranes cytoplasmiques de cellules humaines vivantes

Un antagoniste d'un récepteur membranaire ou nucléaire est une molécule qui interagit avec ce récepteur pour bloquer la liaison de son agoniste naturel diminuant ainsi l'effet physiologique de ce dernier.

### 5.1.2 Ancrage covalent

Cette stratégie repose sur la réaction d'une chaîne latérale d'un résidu d'acide aminé de la protéine hôte, généralement la fonction thiol d'un résidu cystéine (soit déjà présent, soit introduit par mutagenèse dirigée), avec des ligands ou complexes contenant un substituant maléimide ou un halogénoalkyle. Cette **bioconjugaison** a été employée avec les ligands 2,2'-bipyridine, 1,10-phénanthroline, et terpyridine. Même si, dans quelques cas, l'ancrage direct des complexes sur la protéine hôte est effectué, dans la majorité des cas, la stratégie

1 privilégiée implique la fixation covalente du ligand à la protéine hôte avant l'ajout de l'ion métallique (cuivre (II) généralement).

2  
3  
4  
5 La **bioconjugaison** est une stratégie chimique aboutissant à la formation d'une liaison covalente entre deux molécules dont au moins une est une biomolécule.

6  
7  
8  
9  
10 **5.1.2.1 Ancrage covalent dans des cavités naturelles de protéines**

11 Une métallo-DAase artificielle a été préparée en utilisant un complexe-( $\eta^6$ -arène) de ruthénium (II) (12) et la papaine comme matrice protéique (figure 19a) [91]. La réactivité de cette métalloenzyme artificielle a été évaluée pour la catalyse de la réaction de DA entre l'acroléine et CP. L'environnement protéique a en effet accéléré la réaction (à 0,2 mol% de charge,  $k_{obs} = 14,6 \times 10^{-3} \cdot \text{min}^{-1}$  et ME  $\sim 3$  M), mais aucun ee n'a été détecté. Ceci a été expliqué par le fait que le résidu cystéine qui était utilisé pour lier le complexe était situé à l'entrée de la poche catalytique à la surface de la protéine, le complexe ancré et les substrats pouvant alors seulement interagir avec quelques résidus protéiques, ce qui conduisait à un mauvais contrôle de la sélectivité de la réaction. Ce travail illustre l'importance de la protéine comme matrice, ainsi que le choix de la position d'ancrage du complexe.

28 Plusieurs matrices protéiques ont été ensuite utilisées pour ancrer des catalyseurs et un bon nombre de DAs artificielles ont été évaluées pour la catalyse de la réaction modèle de cycloaddition DA des 2-azachalcones (8a-f) et CP.

29  
30  
31  
32 Kamer *et al.* ont utilisé la cavité hydrophobe de forme cylindrique du domaine de type 2 de la protéine de transport de stérol (SCP-2L) de l'enzyme multifonctionnelle de type 2 (MFE-2) comme matrice protéique pour l'ancrage covalent de complexes métalliques. Pour cela les résidus cystéines issus des variants V83C et A100C ont été liés à la 1,10-phénanthroline (13) ou à la dipicolylamine (14) portant une fonction maléimide. Après métallation avec du cuivre(II), les métallo-DAases artificielles correspondantes ont fourni des performances catalytiques plutôt modestes (figure 19b, tableau 2 entrée 4) [92].

33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43 Le groupe d'Okuda a utilisé une variante relativement robuste du composant A de la protéine transmembranaire de transport de l'hydroxamate Ferrique (FhuA) pour préparer des métallo-DAases artificielles. L'unique résidu cystéine de FhuA, C545, a été conjugué avec des complexes de terpyridine de cuivre(II) portant des espaceurs plus ou moins longs entre la terpyridine et le groupement maléimide (15a-c). Le meilleur rendement a été obtenu avec l'enzyme comprenant l'espaceur le plus court, probablement à cause d'une faible flexibilité du complexe métallique dans le cœur du tonneau  $\beta$  de la protéine. Néanmoins, aucune énantiosélectivité n'a été observée suggérant qu'il n'y avait pas d'orientation préférentielle des substrats dans le tonneau  $\beta$  de FhuA (figure 19c) (tableau 2, entrée 5) [93].

44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57 Dans une approche originale, Palomo et ses collaborateurs ont généré une grande quantité d'une métallo-DAase artificielle en conjuguant le complexe 1,10-phénanthroline de cuivre(II) 16a à la lipase de *Geobacillus thermocatenulatus* (GTL) liée à des **sepabeads** (environ 10 mg par g de sepabeads, qui sont des polymères sphériques absorbants et fonctionnalisés développés par la société Mitsubishi). Premièrement, les deux cystéines natives de GTL ont été éliminées par mutagenèse dirigée et un résidu cystéine a été introduit soit au niveau du site catalytique (S114C), ou dans une poche (S196C) qui était suspectée, par modélisation moléculaire, être bien adaptée pour accueillir les substrats. Deuxièmement, les variantes enzymatiques ont été

surexprimées et purifiées par immobilisation sur sepabeads via une liaison covalente unique au NH<sub>2</sub>-terminal de la protéine (SB-NH<sub>2</sub>) ou via une liaison covalente multiple à une région riche en lysines de la surface protéique (SB-Lys). Enfin, l'introduction du complexe (**16a**) a conduit aux métalloenzymes artificielles immobilisées. La catalyse a été testée pour la cycloaddition DA de **8a** et CP. Pour les deux variantes, l'immobilisation à travers la région riche en lysines a abouti aux meilleurs résultats. En particulier, l'enzyme artificielle SB-lys-GTL296-16 a fourni une conversion de 98 % un rapport *endo/exo* de 93:7 et 92 % *ee* (figure **19d**, tableau 2 entrée 6) [94]. Ce résultat reflète de nouveau l'importance de la modélisation moléculaire dans la conception des enzymes artificielles.

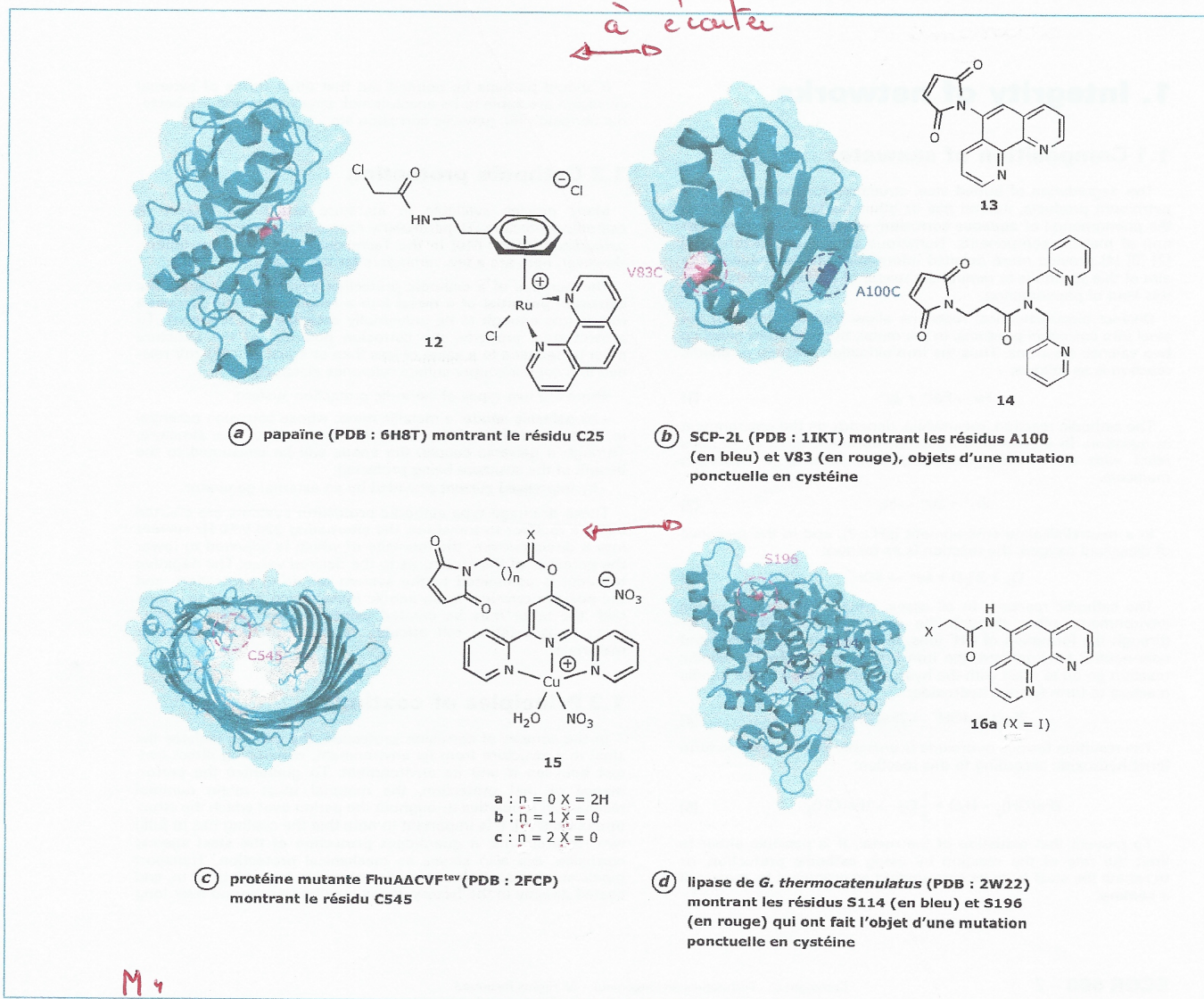


Figure 19 - Les matrices protéiques utilisées dans les DAases artificielles avec, à gauche, des ligands ou des complexes métalliques greffés sur les résidus de la protéine mis en évidence

M4  
 qui ont été

1 **5.1.2.2 Ancrage covalent dans des cavités générées**  
 2 **à l'interface de dimères protéiques**

3 Une autre façon de concevoir des métallo-DAases artificielles  
 4 repose sur l'insertion du complexe métallique dans les poches  
 5 hydrophobes générées aux interfaces de dimères de protéines.  
 6

7 Deux exemples utilisant cette approche ont été rapportés  
 8 dans la littérature. Le groupe de Roelfes a utilisé le régulateur  
 9 de résistance multidrogue lactococcique (LmrR) pour générer  
 10 des métallo-DAases artificielles contenant du cuivre [95]. Un  
 11 résidu cystéine a été introduit par mutagenèse dirigée (M89C)  
 12 pour permettre la liaison des ligands dérivés de 1,10-phénan-  
 13 throline ou de 2,2'-bipyridine portant des groupes fonctionnels  
 14 bromoacétamide (**16b** et **17**), (figure **20a**). Étant donné que  
 15 LmrR dimérise en solution, la mutation a été choisie afin  
 16 d'introduire deux complexes de cuivre (II) à l'interface du  
 17 dimère à une distance suffisamment grande l'un de l'autre pour  
 18 éviter une interaction complexe-complexe. Chaque dimère de  
 19 protéine fournit ainsi deux catalyseurs DA indépendants. Après  
 20 métallation avec du cuivre(II), la catalyse a été testée sur les  
 21 substrats **8a**, **8e** ou **8f** et CP. C'est la métallo-DAase artificielle  
 22 à base de 1,10-phénanthroline (LmR\_M89C-**16**) qui s'est avé-  
 23 rée la plus efficace. Le meilleur résultat a été obtenu avec le  
 24 substrat **8a** (tableau 2, entrée 7). Il est intéressant de noter  
 25 que LmrR\_M89C-**17**, basé sur la 2,2'-bipyridine, a conduit à  
 26 l'énantiomère opposé *endo-9<sup>RR</sup>* avec *ee* de 66%. Ce résultat  
 27 met en évidence l'importance des rôles synergiques du com-  
 28 plexe et de la protéine hôte dans le contrôle de la sélectivité.  
 29

30 Di Meo *et al.* [96] ont préparé des enzymes artificielles, y  
 31 compris des DAases à l'aide de  $\alpha$ RepA3, un membre d'une  
 32 famille de protéines artificielles basées sur un motif répété  
 33 hélicoïdal  $\alpha$  thermostable [96] ;  $\alpha$ RepA3 forme un dimère stable  
 34 avec une large cavité dans laquelle deux positions, une sur  
 35 l'extérieur de la cavité (Y26) et une au centre (F119) ont été  
 36 changées indépendamment en résidus cystéine. Un ligand  
 37 1,10-phénanthroline portant un groupement bromoacétamide  
 38 (**16b**) a été attaché de manière covalente à la cystéine de chaque  
 39 variant de la protéine (figure **20b**). L'enzyme A3\_Y26C-**16** porte  
 40 donc deux ligands situés sur les bords de la cavité (C26) et peut  
 41 coordonner deux équivalents de cuivre(II) par dimère. Les pro-  
 42 priétés catalytiques de cette métallo-DAase se sont avérées  
 43 décevantes avec un faible *ee* (tableau 2, entrée 8). D'autre part,  
 44 la fonctionnalisation des cystéines C119 du centre de la cavité  
 45 (A3\_F119C-**16**) conduit à une métalloprotéine où un seul ion  
 46 cuivre(II) est coordonné par les deux ligands phénanthroline  
 47 fournis par les deux monomères indépendants. Ceci est en  
 48 accord avec la faible conversion observée en catalyse, l'ion  
 49 cuivre(II) présentant une sphère de coordination saturée est  
 50 incapable d'interagir avec le substrat **8a**. Afin d'améliorer l'effica-  
 51 cité du système, une enzyme chimérique formée par le domaine  
 52 A3 natif et A3\_F119C portant une seule cystéine a été générée  
 53 [97]. Après bioconjugaison avec la phénanthroline et métallation  
 54 par le cuivre(II), (A3\_A3')\_F119C-**16** ne contient qu'un seul  
 55 équivalent cuivre (II). Cependant, bien qu'une conversion accrue  
 56 ait été obtenue, la présence d'un seul ligand phénanthroline dans  
 57 la cavité a diminué les contraintes stériques, ce qui expliquerait  
 58 la chute de l'*ee* à 5 %. En utilisant le ligand terpyridine (**18**) plus  
 59 volumineux, la métalloDAase (A3\_A3') F119C-**18** a conduit à  
 60 une conversion moindre mais un *ee* de 52 %.  
 61  
 62

*Les 4*

*intelliges*

*à 4*

63 **5.1.3 Ancrage par coordination**

64 Cette stratégie d'introduction d'un cation métallique dans une  
 65 matrice protéique repose sur l'utilisation de ligands protéiques  
 66 endogènes, par exemple, ceux du site actif d'une métalloprotéine  
 67 (sous sa forme *apo*), soit ceux artificiellement introduits par  
 68 mutagenèse dirigée.

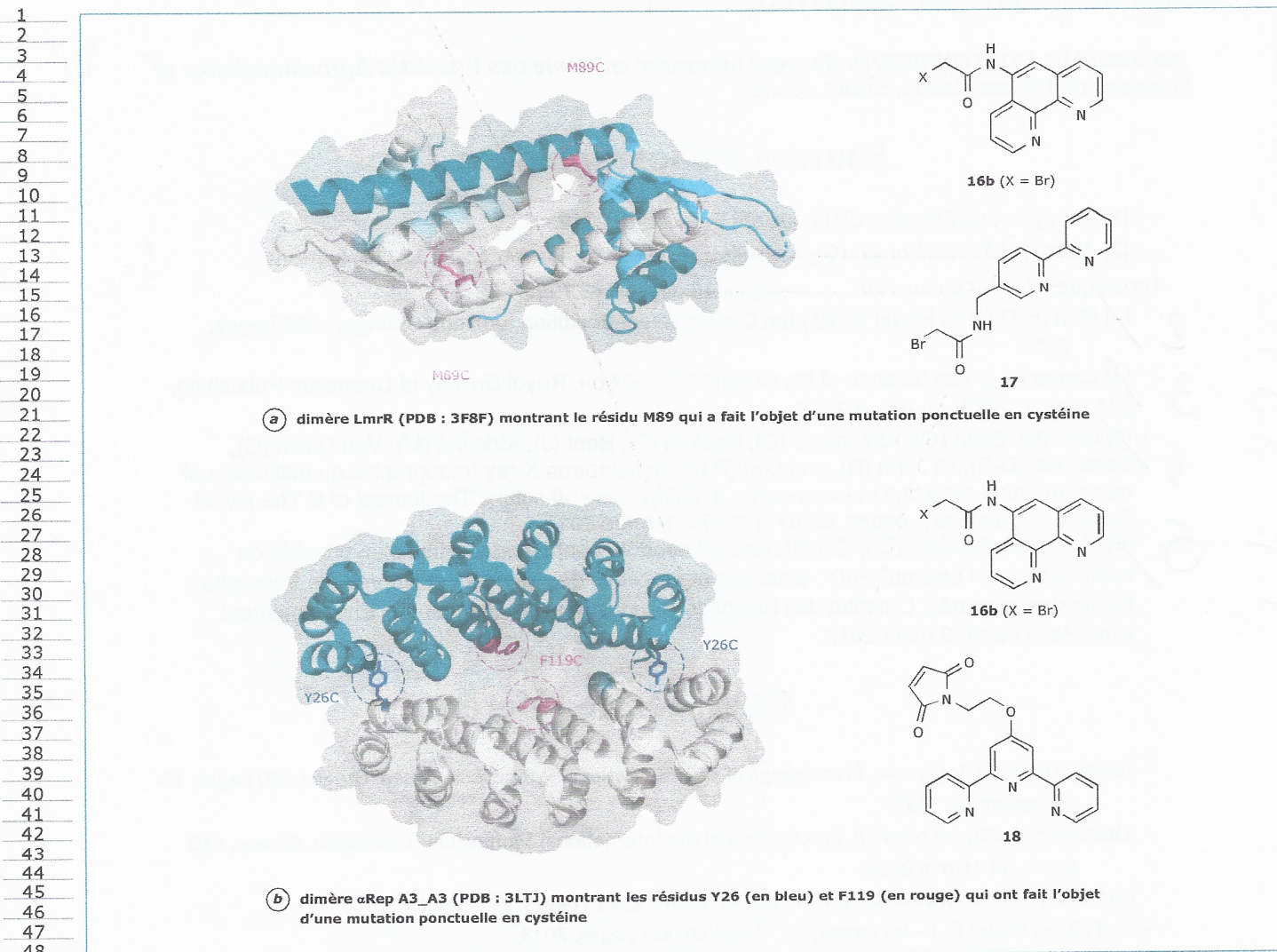


Figure 20 – Deux exemples de DAases artificielles obtenues par ancrage covalent de complexes de cuivre au sein de la cavité hydrophobe générée à l'interface de dimères protéiques

53 **5.1.3.1 Site de coordination introduit par mutagenèse**

54 Inspirés par les sites naturels de liaison des métaux de transition, Reetz *et al.* [98] ont muté la sous-unité synthase thermostable de l'imidazole glycérol phosphate synthase (tHisF) de *Thermotoga maritima* pour obtenir un site du type His/His/Asp capable de lier un ion cuivre(II). En parallèle, tous les autres résidus histidine ont été mutés en alanine pour éviter la liaison non spécifique du cuivre en dehors du site actif artificiel. La catalyse de la cycloaddition de DA de **8a** et de **CP** par l'enzyme modifiée a abouti à une conversion allant jusqu'à 73 %, un rapport *endo/exo* de 93:7 et un *ee* de 46 % (tableau 2, entrée 9).

55 En suivant une approche similaire, Fischer *et al.*, ont utilisé une version monomérique, pH- et thermo-stable de la protéine fluorescente *Clavularia* (mTFP1) [99]. Des expériences de mutagenèse ont d'abord été réalisées pour éliminer les résidus

56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68

d'histidine et méthionine natifs et pour supprimer les séquences flexibles N- et C-terminales. Les variants I197C/Y200H/Y204H (mTFP<sup>CHH</sup>) et I197E/Y200H/Y204H (mTFP<sup>EHH</sup>) ont été générés, et les protéines contenant du cuivre ont été utilisées pour catalyser la cycloaddition de **8a** et CP à différents pH allant de 3,5 à 7,5. Les deux enzymes artificielles sont faiblement énantio- et régiosélectivités. Des mutations supplémentaires ont été introduites dans mTFP<sup>CHH</sup> au bord de la poche catalytique. Ces changements au sein de la seconde sphère de coordination ont conduit à une augmentation de l'ee de 4 à 26 % à pH 6 (tableau 2, entrée 10).

Un troisième exemple a été obtenu en utilisant le polypeptide pancréatique bovin (bPP), une petite hormone de 36 acides aminés qui adopte une structure dimérique en solution (figure 21) [100]. Après suppression des résidus 31 à 36 qui induisent une perturbation de la structuration de la bPP, des acides aminés coordonnants ont été introduits pour permettre l'injection du cuivre(II) [101]. Ainsi, en se basant sur de la modélisation moléculaire [102], la tyrosine Y7 a été remplacée par des acides aminés tels qu'une histidine, ou des acides aminés non protéinogènes 3- et 4-pyridylalanine (**19<sup>m</sup>** et **19<sup>p</sup>**). La position 7 est située à l'interface du dimère et à une distance de la deuxième sous-unité qui permet la coordination des deux résidus à un seul cation métallique. En utilisant les variants bPP\_Y7H et bPP\_Y7**19<sup>p</sup>**, la catalyse a montré un très faible ee (tableau 2, entrée 11). En revanche, avec un rendement quantitatif et un rapport *endo/exo* de 95:5 et un ee de 83 %, le variant bPP\_Y7**19<sup>m</sup>** a conduit à une métallo-DAase très performante. Cependant, la mutation Y7X conduit à une diminution importante de la dimérisation, et dans les conditions catalytiques, le catalyseur se trouve principalement sous une forme monomérique. Dans ces conditions, comme la liaison du cuivre (II) à une seule pyridine est faible, il a été proposé qu'en plus de **19<sup>m</sup>**, d'autres résidus dans le peptide étaient probablement impliqués dans la liaison du cuivre (II).

5.1.3.2 Substitution du cation métallique endogène

Ghattacharya *et al.* ont remplacé par du Cu(II) le Fe(II) natif au site actif de l'oxydase de l'acide 1-aminocyclopropane carboxylique (ACCO) [103]. L'enzyme reconstituée au cuivre (II) (ACCO-Cu) a été utilisée pour catalyser la cycloaddition de DA de **8a-c** et CP et a fourni le produit **endo-9a<sup>RR</sup>** avec un rendement quantitatif et un ee > 99 % (tableau 2, entrée 12). Cette performance sans précédent a été rationalisée par modélisation moléculaire, qui a suggéré qu'une seule coordination de **8a**

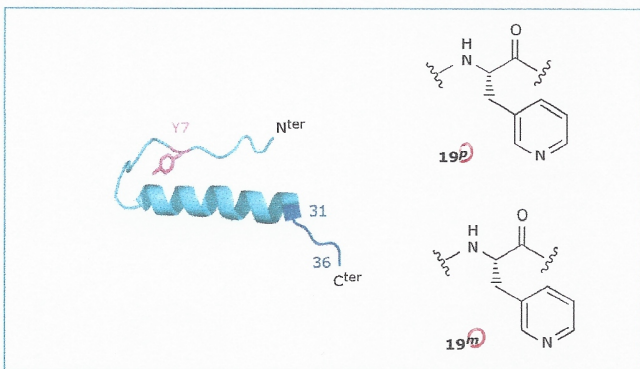


Figure 21 – Structure RMN du bPP (PDB ID: 1BBA) montrant l'hélice  $\alpha$  avec les résidus tronqués (en bleu) et le résidu Y7 (en rouge), remplacé par His ainsi que par les acides aminés non protéinogènes **19<sup>p</sup>** et **19<sup>m</sup>**

- 3

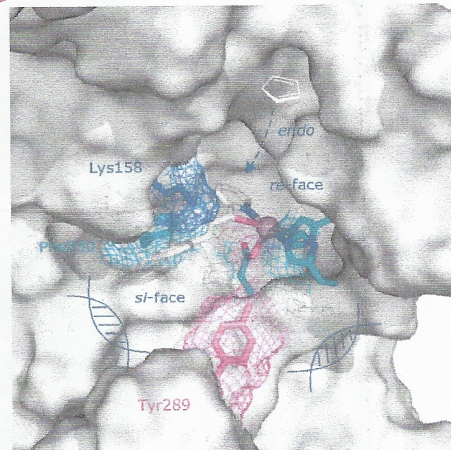
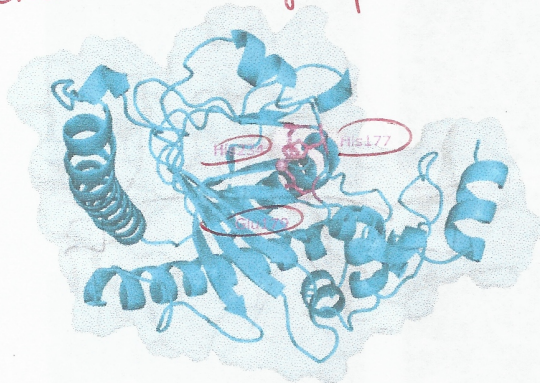
~ 3

le tableau 2 indique un ee de 95 et non > 99%

non itat

et 3

choisi un rouge plus sombre



(a) structure protéique avec les résidus His177, Glu179 et His234 (en rouge) impliqués dans la complexation du cuivre (II) (sphère orange)

(b) Approche du CP vers le substrat 8a en jaune dans le site actif de l'ACCO-Cu déduit des expériences de docking moléculaire

gr

Figure 22 – Structure cristalline de l'ACC oxydase (PDB : 1W9Y)

déduisant 4

dans le site actif était possible et qu'un seul chemin était accessible pour que le CP réagisse avec 8a ainsi positionné, menant ainsi à un seul isomère (figure 22)

5.1.4 Méthodes mixtes

Le groupe de Hayashi a développé une approche mixte entre covalente et supramoléculaire pour générer des métallo-DAases artificielles en utilisant des nitrobindines (NB) comme matrice (figure 23). Les NB appartiennent à une famille de protéines ubiquitaires présentant toutes un tonneau  $\beta$  qui comporte une cavité hydrophobe dans laquelle se trouve un cofacteur hémique relativement labile [99]. Plusieurs variants NB1-6 ont été préparés ; tous contiennent un résidu cystéine en position 96 (C96) (figure 23). Dans un premier temps, suivant une approche d'« ancrage covalent » classique, un ligand terpyridine 18 a été lié à la cystéine C96 [104]. En présence de sels de Cu(II), le variant NB4 a catalysé la réaction de DA avec des performances modestes et sans ee (tableau 2, entrée 13). Afin d'améliorer les performances des catalyseurs et contraindre les complexes de cuivre dans la poche catalytique, du N-(1-pyrényl)maléimide (20) a été ancré sur la cystéine C96. La stéréosélectivité de la réaction de greffage s'est révélée régie par les différents environnements fournis par les variants de NB1-6, le pyrène se trouvant ainsi lié dans la cavité de la protéine en conformation soit (R) soit (S), selon le variant NB (figure 23). L'affinité des protéines pour 8a est ainsi augmentée en raison des interactions entre les noyaux aromatiques du substrat et le fragment pyrène. L'addition de CP et de sel de cuivre (II) aux NB-Pyr c 8a préorganisés a conduit à la formation d'enzymes artificielles. Le variant NB4-Pyr pour laquelle la configuration (R) est privilégiée donne de meilleurs résultats avec une conversion de 56 %, un rapport endo:exo de 94:6 et 69 % ee. Le variant NB6-Pyr pour laquelle la conformation (S) est privilégiée conduit à des performances plutôt modestes.

[99] ?

Hayashi est cité dans [93] et [104]

gr

gr

Le tableau 2 indique non ee pour NB-20 et non pour NB-4 ? (sauf si je ne lis pas correctement le tableau...)

police trop grande  
≠ des autres figures

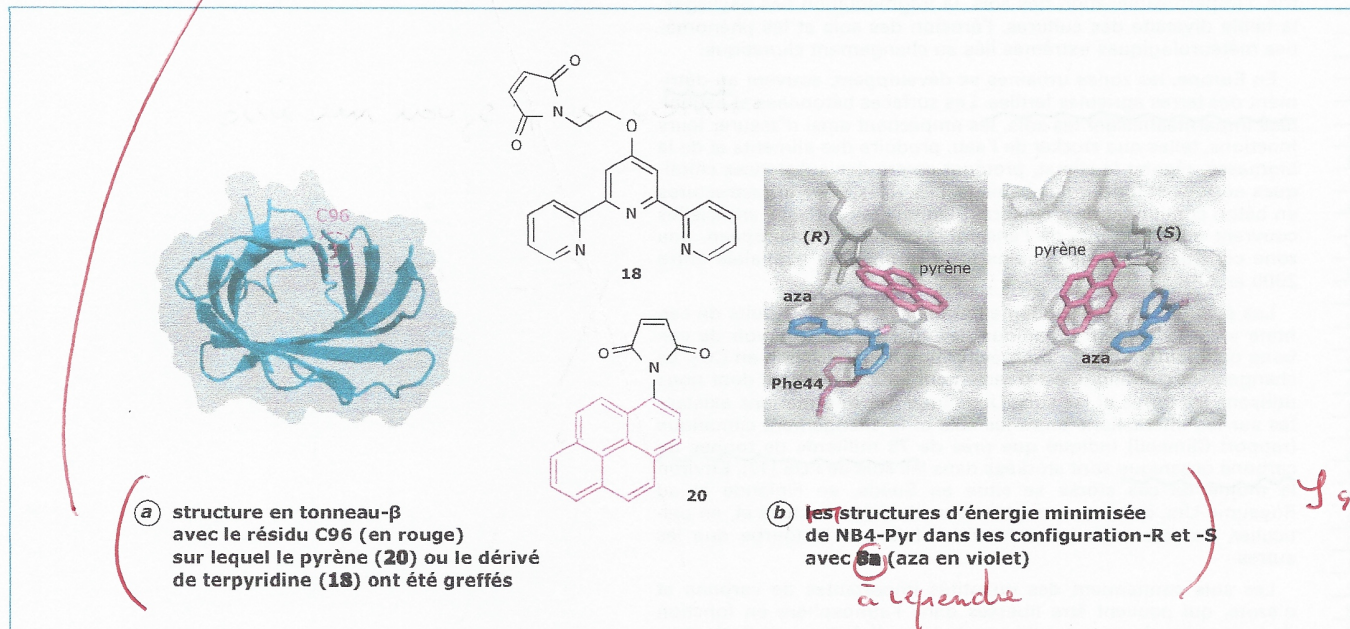


Figure 23 – Structure cristalline de la protéine nitrobindine (PDB ID: 3WJB)

## 5.2 Opportunités et limites

La stratégie la plus simple pour générer une métalloenzyme artificielle consiste en l'« ancrage par coordination » en utilisant des chaînes latérales d'acides aminés pour lier un cofacteur métallique. Les acides aminés coordonnants peuvent soit constituer un site de liaison métallique déjà existant, soit être introduits par mutagenèse. La stratégie de l'ancrage covalent du complexe conduit à un positionnement stable et précis du cofacteur métallique dans la protéine. Néanmoins, il est encore difficilement envisageable d'utiliser cette stratégie pour des applications en biocatalyse utilisant des cellules entières, car cette approche reste encore limitée par le développement d'outils de **chimie bioorthogonale** permettant la modification sélective de la protéine désirée *in vivo*. L'utilisation d'acides aminés non naturels constitue certainement un des outils majeurs pour atteindre cet objectif [105][106][107]. Enfin, l'insertion supramoléculaire d'un cofacteur métallique s'est avérée possible et a fourni avec succès des métallo-DAases pour la catalyse avec des cellules entières [90]. Ces résultats offrent des perspectives inédites pour la préparation de métalloenzymes artificielles *in vivo* à base de récepteurs confinées à un organe et permettant la catalyse de réactions exogènes. Ceux-ci pourraient être utilisés pour une synthèse ciblée en catalysant des cascades de réactions de concert avec des enzymes naturelles [108]. Il est à noter que l'une des limitations actuelles de cette stratégie est l'affinité intrinsèque que la protéine doit avoir pour le complexe métallique, limitant ainsi le panel de structures protéiques possibles, et laissant la possibilité de relargage du catalyseur (ou de l'ion métallique) en cas de faible affinité.

De façon plus générale, l'une des difficultés principales dans le développement d'une métalloenzyme artificielle est le choix de la matrice protéiques et dans de nombreux cas, les métallo-DAases artificielles (en l'absence d'optimisation) ont montré des efficacités et des sélectivités inférieures aux

1 autres DAases. Cette difficulté est retrouvée au-delà de la  
 2 réaction de DA et constitue l'un des verrous pour l'obtention de  
 3 métalloenzymes artificielles efficaces. En effet, les métalloen-  
 4 zymes artificielles ont été largement développées pour cataly-  
 5 ser des réactions redox pour lesquelles un centre métallique  
 6 redox-actif est nécessaire [109][15][110][111][112][113]. Si le  
 7 choix de la matrice protéique reste une difficulté, l'optimisation  
 8 des catalyseurs obtenus (et donc des interactions catalyseur-  
 9 substrats-matrice) est une stratégie incontournable pour viser  
 10 des applications en biocatalyse. Bien que des stratégies d'opti-  
 11 misation aient été appliquées pour améliorer les propriétés de  
 12 certaines métalloenzymes artificielles [114][115][116], aucune  
 13 stratégie similaire n'a été utilisée dans le cas des métallo-  
 14 DAases. Cela peut être dû au fait que la réaction de DA a été  
 15 utilisée par les chercheurs comme réaction modèle pour obte-  
 16 nir des données fondamentales, tester une matrice et la posi-  
 17 tion du cofacteur dans la cavité, évaluer l'effet des contraintes  
 18 et de la flexibilité autour des substrats, etc. Il est également  
 19 probable que cela soit lié à une limitation dans le choix des  
 20 substrats. En effet, la plupart des exemples ont été développés  
 21 pour catalyser la réaction modèle du CP avec les azachalcones,  
 22 ces dernières fournissant un motif de liaison à l'ion métallique.  
 23 Pour étendre la gamme de substrats accessibles, une interac-  
 24 tion de faible affinité entre le substrat et le métal serait  
 25 suffisante si elle était combinée à des interactions avec des  
 26 résidus de la cavité catalytique. À cette fin, les outils émer-  
 27 gents pour le design *in silico* de sites métalliques dans des  
 28 matrices protéiques devraient permettre la conception et/ou  
 29 l'optimisation de métallo-DAases avec un panel de substrats  
 30 étendu [62].

31  
 32 La **chimie bioorthogonale** est l'étude des réactions  
 33 chimiques qui peuvent se produire à l'intérieur des systèmes  
 34 vivants sans interférer avec les processus biochimiques  
 35 natifs de ces systèmes.  
 36

#### 37 38 39 À retenir

- 40 - Aucune métallo-DAase naturelle n'a encore été mise
- 41 en évidence.
- 42 - La grande majorité des DAases artificielles est compo-
- 43 sée de métallo-DAases artificielles.
- 44 - L'insertion supramoléculaire d'un cofacteur métallique
- 45 a fourni une métallo-DAase artificielle qui fonctionne dans
- 46 des cellules vivantes.
- 47
- 48

## 49 50 51 6. Conclusions et perspectives

52  
 53 Compte tenu des préoccupations éco-conscientes publiques  
 54 et gouvernementales, la maîtrise des biocatalyseurs gagne en  
 55 importance et un nombre croissant de biocatalyseurs avec des  
 56 applications industrielles ont vu le jour. Bien qu'il n'y ait pas  
 57 encore d'applications industrielles, les enzymes artificielles  
 58 s'avèrent comme l'un des principaux outils de la biologie syn-  
 59 thétique, car elles apparaissent comme essentielles pour élar-  
 60 gir le répertoire de réactions chimiques accessibles au monde  
 61 biologique, permettant la catalyse des réactions abiotiques  
 62 dans des conditions écologiques. Poussés par l'importance des  
 63 cycloadditions de DA dans la synthèse chimique, les chimistes  
 64 ont utilisé plusieurs stratégies pour la préparation de DAases  
 65 artificielles. Dans l'ensemble, de belles réalisations ont été  
 66 obtenues avec plusieurs exemples de DAases hautement  
 67 sélectives, et même, dans certains cas, des DAases fournissant  
 68 le produit *exo* défavorisé avec une stéréosélectivité presque

1 totale. Il apparaît que la DAase artificielle la plus efficace est  
 2 la **CE20** dérivée d'une stratégie de conception *de novo* après  
 3 plusieurs étapes d'optimisation [84]. Cet exemple met l'accent  
 4 à la fois sur la puissance de la conception informatique et sur  
 5 la nécessité d'optimiser l'enzyme après la conception initiale.  
 6 Les progrès récents des techniques d'évolution dirigée  
 7 [117][118][119][120], ainsi que le développement d'outils de  
 8 calcul de plus en plus précis [62] devraient permettre d'améliorer  
 9 les performances catalytiques et la stabilité des enzymes  
 10 artificielles, et de nombreux exemples présentés dans cette  
 11 revue doivent être considérés comme des preuves de concept.

12 En résumé, après la sélection d'une réaction DA cible, plu-  
 13 sieurs stratégies ont été suivies pour préparer des enzymes  
 14 artificielles qui peuvent être divisées en deux approches princi-  
 15 pales : i) sélectionner ou concevoir une protéine qui stabilise  
 16 l'ET de la réaction DA ~~sélectionnée~~ (immunisation ou conception  
 17 computationnelle) ou ii) sélectionner une cavité protéique pour  
 18 recevoir un cofacteur pour catalyser la réaction. Dans cette der-  
 19 nière stratégie, l'un des principaux défis est le choix de la  
 20 cavité. L'optimisation de l'enzyme apparaissant comme essen-  
 21 tielle, le réglage fin de la cavité sélectionnée sera alors une  
 22 étape cruciale vers l'utilisation de cette deuxième stratégie.  
 23 L'enzyme optimisée pourrait ensuite être insérée à l'intérieur de  
 24 cellules ou sur des cellules en utilisant des outils allant de  
 25 l'expression génétique, la délivrance de protéines à l'intérieur  
 26 des cellules ou l'ingénierie de la surface cellulaire. Au-delà de la  
 27 réaction DA, les stratégies décrites ci-dessus peuvent être sui-  
 28 vies pour développer des enzymes artificielles et mettre en  
 29 œuvre un bon nombre de réactions abiologiques en biocatalyse.

retenue

## 7. Glossaire

### métalloenzyme artificielle

35 Métalloprotéine préparée en laboratoire et qui peut catalyser  
 36 une réaction chimique ciblée.

### variant de protéine

39 Aussi appelé « isoforme de protéine », membre d'un ensemble  
 40 de protéines très similaires qui proviennent d'un seul gène ou  
 41 d'une seule famille de gènes et sont le résultat de différences  
 42 génétiques dues à des mutations, délétion... Alors que beaucoup  
 43 remplissent des rôles biologiques identiques ou similaires, cer-  
 44 taines isoformes ont des fonctions uniques.

### évolution dirigée

47 Biotechnologie mimant l'évolution naturelle de façon accélérée  
 48 afin de modifier les propriétés d'une protéine par modification de  
 49 la séquence de son gène et sélection des variants désirés. L'évolution dirigée  
 50 consiste à créer de la diversité génétique à partir d'un gène initial et à  
 51 sélectionner les meilleurs variants pour une propriété donnée (stabilité,  
 52 activité, etc.). Il existe plusieurs techniques pour créer de la diversité  
 53 génétique.

par

### haptène

56 Petite molécule synthétique liée à une macromolécule  
 57 (protéine, polysaccharide...) pour former un antigène. L'anti-  
 58 gène déclenche une réponse immunitaire s'exprimant par la  
 59 production d'anticorps qui se lie à la partie haptène.

SI

### bioconjugaison

62 Stratégie chimique aboutissant à la formation d'une liaison  
 63 covalente entre deux molécules dont au moins une est une  
 64 biomolécule.

### chimie bioorthogonale

66 Étude des réactions chimiques qui peuvent se produire à  
 67 l'intérieur des systèmes vivants sans interférer avec les pro-  
 68 cessus biochimiques natifs de ces systèmes

**docking ou amarrage moléculaire**

Méthode de modélisation moléculaire qui calcule l'orientation préférée d'une molécule vers une seconde lorsqu'elles sont liées.

**8. Sigles, notations et symboles**

Symbole	Description	Unité
$k_{\text{cat}}$	Constante de vitesse catalytique (modèle de Michaelis Menten)	$\text{s}^{-1}$
$K_M$	Constante de Michaelis	$\text{mol.L}^{-1}$
EC	Efficacité catalytique	$\text{mol}^{-2}.\text{L}^2.\text{s}^{-1}$ car deux substrats
ME	Molarité effective	$\text{mol.L}^{-1}$ car deux substrats
ee	Excès énantiomérique	%

↑ à centner

e/

# Diels-Aldérase artificielle au service de la chimie verte

par **Wadih GHATTAS**

Chargé de recherche au CNRS  
Institut de Chimie Moléculaire et des matériaux d'Orsay UMR 8182, Université Paris Saclay,  
Orsay

**Jean-Pierre MAHY**

Professeur  
Institut de Chimie Moléculaire et des matériaux d'Orsay UMR 8182, Université Paris Saclay,  
Orsay

**Rémy RICOUX**

Ingénieur de recherche au CNRS  
Institut de Chimie Moléculaire et des matériaux d'Orsay UMR 8182, Université Paris Saclay,  
Orsay

**A. Jalila SIMAAN**

Directrice de recherche au CNRS  
Institut des Sciences Moléculaires de Marseille UMR7313, Aix Marseille Univ, Centrale  
Marseille, Marseille

et **Marius RÉGLIER**

Directeur de recherche émérite au CNRS  
Institut des Sciences Moléculaires de Marseille UMR7313, Aix Marseille Univ, Centrale  
Marseille, Marseille

## Sources bibliographiques

- [1] DEMIRDJIAN (H.). – <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-organique/methodes-et-outils/les-concepts-de-la-chimie-verte-utilisation>. (2005).
- [2] BORNSCHEUER *et al.* – *Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 60, p. 88-119 (2021).
- [3] BREUER (M.) *et al.* – *Industrial Methods for the Production of Optically Active Intermediates*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, p. 788-824 (2004).
- [4] BENSOUSSAN (C.). – *Biocatalyse industrielle*. *l'Act. Chim.*, 259, p. 48-51 (2002).
- [5] SCHMID (A.) *et al.* – *Industrial biocatalysis today and tomorrow*. *Nature*, 409, p. 258-268 (2001).
- [6] COMBES (D.) et MONSAN (P.). – *Biocatalyse ou catalyse enzymatique*. *Technique de l'Ingénieur*, BIO590 V1, p. 1-18 (2016).
- [7] SHELDON (R.A.) et BRADY (D.). – *The limits to biocatalysis: pushing the envelope*. *Chem. Commun.*, 54, p. 6088-6104 (2018).
- [8] YAMADA (H.) et KOBAYASHI (M.). – *Nitrile Hydratase and Its Application to Industrial Production of Acrylamide*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, p. 1391-1400 (1996).
- [9] LI (N.), *et al.* – *Method for producing a long chain dicarboxylic acid by fermentation*. EP3533879A1, (2018).
- [10] CHOU (H.), *et al.* – *Directed evolution of cyp52a12 gene and its use in dicarboxylic acid production*. EP3550014A1, (2019).
- [11] KEASLING (J.D.) et PADDON (C.J.). – *Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 12, p. 355-367 (2014).
- [12] KEASLING (J.D.) *et al.* – *High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin*. *Nature*, 496, p. 528-532 (2013).
- [13] NIELSEN (J.) et KEASLING (J.D.). – *Engineering Cellular Metabolism*. *Cell*, 164, p. 1185-1197 (2016).
- [14] KEASLING (J.D.). – *Manufacturing Molecules Through Metabolic Engineering*. *Science*, 330, p. 1355 (2010).
- [15] SCHWIZER (F.) *et al.* – *Artificial Metalloenzymes: Reaction Scope and Optimization Strategies*. *Chem. Rev.*, 118, p. 142-231 (2018).
- [16] NICOLAOU (K.C.) *et al.* – *The Diels-Alder reaction in total synthesis*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41, p. 1668-1698 (2002).
- [17] FUNEL (J.-A.) et ABELE (S.). – *Industrial Applications of the Diels-Alder Reaction*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, p. 3822-3863 (2013).
- [18] OLIVEIRA (B.L.), GUO (Z.) et BERNARDES (G.J.L.). – *Inverse electron demand Diels-Alder reactions in chemical biology*. *Chem. Soc. Rev.*, 46, p. 4895-4950 (2017).
- [19] WOODWARD (R.B.) et HOFFMANN (R.). – *The Conservation of Orbital Symmetry*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 8, p. 781-853 (1969).
- [20] HOUK (K.N.). – *Generalized frontier orbitals of alkenes and dienes*. Regioselectivity in Diels-Alder reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 95, p. 4092-4094 (1973).
- [21] GALLIER (F.). – *Metal Promoted Diels-Alder Reactions*. *Curr. Org. Chem.*, 20, p. 2222-2253 (2016).
- [22] MANGAWA (S.K.) et AWASTHI (S.K.). – *Recent Advances in Guanidine-Based Organocatalysts in Stereoselective Organic Transformation Reactions*. (2016).
- [23] BLOKZIJL (W.), BLANDAMER (M.J.) et ENGBERTS (J.B.F.N.). – *Diels-Alder reactions in aqueous solutions*. Enforced hydrophobic interactions between diene and dienophile. *J. Am. Chem. Soc.*, 113, p. 4241-4246 (1991).
- [24] GALLEGO (E. M.), *et al.* – *Conceptual similarities between zeolites and artificial enzymes*. *Chem. Sci.*, 10, p. 8009-8015 (2019).
- [25] KIM (S.P.), LEACH (A.G.) et HOUK (K.N.). – *The Origins of Noncovalent Catalysis of Intermolecular Diels-Alder Reactions by Cyclodextrins, Self-Assembling Capsules, Antibodies, and RNAses*. *J. Org. Chem.*, 67, p. 4250-4260 (2002).

- 1 [26] DE ROSA (M.) *et al.* – *Supramolecular Organocatalysis in Water*  
 2 *Mediated by Macrocyclic Compounds*. *Front. Chem.*, 6, p. 84 (2018).
- 3 [27] PALMA (A.) *et al.* – *Cucurbit[7]uril as a Supramolecular Artificial Enzyme*  
 4 *for Diels-Alder Reactions*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56, p. 15688-15692  
 5 (2017).
- 6 [28] COREY (E.J.). – *Catalytic Enantioselective Diels-Alder Reactions:*  
 7 *Methods, Mechanistic Fundamentals, Pathways, and Applications*.  
 8 *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41, p. 1650-1667 (2002).
- 9 [29] SEELIG (B.) et JÄSCHKE (A.). – *A small catalytic RNA motif with Diels-*  
 10 *Alderase activity*. *Chem. Biol.*, 6, p. 167-176 (1999).
- 11 [30] ROELFES (G.) et FERINGA (B.L.). – *DNA-Based Asymmetric Catalysis*.  
 12 *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, p. 3230-3232 (2005).
- 13 [31] YUM (J.H.), PARK (S.) et SUGIYAMA (H.). – *G-quadruplexes as versatile*  
 14 *scaffolds for catalysis*. *Org. Biomol. Chem.*, 17, p. 9547-9561 (2019).
- 15 [32] ROELFES (G.). – *DNA and RNA induced enantioselectivity in chemical*  
 16 *synthesis*. *Mol. BioSyst.*, 3, p. 126-135 (2007).
- 17 [33] DUCHEMIN (N.) *et al.* – *A decade of DNA-hybrid catalysis: from inno-*  
 18 *vation to comprehension*. *Org. Biomol. Chem.*, 15, p. 7072-7087 (2017).
- 19 [34] SMIETANA (M.) et ARSENIYADIS (S.). – *Challenges and Opportunities*  
 20 *in DNA-based Asymmetric Catalysis*. *chimia (aarau)*, 72, p. 630-634  
 21 (2018).
- 22 [35] ZHANG (T.Y.). – *Process Chemistry: The Science, Business, Logic, and*  
 23 *Logistics*. *Chem. Rev.*, 106, p. 2583-2595 (2006).
- 24 [36] KRAFT (P.), *et al.* – *Odds and Trends: Recent Developments in the*  
 25 *Chemistry of Odorants*. *Angewandte Chemie International Edition*, 39,  
 26 p. 2980-3010 (2000).
- 27 [37] BAUER (K.), GARBE (D.) et SURBURG (H.). – *Common Fragrance and*  
 28 *Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*. (2008).
- 29 [38] FRÁTER (G.), BAJGROWICZ (J.A.) et KRAFT (P.). – *Fragrance chemistry*.  
 30 *Tetrahedron*, 54, p. 7633-7703 (1998).
- 31 [39] ROUGHLEY (S.D.) et JORDAN (A.M.). – *The Medicinal Chemist's Tool-*  
 32 *box: An Analysis of Reactions Used in the Pursuit of Drug Candidates*.  
 33 *J. Med. Chem.*, 54, p. 3451-3479 (2011).
- 34 [40] COOPER (T.W.J.), CAMPBELL (I.B.) et MACDONALD (S.J.F.). – *Factors*  
 35 *Determining the Selection of Organic Reactions by Medicinal Chemists*  
 36 *and the Use of These Reactions in Arrays (Small Focused Libraries)*.  
 37 *Angewandte Chemie International Edition*, 49, p. 8082-8091 (2010).
- 38 [41] CAREY (J.S.) *et al.* – *Analysis of the reactions used for the preparation*  
 39 *of drug candidate molecules*. *Org. Biomol. Chem.*, 4, p. 2337 (2006).
- 40 [42] MAGANO (J.) et DUNETZ (J.R.). – *Large-Scale Applications of Transition*  
 41 *Metal-Catalyzed Couplings for the Synthesis of Pharmaceuticals*. *Chem.*  
 42 *Rev.*, 111, p. 2177-2250 (2011).
- 43 [43] FARINA (V.), *et al.* – *Asymmetric Synthesis of Active Pharmaceutical*  
 44 *Ingredients*. *Chem. Rev.*, 106, p. 2734-2793 (2006).
- 45 [44] VEDERAS (J.C.) *et al.* – *Lovastatin Nonaketide Synthase Catalyzes an*  
 46 *Intramolecular Diels-Alder Reaction of a Substrate Analogue*. *J. Am.*  
 47 *Chem. Soc.*, 122, p. 11519-11520 (2000).
- 48 [45] WATANABE (K.), *et al.* – *Detailed reaction mechanism of macrophomate*  
 49 *synthase*. Extraordinary enzyme catalyzing five-step transformation  
 50 from 2-pyrones to benzoates. *J. Biol. Chem.*, 275, p. 38393-38401 (2000).
- 51 [46] LIU (H.) *et al.* – *Enzyme-catalysed [4+2] cycloaddition is a key step in*  
 52 *the biosynthesis of spinosyn A*. *Nature*, 473, p. 109-112 (2011).
- 53 [47] MINAMI (A.) et OIKAWA (H.). – *Recent advances of Diels-Alderase*  
 54 *involved in natural product biosynthesis*. *J. Antibiot.*, 69, p. 500-506  
 55 (2016).
- 56 [48] JEON (B.-S.), *et al.* – *Natural [4 + 2]-Cyclases*. *Chem. Rev.*, 117, p. 5367-5388  
 57 (2017).
- 58 [49] WALSH (C.T.) et TANG (Y.). – *Recent Advances in Enzymatic Complexity*  
 59 *Generation: Cyclization Reactions*. *Biochemistry*, 57, p. 3087-3104 (2018).
- 60 [50] LICHMAN (B.R.), O'CONNOR (S.E.) et KRIES (H.). – *Biocatalytic Strate-*  
 61 *gies towards [4 + 2] Cycloadditions*. *Chemistry – A European Journal*,  
 62 25, p. 6864-6877 (2019).
- 63 [51] JAMIESON (C.S.), *et al.* – *The expanding world of biosynthetic pericy-*  
 64 *clases: cooperation of experiment and theory for discovery*. 36, p. 698-  
 65 713 (2019).
- 66 [52] FARROW (S.C.) *et al.* – *Biosynthesis of an Anti-Addiction Agent from*  
 67 *the Iboga Plant*. *J. Am. Chem. Soc.*, 141, p. 12979-12983 (2019).
- 68 [53] CHEN (Q.), *et al.* – *Enzymatic Intermolecular Hetero-Diels-Alder Reaction*  
 69 *in the Biosynthesis of Tropolonic Sesquiterpenes*. *J. Am. Chem. Soc.*,  
 70 141, p. 14052-14056 (2019).
- 71

- 1 [54] GAO (L.) et al. – FAD-dependent enzyme-catalysed intermolecular [4 + 2]  
 2 cycloaddition in natural product biosynthesis. *Nat. Chem.*, 12, p. 620-628  
 3 (2020).
- 4 [55] et al. – Structural basis for stereoselective dehydration and hydrogen-  
 5 bonding catalysis by the SAM-dependent pericyclase *Lepl*. *Nat. Chem.*,  
 6 11, p. 812-820 (2019).
- 7 [56] DAN (Q.) et al. – Fungal indole alkaloid biogenesis through evolution of  
 8 a bifunctional reductase/Diels-Alderase. *Nat. Chem.*, 11, p. 972-980  
 9 (2019).
- 10 [57] FAGE (C.D.) et al. – The structure of *SpnF*, a standalone enzyme that  
 11 catalyzes [4 + 2] cycloaddition. *Nat. Chem. Biol.*, 11, p. 256-258 (2015).
- 12 [58] BYRNE (M.J.) et al. – The Catalytic Mechanism of a Natural Diels-Alder-  
 13 erase Revealed in Molecular Detail. *J. Am. Chem. Soc.*, 138, p. 6095-6098  
 14 (2016).
- 15 [59] ZHENG (Q.) et al. – Enzyme-Dependent [4 + 2] Cycloaddition Depends  
 16 on Lid-like Interaction of the N-Terminal Sequence with the Catalytic  
 17 Core in *Pyrl4*. *Cell Chem. Biol.*, 23, p. 352-360 (2016).
- 18 [60] ZHENG (Q.), et al. – Structural Insights into a Flavin-Dependent [4 + 2]  
 19 Cyclase that Catalyzes *trans-Decalin* Formation in *Pyrrandomycin*  
 20 Biosynthesis. *Cell Chem. Biol.*, 25, p. 718-727.e3 (2018).
- 21 [61] PAGE (M.L.) et JENCKS (W.P.). – Entropic Contributions to Rate Accel-  
 22 erations in Enzymic and Intramolecular Reactions and the Chelate Effect.  
 23 *PNAS*, 68, p. 1678-1683 (1971).
- 24 [62] VAISSIER WELBORN (V.) et HEAD-GORDON (T.). – Computational  
 25 Design of Synthetic Enzymes. *Chem. Rev.*, 119, p. 6613-6630 (2019).
- 26 [63] XU (Y.), YAMAMOTO (N.) et JANDA (K.D.). – Catalytic antibodies: hapt-  
 27 en design strategies and screening methods. *Bioorganic & Medicinal*  
 28 *Chemistry*, 12, p. 5247-5268 (2004).
- 29 [64] FRANKEL (D.A.), et al. – Photoinduced destabilization of bilayer vesicles.  
 30 *J. Am. Chem. Soc.*, 111, p. 9262-9263 (1989).
- 31 [65] XU (J.). – Evolution of Shape Complementarity and Catalytic Efficiency  
 32 from a Primordial Antibody Template. *Science*, 286, p. 2345-2348 (1999).
- 33 [66] CHEN (J.) et al. – Shape Complementarity, Binding-Site Dynamics, and  
 34 Transition State Stabilization: A Theoretical Study of Diels-Alder Cata-  
 35 lysis by Antibody 1E9. *ChemBioChem*, 1, p. 255-261 (2000).
- 36 [67] BRAISTED (A.C.) et SCHULTZ (P.G.). – An antibody-catalyzed bimolecular  
 37 Diels-Alder reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 112, p. 7430-7431 (1990).
- 38 [68] ULRICH (H.D.), et al. – Expression studies of catalytic antibodies. *PNAS*,  
 39 92, p. 11907-11911 (1995).
- 40 [69] ROMESBERG (F.E.). – Immunological Origins of Binding and Catalysis  
 41 in a Diels-Alderase Antibody. *Science*, 279, p. 1929-1933 (1998).
- 42 [70] ZHANG (X.), et al. – Origins and Predictions of Stereoselective Antibody  
 43 Catalysis: Theoretical Analysis of Diels-Alder Catalysis by 39A11 and Its  
 44 Germ-Line Antibody. *J. Org. Chem.*, 67, p. 9043-9053 (2002).
- 45 [71] GOUVERNEUR (V.) et al. – Control of the *exo* and *endo* pathways of the  
 46 Diels-Alder reaction by antibody catalysis. *Science*, 262, p. 204-208  
 47 (1993).
- 48 [72] JANDA (K.D.) et al. – Anti-Metallocene Antibodies: A New Approach to  
 49 Enantioselective Catalysis of the Diels-Alder Reaction. *J. Am. Chem.*  
 50 *Soc.*, 117, p. 7041-7047 (1995).
- 51 [73] MEEKEL (A.A.P.), RESMINI (M.) et PANDIT (U.K.). – First example of an  
 52 antibody-catalysed hetero-Diels-Alder reaction. *J. Chem. Soc., Chem.*  
 53 *Commun.*, p. 571-572 (1995).
- 54 [74] HU (Y.-J.), et al. – Polyclonal catalytic antibody for hetero-cycloaddition  
 55 of hepta-1,3-diene with ethyl glyoxylate an approach to the synthesis  
 56 of 2-nonulosonic acid analogs. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 7, p. 1601-  
 57 1606 (1997).
- 58 [75] SHI (Z.-D.), et al. – First Example of an Antibody-Catalyzed Aza Diels-  
 59 Alder Reaction. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 12, p. 2321-2324 (2002).
- 60 [76] HEINE (A.). – An Antibody *exo* Diels-Alderase Inhibitor Complex at 1.95  
 61 Angstrom Resolution. *Science*, 279, p. 1934-1940 (1998).
- 62 [77] CANNIZZARO (C.E.), et al. – Experimental Determination of the Absolute  
 63 Enantioselectivity of an Antibody-Catalyzed Diels-Alder Reaction and  
 64 Theoretical Explorations of the Origins of Stereoselectivity. *J. Am.*  
 65 *Chem. Soc.*, 125, p. 2489-2506 (2003).
- 66 [78] SIEGEL (J.B.) et al. – Computational Design of an Enzyme Catalyst for a  
 67 Stereoselective Bimolecular Diels-Alder Reaction. *Science*, 329,  
 68 p. 309-313 (2010).
- 69 [79] KUHLMAN (B.). – Designing protein structures and complexes with the  
 70 molecular modeling program Rosetta. *J. Biol. Chem.*, 294, p. 19436-19443  
 71 (2019).
- [80] ZANGHELLINI (A.) et al. – New algorithms and an *in silico* benchmark  
 for computational enzyme design. *Protein Sci.*, 15, p. 2785-2794 (2006).

CAI +

HILVERT (D.) +

BAKER (D.) +

- 1 [81] LEMAN (J. K.) *et al.* – *Macromolecular modeling and design in Rosetta: recent methods and frameworks*. *Nat. Methods*, 17, p. 665-680 (2020).
- 2
- 3 [82] EIBEN (C.B.) *et al.* – *Increased Diels-Alderase activity through backbone remodeling guided by Foldit players*. *Nat. Biotechnol.*, 30, p. 190-192 (2012).
- 4
- 5
- 6 [83] KOEPNICK (B.) *et al.* – *De novo protein design by citizen scientists*. *Nature*, 570, p. 390-394 (2019).
- 7
- 8 [84] HILVERT (D.) *et al.* – *Impact of scaffold rigidity on the design and evolution of an artificial Diels-Alderase*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, p. 8013-8018 (2014).
- 9
- 10
- 11 [85] ZHAO (A.) *et al.* – *Phage antibody display libraries: a powerful antibody discovery platform for immunotherapy*. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 36, p. 276-289 (2016).
- 12
- 13
- 14 [86] OSE (T.) *et al.* – *Insight into a natural Diels-Alder reaction from the structure of macrophomate synthase*. *Nature*, 422, p. 185-189 (2003).
- 15
- 16 [87] GUIMARÃES (C.R.W.), UDIER-BLAGOVIĆ (M.) et JORGENSEN (W.L.). – *Macrophomate Synthase: QM/MM Simulations Address the Diels-Alder versus Michael-Aldol Reaction Mechanism*. *J. Am. Chem. Soc.*, 127, p. 3577-3588 (2005).
- 17
- 18
- 19
- 20 [88] REETZ (M.T.) et JIAO (N.). – *Copper-Phthalocyanine Conjugates of Serum Albumins as Enantioselective Catalysts in Diels-Alder Reactions*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, p. 2416-2419 (2006).
- 21
- 22
- 23 [89] GHATTAS (W.) *et al.* – *Artificial Metalloenzymes with the Neocarzinostatin Scaffold: Toward a Biocatalyst for the Diels-Alder Reaction*. *ChemBioChem*, 17, p. 433-440 (2016).
- 24
- 25
- 26 [90] GHATTAS (W.) *et al.* – *Receptor-Based Artificial Metalloenzymes on Living Human Cells*. *J. Am. Chem. Soc.*, 140, p. 8756-8762 (2018).
- 27
- 28 [91] TALBI (B.) *et al.* – *( $\eta^6$ -Arene) ruthenium(II) complexes and metallo-papain hybrid as Lewis acid catalysts of Diels-Alder reaction in water*. *Dalton Trans.*, 39, p. 5605 (2010).
- 29
- 30
- 31 [92] DEUSS (P.J.) *et al.* – *Artificial Copper Enzymes for Asymmetric Diels-Alder Reactions*. *ChemCatChem*, 5, p. 1184-1191 (2013).
- 32
- 33 [93] OSSELI (H.) *et al.* – *Artificial Diels-Alderase based on the transmembrane protein FhuA*. *Beilstein J. Org. Chem.*, 12, p. 1314-1321 (2016).
- 34
- 35 [94] ELICE (M.) *et al.* – *Synthesis of a heterogeneous artificial metallolipase with chimeric catalytic activity*. *Chem. Commun.*, 51, p. 9324-9327 (2015).
- 36
- 37
- 38 [95] ROELFES (G.) *et al.* – *Enantioselective Artificial Metalloenzymes by Creation of a Novel Active Site at the Protein Dimer Interface*. *Angew. Chem.*, 124, p. 7590-7593 (2012).
- 39
- 40
- 41 [96] DI MEO (T.) *et al.* –  *$\alpha$ Rep A3: A Versatile Artificial Scaffold for Metalloenzyme Design*. *Chem. Eur. J.*, 23, p. 10156-10166 (2017).
- 42
- 43 [97] DI MEO (T.) *et al.* – *Functionalized Artificial Bidomain Proteins Based on an  $\alpha$ -Solenoid Protein Repeat Scaffold: A New Class of Artificial Diels-Alderases*. *ACS Omega*, 4, p. 4437-4447 (2019).
- 44
- 45
- 46 [98] REETZ (M.T.) *et al.* – *An Artificial Metalloenzyme: Creation of a Designed Copper Binding Site in a Thermostable Protein*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49, p. 5151-5155 (2010).
- 47
- 48
- 49 [99] FISCHER (J.) *et al.* – *Robust and Versatile Host Protein for the Design and Evaluation of Artificial Metal Centers*. *ACS Catal.*, 9, p. 11371-11380 (2019).
- 50
- 51
- 52 [100] LI (X.A.) *et al.* – *Sequence-specific  $^1\text{H}$  NMR assignments and solution structure of bovine pancreatic polypeptide*. *Biochemistry*, 31, p. 1245-1253 (1992).
- 53
- 54
- 55 [101] COQUIÈRE (D.) *et al.* – *Enantioselective Artificial Metalloenzymes Based on a Bovine Pancreatic Polypeptide Scaffold*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, p. 5159-5162 (2009).
- 56
- 57
- 58 [102] LERCH (M.) *et al.* – *Bovine Pancreatic Polypeptide (bPP) Undergoes Significant Changes in Conformation and Dynamics upon Binding to DPC Micelles*. *J. Mol. Biol.*, 322, p. 1117-1133 (2002).
- 59
- 60
- 61 [103] GHATTAS (W.) *et al.* – *Cu<sup>II</sup>-Containing 1-Aminocyclopropane Carboxylic Acid Oxidase Is an Efficient Stereospecific Diels-Alderase*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 58, p. 14605-14609 (2019).
- 62
- 63
- 64 [104] HIMIYAMA (T.) *et al.* – *Construction of a hybrid biocatalyst containing a covalently-linked terpyridine metal complex within a cavity of aponitrobindin*. *J. Inorg. Biochem.*, 158, p. 55-61 (2016).
- 65
- 66
- 67 [105] SMOLSKAYA (S.) et ANDREEV (Y.). – *Site-Specific Incorporation of Unnatural Amino Acids into Escherichia coli Recombinant Protein: Methodology Development and Recent Achievement*. *Biomolecules*, 9, p. 255 (2019).
- 68
- 69
- 70 [106] LEE (K.J.), KANG (D.) et PARK (H.-S.). – *Site-Specific Labeling of Proteins Using Unnatural Amino Acids*. *Mol Cells*, 42, p. 386-396 (2019).
- 71

KAMER (P.C.J.)<sup>4</sup>  
 OKUDA (J.)<sup>4</sup>  
 PALOMO (J.M.)<sup>4</sup>

- 1 [107] LIU (C.C.) et SCHULTZ (P.G.). – *Adding New Chemistries to the Genetic*  
2 *Code*. Annu. Rev. Biochem., 79, p. 413-444 (2010).
- 3 [108] OKAMOTO (Y.), *et al.* – *A cell-penetrating artificial metalloenzyme*  
4 *regulates a gene switch in a designer mammalian cell*. Nat. Commun.,  
5 9, p. 1943 (2018).
- 6 [109] CHEN (K.) et ARNOLD (F.H.). – *Engineering new catalytic activities in*  
7 *enzymes*. Nat. Catal., 3, p. 203-213 (2020).
- 8 [110] BÄHR (S.) *et al.* – *Selective Enzymatic Oxidation of Silanes to Silanols*.  
9 Angew. Chem. Int. Ed., 59, p. 15507-15511 (2020).
- 10 [111] ROELFES (G.). – *LmrR: A Privileged Scaffold for Artificial Metallo-*  
11 *enzymes*. Acc. Chem. Res., 52, p. 545-556 (2019).
- 12 [112] LIANG (A.D.), *et al.* – *Artificial Metalloenzymes Based on the Biotin-*  
13 *Streptavidin Technology: Enzymatic Cascades and Directed Evolution*.  
14 Acc. Chem. Res., 52, p. 585-595 (2019).
- 15 [113] MARCHI-DELAPIERRE (C.), *et al.* – *Oxidation Catalysis by Rationally*  
16 *Designed Artificial Metalloenzymes*. Isr. J. Chem., 55, p. 61-75 (2015).
- 17 [114] JESCHEK (M.) *et al.* – *Directed evolution of artificial metalloenzymes for*  
18 *in vivo metathesis*. Nature, (2016).
- 19 [115] PETRIK (I.D.), LIU (J.) et LU (Y.). – *Metalloenzyme design and enginee-*  
20 *ring through strategic modifications of native protein scaffolds*. Curr.  
21 Opin. Chem. Biol., 19, p. 67-75 (2014).
- 22 [116] REETZ (M.T.). – *Directed Evolution of Artificial Metalloenzymes: A Uni-*  
23 *versal Means to Tune the Selectivity of Transition Metal Catalysts?*. Acc.  
24 Chem. Res., 52, p. 336-344 (2019).
- 25 [117] YANG (K.K.), WU (Z.) et ARNOLD (F.H.). – *Machine-learning-guided*  
26 *directed evolution for protein engineering*. Nat. Methods, 16, p. 687-694  
27 (2019).
- 28 [118] CHOWDHURY (R.) et MARANAS (C.D.). – *From directed evolution to*  
29 *computational enzyme engineering – A review*. AIChE J, 66, (2020).
- 30 [119] MARKEL (U.) *et al.* – *Advances in ultrahigh-throughput screening for*  
31 *directed enzyme evolution*. Chem. Soc. Rev., 49, p. 233-262 (2020).
- 32 [120] QU (G.) *et al.* – *The Crucial Role of Methodology Development in Direc-*  
33 *ted Evolution of Selective Enzymes*. Angew. Chem. Int. Ed., 59, p. 13204-  
34 13231 (2020).

35  
36  
37 **À lire également dans nos bases**  
38

- 39 MONSAN (P.) et COMBES (D.). – *Biocatalyse ou catalyse enzymatique*  
40 *[BIO 590] (2009)*.
- 41 NEHMÉ (R.). – *Miniaturisation des essais enzymatiques par électrophorèse*  
42 *capillaire [IN 178] (2014)*.
- 43 RIBA (J.-P.). – *Réacteurs enzymatiques et fermenteurs [F 3 600] (1998)*.
- 44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71