

UNIVERSITE EVRY VAL D'ESSONNE

THESE

présentée

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE EVRY VAL D'ESSONNE

par

Franck BORDIER

Nouvelles activités nitrilase :

application à la synthèse de produits d'intérêt.

Soutenue le vendredi 14 décembre 2012 devant les membres du jury :

Pr. Laurence HECQUET

RAPPORTEUR

Pr. Magali REMAUD

RAPPORTEUR

Dr. Jamal OUAZZANI

EXAMINATEUR

Dr. Véronique de BERARDINIS

EXAMINATEUR

Dr. Carine VERGNE VAXELAIRE

EXAMINATEUR

Pr. Anne ZAPARUCHA

DIRECTRICE DE THESE

## *Remerciements*

Je tiens tout d'abord à remercier Jean Weissenbach, directeur de l'Institut de génomique (CEA), de m'avoir permis de travailler dans cet établissement et d'avoir accepté de me financer quelques mois supplémentaires pour finir ma thèse dans de bonnes conditions.

Je remercie les membres du jury qui ont accepté de juger mon travail :

- Madame Laurence Hecquet, Professeur au Laboratoire de Biocatalyse en Synthèse Organique à l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand.
- Madame Magali Remaud, Professeur au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés de l'Université de Toulouse.
- Monsieur Jamal Ouazzani, Docteur à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame Anne Zaparucha, Professeur à l'Université d'Evry de m'avoir accueilli dans l'équipe et de m'avoir encadré tout au long de ma thèse. Sa disponibilité, sa pédagogie et son soutien (surtout à la fin de la thèse) m'ont permis de m'épanouir et d'enrichir pleinement mes connaissances.

Je tiens à remercier Madame Carine Vaxelaire, Ingénieur Docteur de m'avoir co-encadré durant ma thèse, sa grande patience, sa gentillesse, sa disponibilité et ses conseils m'ont permis de progresser tout au long de ma thèse, tant sur le plan scientifique que humain.

Je tiens aussi à remercier Pierre-Loïc Saaidi, Maître de conférences, pour sa disponibilité et ses conseils qui m'ont été très précieux.

Je remercie également Aurelie Fossey, technicienne supérieure, pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Je remercie aussi le Docteur Véronique de Berardinis avec qui j'ai eu la chance de collaborer au cours de ma thèse : sa disponibilité, sa gentillesse, et sa gaité ont permis une collaboration dans un bon état d'esprit et une bonne ambiance.

Mes remerciements vont également aux autres personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer :

- Alain Perret, pour ses conseils avisés sur les tests enzymatiques et le criblage à haut débit.

- Aline Mariage et Virginie Pellouin avec qui j'ai pris plaisir à interagir.
- Sabine Tricot et Ekatarina Dariy pour leur patience et leur pédagogie. Leurs conseils sur les spectromètres de masses m'ont été très utiles.
- Jean Louis Petit et Adrien Debard pour leur disponibilité et leurs réponses sur les interrogations que j'avais sur les aspects du clonage et la production des enzymes.
- Toute l'équipe de bioinformatique, et plus particulièrement Mark Stam.

Je remercie également les thésards de l'institut avec qui j'ai eu la chance de partager mon quotidien et faire du sport. Je remercie Lucille Stuani, en 2<sup>ème</sup> année de thèse avec qui j'ai bien ri et qui m'a soutenu à la fin de la thèse (merci pour tes encouragements). Je remercie également Damien Baud, mon très cher collègue de bureau en 3<sup>ème</sup> année de thèse, avec qui j'ai partagé de bons moments (et quels moments parfois... !).

Je tiens à remercier également les autres personnes avec qui j'ai pris plaisir à discuter dans les couloirs, en particulier Christine Pellé. Je me rappellerai de nos petites scènes de ménages qui ont été très drôles.

Je remercie également Madeleine Bouzon pour avoir pris de son temps pour lire ma thèse, merci pour tes remarques et tes corrections.

Enfin, je remercie mes proches et tous ceux qui m'ont soutenu, notamment ma sœur et ma conjointe qui ont contribué à la correction de ma thèse et m'ont soutenu moralement.

**Sujet :** nouvelles activités nitrilase : application à la synthèse de produits d'intérêt.

## **Résumé**

Le travail décrit dans ce manuscrit porte sur la recherche de nouvelles activités enzymatiques nitrilases et plus particulièrement  $\alpha$ -aminonitrilases. Le but de ce travail était, dans un premier temps, de tester un grand nombre de nitrilases candidates sur un large panel de nitriles pour appréhender leurs activités et établir un catalogue de nouvelles activités nitrilases. Dans un second temps, la recherche de nouvelles activités  $\alpha$ -aminonitrilase a été menée dans l'objectif de réaliser la synthèse d' $\alpha$ -aminoacides par dédoublement cinétique dynamique assistée par couplage avec une racemase.

163 protéines ont été sélectionnées par une approche génomique, et testées sous forme de lysat cellulaire à l'aide d'un test enzymatique couplé à la glutamate deshydrogénase sur 28 nitriles répartis en 7 familles ( $\alpha$ -aminonitriles exclus). Le grand nombre de résultats positifs obtenus à l'issue du criblage nous a permis d'évaluer les activités nitrilases et d'établir un catalogue de ces activités et d'envisager l'utilisation de certaines de ces nouvelles nitrilases dans la synthèse de synthons chimiques. Après sélection de 38 nitrilases et vérification de leurs activités sur enzymes purifiées, 8 nitrilases ont été testées sur 5 nouveaux nitriles déclinés du 3-phénylpropanenitrile. Une synthèse énantiospécifique de  $\beta$ -ester acide précurseur possible de quinolines fonctionnalisées a été réalisée. La déclinaison des dinitriles a également été abordée, 12 nitrilases sélectionnées ont été testées sur 6 dinitriles. Une nouvelle nitrilase nous a permis de réaliser la désymétrisation de l'imino-di-acétonitrile par monohydrolyse. Enfin, de nouvelles activités nitrilases ont été observées sur des cyclooxonitriles pour la formation de plateformes chirales fonctionnalisées.

Selon une autre approche génomique, 425 nitrilases candidates ont été sélectionnées et testées (en plus les 163 nitrilases du précédent criblage) sous forme de lysat cellulaire grâce à la mise au point d'un suivi de l'activité nitrilase par dérivatisation et analyse par LC-MS sur 6  $\alpha$ -aminonitriles précurseurs d' $\alpha$ -aminoacides naturels. Le criblage a permis de mettre en évidence de nouvelles activités  $\alpha$ -aminonitrilases sur le phénylglycinonitrile et le 2-amino pentanenitrile. De nouveaux nitriles déclinés du phénylglycinonitrile, précurseurs d' $\alpha$ -aminoacides d'intérêt pharmacologique, ont été testés sur 4  $\alpha$ -aminonitrilases.

**MOTS CLÉS :** nitrilase,  $\alpha$ -aminonitrilase, dédoublement cinétique dynamique, LC-MS, criblage.



# Sommaire

Abréviations .....	10
Introduction générale.....	13
CHAPITRE I : Présentation du sujet de recherche, état de l'art .....	16
I- Les nitrilases. ....	16
I-1 Présentation des nitrilases.....	16
I-1.a Découverte et origines. ....	16
I-1.b Rôle biologique des nitrilases.....	17
I-1.c Classification. ....	19
I-1.d Structure et mécanisme.....	21
I-1.d.i Structure. ....	21
I-1.d.ii Mécanisme.....	23
I-2. Intérêt des nitrilases. ....	23
I-2.a Biodégradation des herbicides. ....	24
I-2.b Traitement des déchets. ....	24
I-2.c Intérêt en synthèse organique. ....	25
II- L'enjeu et les axes d'études.....	27
III- Les nitrilases : état de l'art. ....	28
III-1 Nitrilases actives sur des substrats autres que des $\alpha$ -aminonitriles.....	28
III-2 Nitrilases actives sur les $\alpha$ -aminonitriles. ....	36
IV- Les $\alpha$ -aminoacides. ....	38
IV-1 Présentation.....	38
IV-2. Synthèse d' $\alpha$ -aminoacides. ....	40
IV-2.a Synthèse racémique.....	40
IV-2.b Synthèse asymétrique. ....	42
IV-2.b.i Utilisation du pool chiral. ....	42

IV-2.b.ii Catalyse asymétrique.....	43
IV-2.c Synthèse par Dédoublment Cinétique Dynamique (DCD).....	45
IV-2.c.i Synthèse par DCD chimique.....	45
IV-2.c.ii Synthèse par DCD chémoenzymatique.....	46
IV-2.c.iii Synthèse par DCD enzymatique.....	47
IV-2.d Enrichissement énantiomérique par Dédoublment par Stéréo-Inversion (DSI). .....	49
IV-2.d.i DSI chémoenzymatique.....	50
IV-2.d.ii DSI enzymatique.....	50
CHAPITRE II : Recherche de nouvelles activités nitrilase : criblage à haut débit et caractérisation fine individuelle .....	54
I- Sélection et obtention des nitrilases candidates.....	56
I-1 Approche génomique.....	56
I-2 Production des nitrilases candidates.....	57
II- Sélection et synthèse des substrats.....	58
II-1 Sélection des substrats.....	58
II-2 Synthèse des substrats.....	60
II-2.a Synthèse du 3-hydroxypentanenitrile (148).....	60
II-2.b Synthèse des $\beta$ -aminonitriles.....	61
II-2.a.i Synthèse du 3-aminopentanenitrile (151).....	61
II-2.a.ii Synthèse du 3-amino-3-phénylpropanenitrile (152).....	63
III- Détection de l'activité nitrilase.....	63
III-1 Les méthodes utilisées.....	63
III-1.a Dosage chimique d'ammoniaque.....	64
III-1.b Dosage chimique d'acide carboxylique.....	65
III-1.c Dosage enzymatique d'ammoniaque.....	66
III-2 Criblage à haut débit.....	66

III-2.a Procédure.....	66
III-2.b Résultats du criblage. ....	68
III.2.c Analyses des résultats.....	74
IV- Vérification des résultats positifs sur enzymes purifiées.....	77
V- Déclinaisons.....	79
V-1 Déclinaisons du 3-phénylpropanenitrile (75).....	79
V-2 Déclinaison des dinitriles.....	82
VI- Conclusion.....	84
CHAPITRE III : Recherche d'activités $\alpha$ -aminonitrilase .....	87
I- Sélection et obtention des enzymes candidates.....	88
I-1 Sélection des gènes candidats par recherche de motif InterPro.....	88
I-2 Obtention des nitrilases.....	90
II- Sélection et synthèse des substrats.....	90
II-1 Sélection des $\alpha$ -aminonitriles.....	90
II-2 Synthèse des substrats.....	91
II-2.a Synthèse du composé 174, précurseur de l'acide glutamique.....	92
II-2.b Synthèse du composé 173, précurseur de la lysine.....	97
II-2.c Synthèse du composé 175, précurseur de la tyrosine.....	100
III- Recherche d'un test de détection de l'activité nitrilase sur des $\alpha$ -aminonitriles.....	102
III-1 Détection d' $\alpha$ -aminoacides par complexation au cuivre II.....	105
III-1.a Mise au point du test.....	105
III-1.b Résultats.....	108
III-2 Mise au point d'un test à haut débit par LC-MS.....	109
III-2.a Choix de l'agent dérivatisant.....	109
III-2.b Description du système LC-MS utilisé.....	112
III-2.c Mise au point du criblage à haut débit.....	112
III-2.d Mode opératoire du criblage à haut débit.....	115



IV- Résultats et sélection des nitrilases actives.....	118
V- Conclusion. ....	122
VI-Déclinaisons de la phénylglycine .....	123
VI-1 Choix des substrats. ....	123
VI-2 Synthèse.....	124
VI-2.a Synthèse des $\alpha$ -aminonitriles. ....	124
VI-2.b Synthèse des acides carboxyliques. ....	125
VI-3 Etude qualitative des activités nitrilases.....	126
VI-3.a Mise au point.....	126
VI-4 Résultats.....	127
VI-5 Conclusion. ....	129
Conclusion Générale .....	131
Matériels et méthodes.....	134
Partie expérimentale .....	136
Synthèse .....	136
Mode opératoire de criblage des 163 nitrilases sur les 25 nitriles ( $\alpha$ -aminonitriles exclus) suivi par le test enzymatique couplé à la Glutamate Deshydrogénase.....	166
Détection colorimétrique d' $\alpha$ -aminoacides .....	168
Criblage à haut débit sur les $\alpha$ -aminonitriles suivi par LC-MS.....	169
Bibliographie.....	172
ANNEXES .....	183
Annexe 1 : tableau récapitulatif : nitrilases/organismes/annotations .....	183
Annexe 2 : seuils des activités nitrilase par substrat .....	205

## Abréviations

Aa : aminoacide  
Aamd : aminoamide  
AAO : aminoacid oxydase  
Ac : acétyle  
ACL :  $\alpha$ -amino- $\epsilon$ -caprolactame  
ADP : adénosine diphosphate  
An : aminonitrile  
Anhy : anhydre  
AT : aminotransférase  
BBT : bleu de bromothymol  
Bn : benzyle  
Boc : *tert*-butyl oxycarbonyle  
Cat : catalyseur  
Cbz : benzyloxycarbonyle  
CCM : chromatographie sur couche mince  
COD : 1,5-cyclooctadiène  
Conv : conversion  
D.O : densité optique  
DC : dédoublement cinétique  
DCC : dicyclohexylcarbodiimide  
DCD : dédoublement cinétique dynamique  
DCM : dichlorométhane  
DHPG : dihydroxyphénylglycine  
DMAP : 4-diméthylaminopyridine  
DMF : diméthylformamide  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
DNA : acide desoxyribonucléique  
DOPA : dopamine  
DSI : dédoublement par stéréo inversion  
DTT : dithiothréitol  
e.d. : excès diastéréoisomérique  
e.e. : excès énantiomérique  
EC : enzyme commission numbers  
EP : éther de pétrole  
éq : équivalent  
Et : éthyle  
FDAA :  $N_{\alpha}$ -(2,4-Dinitro-5-fluorophényl)-*L*-alaninamide (réactif de Marfey)  
FPLC : fast protein liquid chromatography  
GDH : glutamate deshydrogénase  
h : heure  
Hmpa : hexaméthylphosphoramide  
HPLC : chromatographie liquide haute performance  
IBA : acide 2-iodosobenzoïque  
IBX : acide 2-iodoxybenzoïque  
i.e. : id est  
IPTG : isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside

J : constante de couplage  
K<sub>cat</sub> : constante d'affinité  
K<sub>m</sub>: constante de Michaelis  
k<sub>rac</sub> : constante de racémisation  
LC : chromatographie liquide  
LCAB : Laboratoire de Clonage et de Criblage des Activités de Bioconversion  
LCOB : Laboratoire de Chimie Organique et de Biocatalyse  
LGBM : Laboratoire de Génomique et de Biochimie du Métabolisme  
Majo : majoritaire  
MCPG : méthyl-cyano phénylglycine  
Me : méthyle  
Met: méthionine  
Mino : minoritaire  
MPG : 4-méthoxyphénylglycine  
MRM : multiple response monitoring  
Ms : mésyle  
MS : spectrométrie de masse  
Mhz : méga hertz  
NAC : *N*-acétylcystéine  
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide  
OPA : *o*-phtaldialdéhyde  
PCR : réaction en chaine par polymérase  
Ph : phényle  
Phe : phénylalanine  
PLE : pig liver esterase  
PLP : pyridoxal phosphate  
Ppm : partie par million  
r : rendement  
R<sub>f</sub> : rapport frontal  
RMN : résonance magnétique nucléaire  
RX : rayon X  
*S*-NIFE : (*S*)-*N*-(4-nitrophénoxy-carbonyl)phénylalanine méthoxyéthyl ester  
TA : température ambiante  
Tag : étiquette (anglais)  
*t*-bu : *tert*-butyle  
TFA : acide trifluoroacétique  
THF : tétrahydrofurane  
Ts : tosyle  
UPLC : chromatographie liquide ultra performance  
UV : ultra-violet  
V<sub>max</sub> : vitesse initiale maximale  
δ : déplacement chimique

# INTRODUCTION GENERALE

## Introduction générale

L'homme utilise depuis des milliers d'années les enzymes de bactéries, de levures ou de champignons pour transformer de nombreux produits, en particulier ceux de son alimentation. Le plus vieux procédé, date aux environs de 6000 ans avant notre ère, serait la fermentation de l'orge pour la production de bière. Jusqu'au début du XIX<sup>ème</sup> siècle, les procédés biocatalysés ont été largement présents dans diverses applications, mais sans connaissance des réactions mises en jeu. Il faudra attendre les années 1830 pour que Berzelius prouve que la fermentation est de nature catalytique. En 1833, Payen et Persoz introduiront la notion de biocatalyse en utilisant des ferments solubles (extraits d'organismes) pour la transformation d'amidon en sucre. À la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, les ferments et organismes entiers sont de plus en plus utilisés par les industriels pour la synthèse de produits d'intérêt. C'est le cas de l'acide citrique produit par un champignon filamentaire (*Aspergillus niger*) ou encore du (R)-phénylacétylcarbinol, intermédiaire de l'éphédrine, par une levure. Ces exemples illustrent l'avènement lent des biotechnologies blanches dont le terme ne sera défini qu'au début du XXI<sup>ème</sup> siècle.<sup>1</sup> En 1887, Takamine découvre une enzyme qui permet l'hydrolyse de l'amidon l'isole à partir de *Aspergillus oryzae* et la commercialise sous le nom de Taka-diaxase. Cette entreprise, qui le rendra rapidement millionnaire, peut être considérée comme la première expérience industrielle utilisant une enzyme. La biocatalyse prendra son essor dans les années 1940 avec la production de la pénicilline par des microorganismes, suivie d'autres antibiotiques selon des procédés analogues. C'est en 1960 que la biocatalyse utilisant des enzymes isolées prend de l'ampleur, l'exemple marquant étant la production de sirop de fructose à partir d'amidon avec des enzymes immobilisées sur un support insoluble. Dans les années 1970, le progrès du génie génétique constitue un tournant majeur dans la maîtrise du vivant permettant l'identification des gènes, leur clonage, débouchant sur codant la production massive d'enzymes.

Les avantages de la biocatalyse et des bioconversions sont à présent de plus en plus recherchés. En biorémediation dans la dépollution des eaux et de l'air ou comme outil de synthèse puissant vers une chimie alternative dite « verte », respectueuse de son environnement. Depuis ces quarante dernières années, l'utilisation de la biocatalyse comme alternative à la synthèse chimique classique ne cesse de croître dans de nombreux domaines

---

<sup>1</sup> Définition donnée par EuropaBio en 2003 des biotechnologies blanches : « les biotechnologies blanches consistent à appliquer des procédés naturels à la production industrielle ».

comme la cosmétique, l'énergie, l'agriculture et la pharmaceutique. Cela s'explique par les nombreux avantages que procurent les enzymes, comme d'étonnantes régio-, chimio-, stéréosélectivité et stéréospécificité. L'incroyable efficacité de ces biocatalyseurs capables d'augmenter les cinétiques réactionnelles d'un facteur allant jusqu'à  $10^{10}$  permet de les utiliser à de faibles ratios molaires ( $10^{-4}$ ). Ils agissent également dans des conditions douces (pH, température, pression) minimisant ainsi d'éventuelles réactions secondaires non désirées. En plus d'être biodégradables et donc sans impact sur l'environnement, les enzymes fonctionnent en majorité en milieu aqueux sans solvant organique. Enfin, leur fonctionnement, exigeant des souvent des conditions très similaires, permettent de réaliser des réactions enzymatiques en cascade.

Le Laboratoire de Chimie Organique et de Biocatalyse (LCOB) dirigé par le Pr. Anne Zapparucha a été créé en 2007 au sein de l'UMR 8030 du Genoscope CEA-Université Evry Val d'Essonne-CNRS, à l'Institut de Génomique du CEA. Le laboratoire participe à une approche pluridisciplinaire d'identification de nouvelles réactions enzymatiques de bioconversion chez les bactéries en s'appuyant sur des analyses génomiques. L'équipe concentre son activité sur la recherche de nouvelles activités enzymatiques pour des applications en synthèse organique. Un des sujets est la recherche de nouvelles activités nitrilases.

Le LCOB bénéficie d'un environnement idéal à l'interface chimie-biologie et développe ses travaux de recherche en collaboration interne avec le Laboratoire de Clonage et de Criblage des Activités de Bioconversion (LCAB) dirigé par le Dr. Véronique de Berardinis, orienté vers le criblage à haut débit d'activités enzymatiques. Mon sujet de thèse a consisté à rechercher et à les appliquer à la synthèse de produits d'intérêt. En particulier nous avons recherché des activités  $\alpha$ -aminonitrilase pour la synthèse d' $\alpha$ -aminoacides.

Après une introduction générale sur les nitrilases et leurs intérêts, le premier chapitre sera consacré à la présentation du sujet de recherche et de l'état de l'art sur les nitrilases et la synthèse des  $\alpha$ -aminoacides. Dans le deuxième chapitre sera exposé le criblage de 163 enzymes sur un ensemble sélectionnés de nitriles. Dans le troisième chapitre, nous nous concentrerons sur le criblage à haut débit d'un plus grand nombre de protéines sur des substrats cibles du projet, à savoir six  $\alpha$ -aminonitriles. Enfin dans le quatrième chapitre, nous verrons un exemple d'application de nitrilases découvertes à l'issue du criblage pour la synthèse biocatalysée de molécules d'intérêt.

# CHAPITRE I

Présentation du sujet de recherche, état de l'art

# CHAPITRE I : Présentation du sujet de recherche, état de l'art

## I- Les nitrilases.

Les nitrilases sont des enzymes catalysant la réaction d'hydrolyse de liaisons C-N non peptidiques, comme des nitriles inorganiques ou organiques, transformés en acide formique et acides carboxyliques respectivement, avec libération d'ammoniaque (schéma 1).

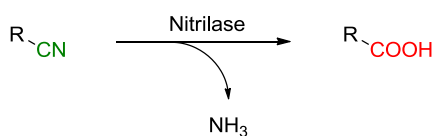
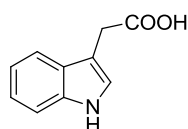


Schéma 1

### I-1 Présentation des nitrilases.

#### I-1.a Découverte et origines.

La première nitrilase a été découverte par Thimann et *al*<sup>2a</sup> en 1964. Cette enzyme a été extraite et isolée des feuilles d'orge. Elle interviendrait dans la voie de biosynthèse de l'auxine (**1**) (figure 1), principale hormone de croissance chez les plantes.



**1** : auxine

Figure 1

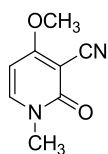
La même année, Hook et *al*<sup>2b, c</sup> ont découvert la première nitrilase provenant d'un organisme bactérien (appartenant au genre *Pseudomonas* probablement) isolé d'un sol riche en ricinine (**2**), agent toxique du ricin (figure 2).

<sup>2</sup> (a) Thimann K.V., Mahadevan S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1964**, 105, 133-141.

(b) Hook R.H., Robinson W.G., *J. Biol. Chem.*, **1964**, 239, 4257-4263.

(c) Hook R.H., Robinson W.G., *J. Biol. Chem.*, **1964**, 239, 4263-4267.





2 : ricinine

Figure 2

Après ces deux découvertes fondatrices, de nombreuses autres nitrilases ont été trouvées dans des organismes procaryotes (archaebactéries, et bactéries mésophiles, psychrophiles, thermophiles<sup>3a,b,c</sup>) et eucaryotes (champignons<sup>4</sup>).

### I-1.b Rôle biologique des nitrilases.

Les nitrilases sont produites par de nombreux organismes, plantes, champignons, bactéries mais leurs rôles biologiques sont relativement peu étudiés et restent donc hypothétiques. Elles interviendraient dans de nombreux processus biologiques. Thimann *et al.*<sup>2a</sup> avait proposé l'implication de la première nitrilase dans la voie de biosynthèse de l'auxine (**1**) à partir de l'indole-3-acétonitrile (**3**) (schéma 2), mais des résultats récents excluent l'implication de nitrilase dans cette voie de biosynthèse<sup>5</sup>.

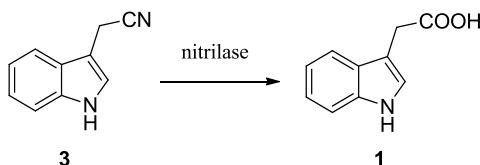


Schéma 2

Les nitrilases interviennent dans la detoxification et la transformation de biomolécules nitrilées lors du catabolisme de cyanoglucosides **4** (schéma 3) et de glucosinolates **7** (schéma 4).

<sup>3</sup> (a) Arnaud A., Galzy P., Jallageas J.C.R., *Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci.*, **1976**, 571-573.

(b) Banerjee A., Sharma R., Banerjee U., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2002**, 60, 33-44.

(c) Cowan D., Cramp R., Pereira R., Graham D., Almatawah Q., *Extremophiles*, **1998**, 2, 207-216.

<sup>4</sup> (a) Harper D.B., *Biochem. J.*, **1977**, 167, 685-692.

(b) Nolan L.M., Harnedy P.A., Turner P., Hearne A.B., O'Reilly C., *FEMS Microbiol. Lett.*, **2003**, 221, 161-165.

<sup>5</sup> Piotrowski M., *Phytochemistry*, **2008**, 69, 2655-2667.

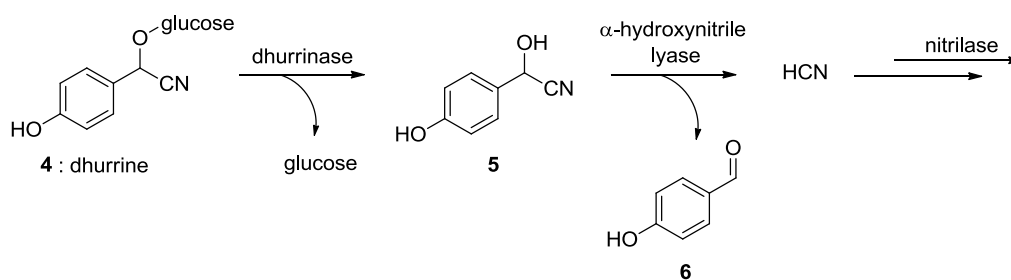


Schéma 3

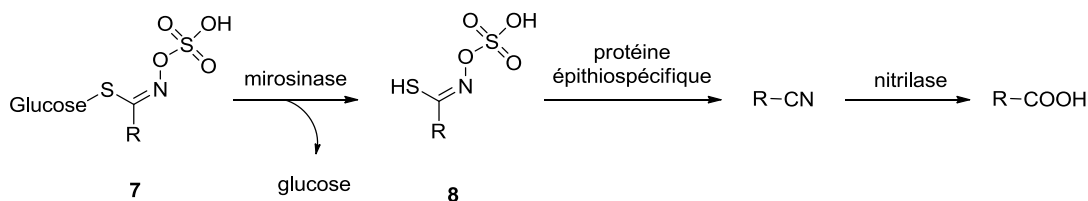


Schéma 4

L'acide cyanhydrique généré lors de la dégradation des cyanoglucosides ou dans le cas du cycle de Yang dont un des sous produits est l'éthylène est réutilisé chez les plantes pour former la  $\beta$ -cyanoalanine (**10**) par réaction avec la L-cystéine (**9**), catalysée par une  $\beta$ -cyanoalanine synthétase. La nitrilase catalyse l'hydrolyse de la  $\beta$ -cyanoalanine (**10**) en L-acide aspartique (**11**) et L-asparagine (**12**) (schéma 5).

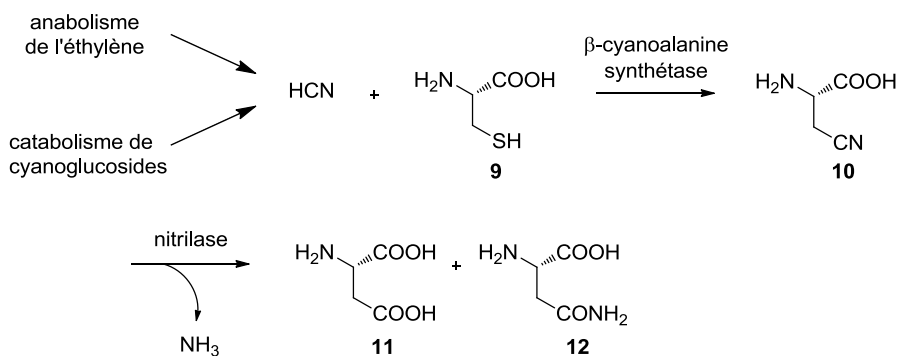


Schéma 5

Les nitrilases pourraient également jouer un rôle dans les interactions plantes-microbes<sup>6</sup>. Quant aux nitrilases retrouvées dans les champignons, elles pourraient avoir un rôle dans le recyclage de la matière végétale.

<sup>6</sup> Howden A.J.M., Preston G.M., *Microbial. Biotechnol.*, **2009**, 2, 441-451.

### ***I-1.c Classification.***

Lorsque la première nitrilase fut découverte, les auteurs la répertorièrent selon sa spécificité de substrat dans une classe nommée « nitrilase ». Cependant les travaux ultérieurs révélèrent que les nitrilases étaient souvent peu spécifiques.

En 2001, les nitrilases ont donc été regroupées dans une superfamille « nitrilase » basée sur l'homologie des séquences peptidiques et/ou la présence d'un domaine structural commun (CATH : 3.60.110.10) et possédant la triade catalytique Lys-Cys-Glu. Cette superfamille contient les enzymes hydrolysant les liaisons C-N non peptidiques. En 2002, C. Brenner *et al.*<sup>7</sup> en ont proposé une division en 13 branches (tableau 1).

Branches	Activité catalytique	Substrat(s)
1- nitrilase (EC 3.5.5)	nitrilase	nitriles
2- amidase aliphatique (EC 3.5.1.4)	amidase	amides
3- N-terminal amidase (sans EC)	amidase	amides, protéines
4- biotinidase (EC 3.5.1.12)	amidase	amides, protéines
5- $\beta$ -ureidopropionase (EC 3.5.1.6)	amidase	amides, composés N-carbamylé
6- carbamylase (sans EC)	amidase	amides, composés N-carbamylé
7- NAD synthétase procaryote (EC 6.3.5.1)	amidase	amides (prédit)
8- NAD synthétase eucaryote (EC 6.3.5.1)	amidase	amides (prédit)
9- apolipoprotéines N-acyltransférase (sans EC)	amidase	amides, protéines
10- Nit et Nitfhit (sans EC)	amidase/ amidase reverse	inconnu
11- sans nom (sans EC)	inconnu	inconnu

<sup>7</sup> (a) Brenner C., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2002**, 12, 775-782.

(b) Brenner C., Pace H.C., *Genome Biology*, **2001**, 2, (1): reviews 0001.1-0001.9.

12- sans nom (sans EC)	inconnu	inconnu
13- sans nom (sans EC)	inconnu	inconnu

Tableau 1

Dans cette classification, seule la branche 1 de la superfamille nitrilase contient les nitrilases catalysant l'hydrolyse de la fonction nitrile en acide carboxylique. Les branches 2 et 3 regroupent les amidases hydrolysant préférentiellement la glutamine et l'asparagine avec certaines enzymes de la branche 3 impliquées dans la régulation de l'ubiquitination. La branche 4 regroupe des amidases intervenant dans la biosynthèse de la biotine (**13**) (vitamine B<sub>8</sub>) (figure 3).

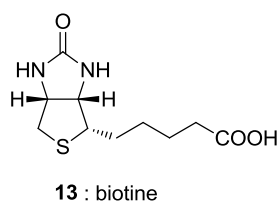


Figure 3

Les  $\beta$ -uréidopropionases rassemblées dans la branche 5 sont des amidases impliquées dans le catabolisme de l'uracile (**14**) et la thymine (**15**) chez les animaux (figure 4).

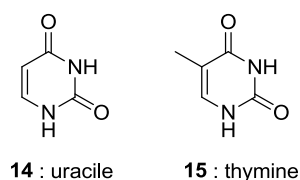


Figure 4

Les carbamylases de la branche 6 ont une activité amidase et interviennent dans la biosynthèse d'acides aminés D chez les bactéries. Les NAD synthétases procaryotes et eucaryotes répertoriées dans les branches 7 et 8 respectivement sont des amidases glutamine-dépendantes pour la production de NAD<sup>+</sup>. La branche 9 regroupe les apolipoprotéines *N*-acyltransférases impliquées dans la formation de liaisons C-N peptidiques entre une cystéine modifiée et l'acide palmitique. La branche 10 nommée Nit et Nitfhit est encore peu connue, elle contient des amidases et amidases « réverses ». Les trois dernières branches sont encore plus méconnues puisque ni la fonction des enzymes, ni leurs affinités de substrats ne sont

connus, cependant des domaines structuraux communs (fusionnés ou non) aux enzymes des autres branches ont été remarqués.

Dans ce travail, le terme « nitrilase » ne sera employé que pour désigner les enzymes appartenant à la branche 1. Aujourd'hui environ 40 nitrilases ont été classées et référencées dans la base de données B.R.E.N.D.A.<sup>8</sup>. Une classification subdivisée de la branche 1 a été réalisée selon la nature du substrat (tableau 2).

Branche 1 : nitrilases	Substrat(s)
EC 3.5.5.1	variés
EC 3.5.5.2	ricinine
EC 3.5.5.4	cyanoalanine
EC 3.5.5.5	nitriles aromatiques
EC 3.5.5.6	bromoxynil
EC 3.5.5.7	nitriles aliphatiques
EC 3.5.5.8	thiocyanate

Tableau 2

On voit dans le tableau ci-dessus que la classification distingue des activités nitrilases très spécifiques d'un nitrile comme les EC 3.5.5.2 et EC 3.5.5.6 et des activités peu spécifiques englobant une large famille de nitriles comme les EC 3.5.5.1 et 3.5.5.7. Cette classification apparaît donc comme peu pertinente.

### ***I-1.d Structure et mécanisme.***

#### ***I-1.d.i Structure.***

Les nitrilases sont constituées d'une chaîne polypeptidique de 30 à 45 kDa. Elles peuvent être monomériques ou associées pour former d'homo-oligomères. Ainsi, la nitrilase de

<sup>8</sup> <http://www.brenda-enzymes.org/>

*Rhodococcus rhodochrous* PA-34 est un monomère de 45 kDa tandis que celle de *Klebsiella pneumoniae* ssp.ozaenae est un homodimère<sup>9</sup> de 74 kDa. Cette oligomérisation se retrouve d'ailleurs dans toute la superfamille nitrilase avec une structure homodimérique majoritairement conservée de type sandwich  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ . Cette structure avait déjà été observée en 2000 par Nakai *et al*<sup>10</sup> sur une carbamylase mais n'avait jamais été mise en évidence sur une nitrilase jusqu'à la première analyse cristallographique d'une nitrilase de *Pyrococcus abyssi*<sup>11</sup> par Raczynska en 2011 (figure 5 et figure 5').

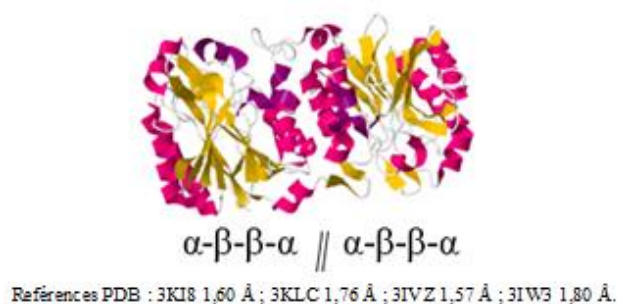


Figure 5

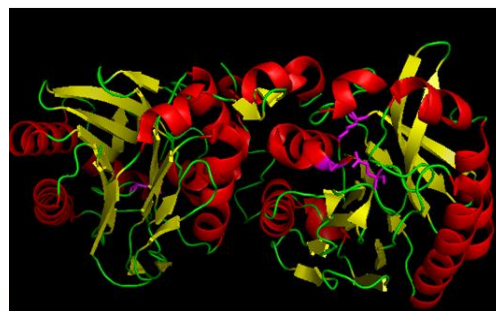


Figure 5'

La cristallisation de la protéine a été réalisée en présence d'ion acétate. Les acides aminés impliqués dans la triade catalytique (Glu42, Lys113 et Cys146) ont pu être mis en évidence (figure 6a). Les auteurs ont aussi réalisé une modélisation et montré l'implication de la valine Val173 et de la méthionine Met174 dans le positionnement du fumaronitrile (dessiné en jaune) (figure 6b).

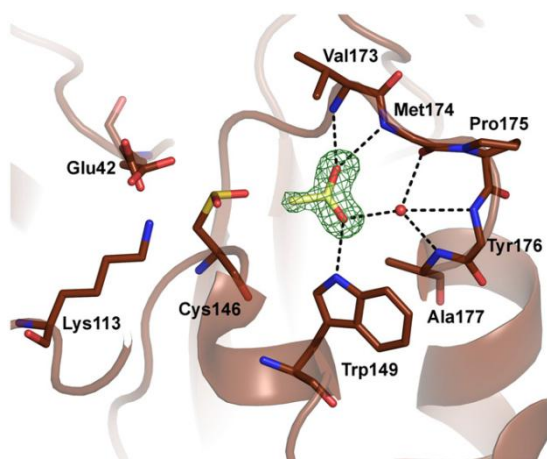


Figure 6a

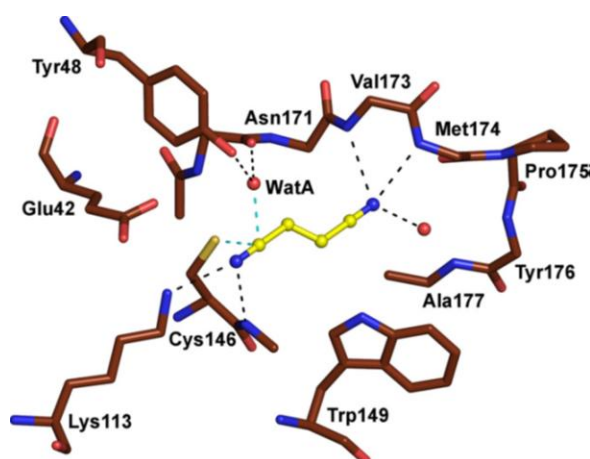


Figure 6b

<sup>9</sup> O'Reilly C., Turner P.D., *J. Appl. Microbiol.*, **2003**, *95*, 1161-1174.

<sup>10</sup> Nakai T., Hasegawa T., Yamashita E., Yamamoto M., Kumasaka T., Ueki T., Nanba H., Ikenaka Y., Takahashi S., Sato M., *Structure*, **2000**, *8*, 729-739.

<sup>11</sup> Raczynska E.J., Vorgias E.C., Antranikian G., Rypniewski W., *J. Struct. Biol.*, **2011**, *173*, 294-302.

### I-1.d.ii Mécanisme.

Dès 1964, sans connaissance de la structure de l'enzyme, Hook et Robinson avaient proposé un mécanisme expliquant la formation d'amide<sup>2b</sup> et d'acide carboxylique avec intervention dans le site actif d'un résidu nucléophile oxygéné ou soufré. Le mécanisme était alors inconnu. En 2011 Raczynska *et al.*<sup>11</sup> ont proposé, d'après des structures RX, que la réaction enzymatique mettait en jeu un trio d'acides aminés, avec la cystéine comme nucléophile, la lysine sous forme protonée comme acide et le glutamate comme base (schéma 6).

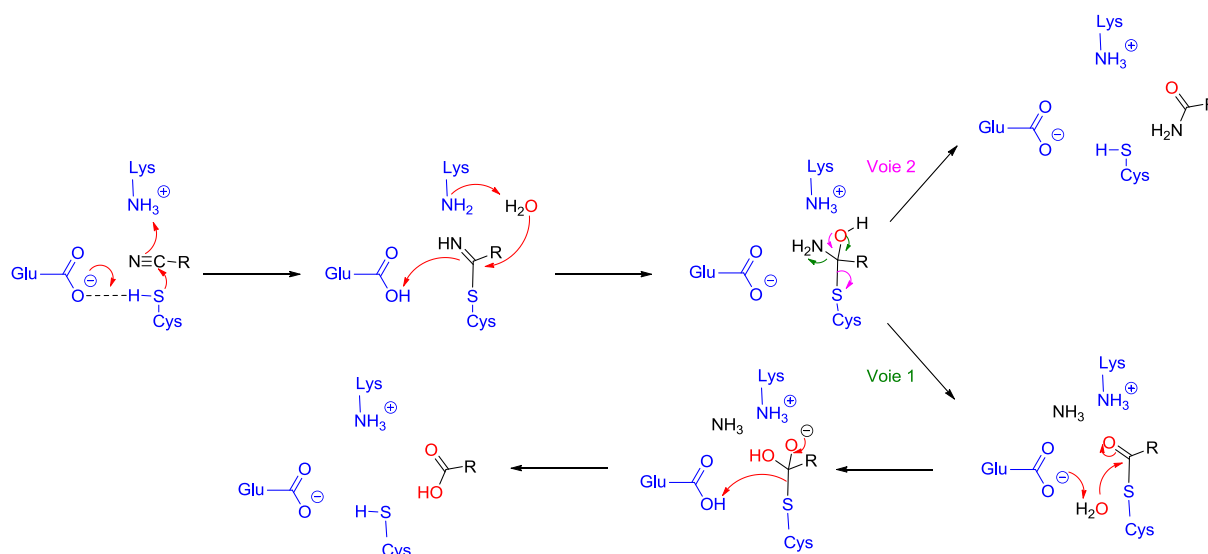


Schéma 6

Le passage par un intermédiaire tétraédrique peut occasionner une bifonctionnalité de l'enzyme qui lui confère une fonction nitrilase (voie 1) aboutissant à un acide et/ou une fonction appelée nitrile hydratase (voie 2) donnant l'amide (Cf.I-1.b, schéma 5). Kobayashi *et al.*<sup>12</sup> ont aussi montré qu'une nitrilase avait la capacité de transformer un substrat nitrile et son analogue amide, conférant une activité amidase en plus d'une activité nitrilase.

### I-2. Intérêt des nitrilases.

Les composés nitrilés sont largement répandus dans l'environnement. Comme nous l'avons vu au paragraphe I-1.b les dérivés nitrilés naturels sont divers, chez les plantes sous forme de cyanoglucosides, de cyanoglucosinolates et de cyanolipides. Ils sont aussi présents sous forme d'autres molécules comme la ricinine, le phénylacétonitrile et bien d'autres composés nitrilés issus de champignons, animaux, bactéries, éponges et algues<sup>4</sup>. À ces nitriles s'ajoutent ceux produits par les industries chimiques, dont certains s'avèrent très toxiques, mutagènes et

<sup>12</sup> Kobayashi M., Goda M., Shimizu S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1998**, 253, 662-666.

carcinogènes<sup>13</sup>. Les microorganismes possédant des nitrilases pourraient constituer des outils de biorémédiation pour éliminer les nitriles synthétiques produits par l'homme.

### ***I-2.a Biodégradation des herbicides.***

Les industries chimiques produisent une grande diversité de composés nitrilés comme les plastiques (acrylonitrile), les herbicides et pesticides (bromoxynil, dichlobenil, ioxynil...), les solvants organiques (acétonitrile), les gommages synthétiques (Buna-N, Perbunan). Tous ces composés nitrilés retrouvés dans la nature ont inéluctablement un impact sur l'environnement et des répercussions sur la santé publique.

Aujourd'hui, les organismes possédant des nitrilases ne sont pas utilisées pour la décontamination des sols, cependant leurs potentiels pourraient être exploités à l'avenir. Par exemple, en 2005, Holtze *et al*<sup>14</sup> ont trouvé un organisme (*R. erythropolis* 9675) capable d'hydrolyser le dichlobenil (**16**) (herbicide) en son analogue amide **17** (schéma 7).

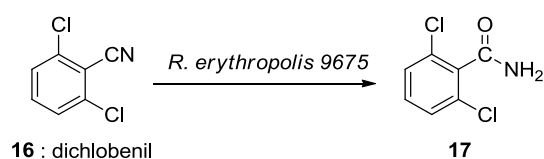


Schéma 7

### ***I-2.b Traitement des déchets.***

En plus des herbicides, un grand nombre de composés nitrilés synthétiques (cités ci-dessus I-2.a) s'est accumulé par négligence industrielle dans l'environnement et leur élimination est problématique. C'est notamment le cas de l'acrylonitrile (**18**) utilisé dans la synthèse de polymères. Plusieurs organismes ont montré une activité sur ce substrat, notamment *Streptomyces* sp. MTCC 7546,<sup>15</sup> est capable de l'hydrolyser en son analogue acide carboxylique **19** (schéma 8).

<sup>13</sup> Banerjee A., Sharma R., Banerjee U.C., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2002**, 60, 33-44.

<sup>14</sup> Holtze Sommer M., Sorensen J., Hansen H.C.B., Aamand J., *Biodegradation*, **2006**, 17, 503-510.

<sup>15</sup> Nigam V.K., Khandelwan A.K., Gothwal R.K., Mohan M.K., Choudhury B., Vidyarthi A.S., Ghosh P., *J. Biosci.*, **2009**, 34, 21-26.



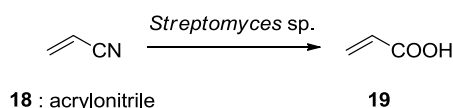


Schéma 8

### ***I-2.c Intérêt en synthèse organique.***

Le groupement nitrile est très utilisé en synthèse organique car il permet l'homologation de squelettes carbonés par des réactions simples (typiquement  $S_N2$  sur un halogénure d'alkyle). Il peut être réduit en fonction amine ou hydrolysé en fonction acide carboxylique. Les conditions expérimentales de ces transformations sont cependant drastiques, acide fort ou base forte, températures élevées, ce qui entraîne souvent des réactions non désirées ou même la dégradation du composé.

Dans ce contexte, les nitrilases, chimiosélectives par nature, sont une alternative intéressante. En synthèse organique préparative elles permettent à partir de nitriles facilement accessibles d'obtenir des composés de plus haute valeur ajoutée dans des conditions douces, même en présence de groupement sensibles. De plus les nitrilases sont souvent stéréospécifiques et permettent le dédoublement d'un mélange de stéréoisomères. Elles sont ainsi largement utilisées pour la production de synthons chiraux. Un des exemples les plus traités dans la littérature est l'hydrolyse du mandélonitrile (**20**) racémique en (*R*)-acide mandélique<sup>16a</sup> (**21**), réalisée par exemple, par Banerjee *et al.*<sup>16b</sup> avec 44% de conversion et 98,8% d'e.e sur organisme entier (*Pseudomonas putida* MTCC 5110) (schéma 9). Une production à grande échelle a aussi été réalisée pour l'obtention de ce composé<sup>17</sup>.

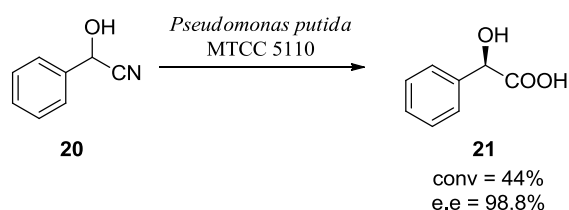


Schéma 9

Les nitrilases sont aussi utilisées dans l'élaboration de molécules bioactives à l'échelle industrielle comme le (*S*)-acide- $\alpha$ -méthyl-4-(2-méthylpropyl)-phénylpropanoïque (**23**) plus

<sup>16</sup> (a) Yamamoto K., Fujimatsu I., Komatsu K., *J. Ferment. Bioeng.*, **1992**, 73, 425-430.

(b) Banerjee A., Kaul P., Banerjee U.C., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2006**, 72, 77-87.

<sup>17</sup> Zhang Z.J., Xu J.H., He Y.C., Ouyang L.M., Liu Y.Y., *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, **2010**, 34, 315-322.

connu sous le nom d'ibuprofène<sup>18</sup> (schéma 10). Yamamoto *et al.* ont d'ailleurs produit ce composé avec 22% de rendement et 95% d'e.e sur organisme entier (*Acinetobacter sp.* Strain AK226).

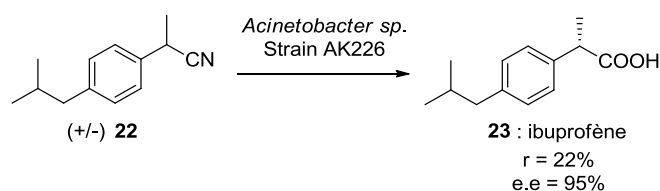


Schéma 10

Certaines nitrilases, régiosélectives, catalysent la désymétrisation de dérivés dinitriles comme le 3-hydroxypentanedinitrile (**24**), précurseur du Lipitor (**26**), préconisé dans le traitement de l'hypercholestérolémie (schéma 11). Desantis *et al.*<sup>19a</sup> décrivent l'utilisation d'une nitrilase obtenue par mutagénèse, pour cette transformation, ils obtiennent 100% de conversion avec un e.e de 98%.

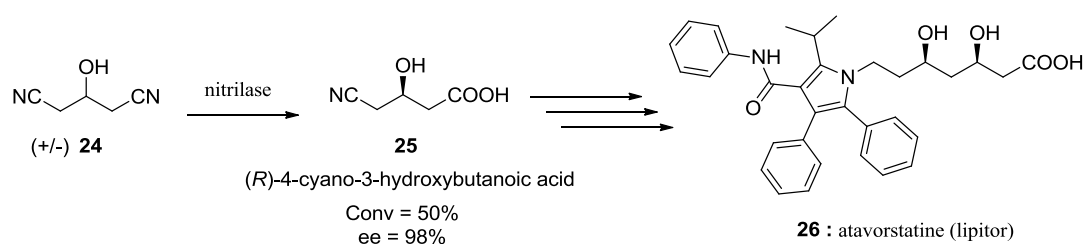


Schéma 11

Les nitrilases sont aussi utilisées dans la synthèse de polymères comme le polyacrylamide (**27**) à partir d'acrylonitrile (**18**) (schéma 12). Ce procédé biocatalytique a été développé par Watanabe<sup>19b</sup> comme une alternative plus écologique au procédé existant.

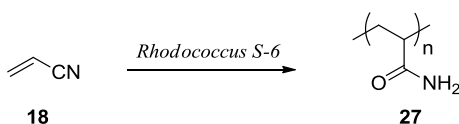


Schéma 12

<sup>18</sup> Yamamoto K., Ueno Y., Otsubo K., Kawakami K., Komatzu K., *Appl. Env. Microbial.*, **1990**, *10*, 3125-3129.

<sup>19a</sup> (a) DeSantis G., Wong K., Farwell B., Chatman K., Zhu Z., Tomlinson G., Huang H., Tan X., Bibbs L., Chen P., Kretz K., Burk M.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 11476-11477.

<sup>19b</sup> (b) Watanabe I., *Methods in enzymology*, **1987**, *136*, 523-530.

## II- L'enjeu et les axes d'études.

L'objectif de ce travail de thèse est la recherche de nouvelles activités nitrilases. Notre travail sera principalement axé sur la recherche d'enzymes actives sur les  $\alpha$ -aminonitriles qui par une simple réaction d'hydrolyse conduisent aux acides  $\alpha$ -aminés correspondants. Nous présenterons dans ce chapitre tout l'intérêt des  $\alpha$ -aminoacides et donc l'intérêt concomitant de disposer de voies de synthèse asymétriques efficaces permettant l'accès à ces composés (schéma 13).

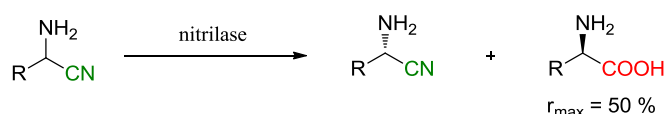


Schéma 13

Un des inconvénients majeurs de la synthèse envisagée à partir d'un mélange racémique d' $\alpha$ -aminonitriles, est la limitation à 50% de rendement en acide  $\alpha$ -aminé énantiopur, si toutefois la nitrilase étudiée est stéréospécifique, ce que nous recherchons. C'est un dédoublement cinétique.

Nous avons donc envisagé de coupler l'activité nitrilase à une activité racémase qui, en racémisant l' $\alpha$ -aminonitrile n'ayant pas réagi, permettrait de reformer petit à petit dans le milieu de l' $\alpha$ -aminonitrile qui lui sera transformé par la nitrilase et donc d'obtenir potentiellement un rendement de 100% en produit désiré, c'est alors un dédoublement cinétique dynamique (schéma 14).

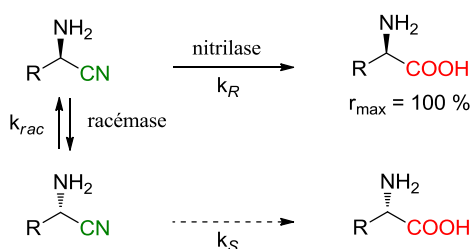


Schéma 14

Pour être efficace le dédoublement cinétique dynamique doit respecter plusieurs critères (exemple avec énantiomère (*R*) transformé) :

- l'activité nitrilase ne doit pas avoir d'activité nitrile hydratase.
- la résolution doit être irréversible, c'est le cas avec l'activité nitrilase,

- le rapport des constantes de vitesse de la réaction sur les deux énantiomères doit être au moins de 20,  $k_R/k_S \geq 20$ ,
- la constante de vitesse de la réaction de racémisation doit être égale ou supérieure à la vitesse de la réaction sur l'énantiomère le plus rapidement transformé  $k_{rac} \geq k_R$ , sinon le milieu s'épuise en cet énantiomère,
- si les excès énantiomériques de la réaction principale sont modestes, la constante de vitesse de la racémisation doit être supérieure à la constante de vitesse de la réaction d'un facteur 10,  $k_{rac}/k_R \approx 10$ ,
- le produit d'arrivée ne doit pas être substrat de la réaction de racémisation.











Le  $pK_a$  du H  $\alpha$  des  $\alpha$ -aminonitriles est légèrement inférieur à celui des  $\alpha$ -aminoacides et donc une racémisation chimique pourrait également être envisagée.

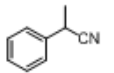
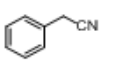
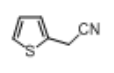
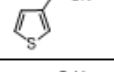
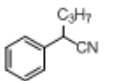
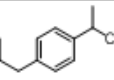
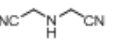
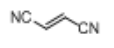
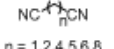
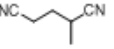
Les nouvelles enzymes seront recherchées selon une approche génomique. Les activités nitrilases seront testées sur un panel de substrats comprenant les  $\alpha$ -aminonitriles, précurseurs des  $\alpha$ -aminoacides, mais également des substrats de structures variées afin d'étendre le champ d'applications des nitrilases découvertes.

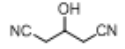
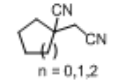
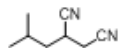
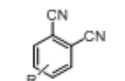
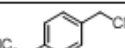
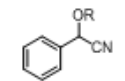
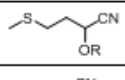
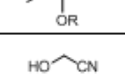

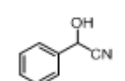
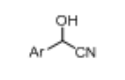
### **III- Les nitrilases : état de l'art.**

#### ***III-1 Nitrilases actives sur des substrats autres que des $\alpha$ -aminonitriles.***

Les nitrilases sont des enzymes très étudiées et de nombreux travaux ont été publiés sur leurs activités. Des dérivés très variés ont été testés comme substrats et les nitrilases ont montré une activité sur nombre d'entre eux. Le tableau 3 ci-dessous présente un état de l'art des activités nitrilases avec la meilleure activité (rendement, conversion et activité relative) sur un ou plusieurs nitriles. Nous avons choisi de présenter cet état de l'art en fonction de la nature des substrats : saturés,  $\alpha,\beta$ -insaturés, de type benzonitrile, aromatiques hétérocycliques, arylacétonitriles, dinitriles,  $\alpha$  et  $\beta$ -hydroxynitriles,  $\beta$  et  $\gamma$ -aminonitriles.

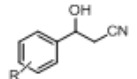
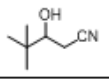
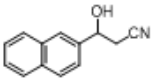
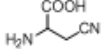
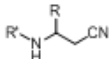
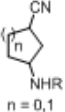
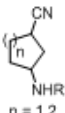
Famille de substrats	N°	Organisme (nitrilase)	Substrat	Excès énantiomérique	Régiosélectivité	Ref.
Saturé	1	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	<b>28-30</b> 			20
	2	<i>Zea mays</i> (ZmNIT2)				21
	3	<i>Arabidopsis thaliana</i> (AtNIT1)	<b>31</b> 			22
α-β insaturé	4	<i>Streptomyces</i> sp. MTCC 7546	<b>18</b> 			16
	5	<i>Rhodococcus Rhodochrous</i> K22				23
	6	<i>Arabidopsis thaliana</i> (AtNIT1)	<b>32</b> 			22
Benzonitrile	7	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> d3	<b>33</b> 			24
	8	<i>Aspergillus niger</i> K10				25
	9	<i>Zea mays</i> (ZmNIT2)				21
	10	<i>Bacillus pallidus</i> Dac521				26
	11	Nitrilases de diverses espèces				15
Aromatique heterocyclique	12	<i>Bacillus pallidus</i> Dac521	<b>34</b> 			26
	13	<i>Aspergillus niger</i> K10				27
	14	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> LHS-305				28
	15	<i>Nocardia globerula</i> NHB-2				29,30
	16	<i>Rhodococcus Rhodochrous</i> J1	<b>35</b> 			31
	17		<b>36</b> 			
	18	<i>Rhodococcus</i> sp. 409	<b>37</b> 			32
19	<b>38</b> 					

Arylacetonitrile	20	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	39		0%		20	
	21		40					
	22	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> d3	41				24	
	23		42					
	24	<i>Rhodococcus Rhodochrous</i> K22	43		0%		23	
	25		22		95% (S)			
	26	<i>Pseudomonas fluorescens</i> EBC191					33	
	27	<i>Acinetobacter</i> sp. AK226					34	
Dinitriles	28	<i>Rhodococcus Rhodochrous</i> K22	44				23	
	29	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PF-5					35	
	30	<i>Pyrococcus abyssi</i> GE5	45				36	
	31	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803				mono	20	
	32		46-51			variable		
	33	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110				di	37	
	34	<i>Alcaligene faecalis</i> ATCC8750				mono	38	
	35	<i>Acidovorax facilis</i> 72W	52				mono	39
	36	<i>Zea mays</i> (ZmNIT2)					di	21

Dinitriles	37	<i>Diversa</i> BD9570	24		99% (R)	mono	40
	38	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	53-55			mono	41
	39	<i>Arabidopsis thaliana</i> (AtNIT1)	56		98% (S)	mono	42
	40	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 7155	57			mono	43
	41		58			mono	
$\alpha$ -hydroxynitrile	42	<i>Alcaligene faecalis</i> ATCC8750	59		0 % <e.e< 61 % (S)		38
	43		60				
	44		61				
	45	<i>Acidovorax facilis</i> 72W	62				45
	46	<i>Pseudomonas putida</i>	20		99,98% (R)		47
	47	<i>Klebsiella oxytoca</i> 38.1.2			95% (S)-amide		48
	48	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110			36% (S)		37
	49	<i>Zea mays</i> (ZmNIT2)			100% (R)		37
	50	(Nitrilase I)	63		95 % <e.e< 99 % (R)		49
	51	(Nitrilase II)			91 % <e.e< 99 % (S)		

mono = monoacide

di = diacide

β-hydroxynitrile	52	<i>Zea mays</i> (ZmNIT2)	64 	<40%		21
	53	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	65 	23 % <e.e< 65 % (S)		20
	54			0 % <e.e< 2 % (S)		
	55			66 		
β-aminonitrile	56	<i>Arabidopsis thaliana</i> (NIT4)	67 			50
	57	<i>Rhodococcus erythropolis</i> AJ270 nitrile hydratase/amidase	68 			51
	58	Nitrilases Codexis (NIT 101 à NIT 112)				52
	59	Nitrilases Codexis (NIT 106 à NIT 108)	69-70 			53
	60			10 % <e.e< 76 %		
γ-aminonitrile	61	Nitrilases Codexis (NIT 101 à NIT 108)	70-71 			54
	62	<i>Aspergillus niger</i> K10		0 % <e.e< 99 %		53
	63	<i>Fusarium solani</i> O1				



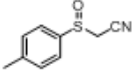

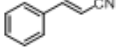
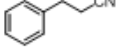
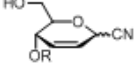
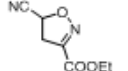
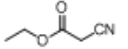
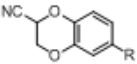
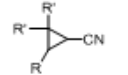
Sulfoxynitriles Sulfonylnitriles	64	(Nitrilases commerciales) Biocatalytic Europe GmbH	72		1% <e.e.< 83 % (R) ou (S)		55
	65	<i>Zea mays</i> (ZmNIT2)	73				21
	66	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110					37
Nitrile variés difficile à classer	67	<i>Zea mays</i> (ZmNIT2)	74				21
	68	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	75				20
	69	<i>Rhodococcus</i> sp. 409	76				32
	70		77				
	71	<i>Alcaligene faecalis</i> ATCC8750	78				38
	72	<i>Rhodococcus Alcaligenes pseudomonas</i>	79		1,5 % <e.e.< 99 % (R)		56
	73	<i>Rhodococcus</i> sp. AJ270 couple nitrile hydratases/amidase	80		12 % <e.e.< 99 % (S)		57,58,59

Tableau 3

- <sup>20</sup> Mukherjee C., Dunming Z., Biehl E.R., Hua L., *Eur. J. Chem.*, **2006**, 5238-5242.
- <sup>21</sup> Mukherjee C., Dunming Z., Biehl E.R., Parmar R., *Tetrahedron*, **2006**, 62, 6150-6154.
- <sup>22</sup> Effenberger F., Oßwald S., *Tetrahedron Asym.*, **2001**, 12, 2581-2587.
- <sup>23</sup> Kobayashi M., Yanaka N., Nagasawa T., Yamada H., *J. Bacteriol.*, **1990**, 172, 4807-4815.
- <sup>24</sup> Bauer R., Hirrlinger B., Layh N., Stolz A., Knackmuss H.J., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1994**, 42, 1-7.
- <sup>25</sup> Šnajdrová R., Kristová-Mylerová V., Crestia D., Nikolaou K., Kuzma M., Lemaire M., Galienne E., Bolte J., Bezouška K., Křen V., Martínková L., *J. Mol. Catal. B Enz.*, **2004**, 29, 227-232.
- <sup>26</sup> Almatawah Q.A., Cramp R., Cowan D.A., *Extremophiles*, **1999**, 3, 283-291.
- <sup>27</sup> Kaplan O., Vejvoda V., Plíhal O., Pompach P., Kavan D., Bojarová P., Bezouška K., Macková M., Cantarella M., Jirků V., Křen V., Martínková L., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2006**, 73, 567-575.
- <sup>28</sup> Yang C., Wang X., Wei D., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2011**, 165, 1556-1567.
- <sup>29</sup> Sharma N.N., Sharma M., Kumar H., Bhalla T.C., *Process. Biochem.*, **2006**, 41, 2078-2081.
- <sup>30</sup> Sharma N.N., Sharma M., Bhalla T.C., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **2011**, 38, 1235-1243.
- <sup>31</sup> Kobayashi M., Nagasawa T., Yamada H., *Eur. J. Biochem.*, **1989**, 182, 349-356.
- <sup>32</sup> Klempier N., Raadt A., Faber K., Grieng H., *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 341-344.
- <sup>33</sup> Kisiak C., Conradt D., Stolz A., Mattes R., Klein J., *Microbiology*, **2005**, 151, 3639-3648.
- <sup>34</sup> Yamamoto K., Ueno Y., Otsubo K., Kawakami K., Komatsu K.I., *Appl. Env. Microbiol.*, **1990**, 10, 3125-3129.
- <sup>35</sup> Kim J.S., Tiwari M.K., Moon H.J., Jeya M., Ramu T., Oh D.K., Kim I.W., Lee J.K., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2009**, 83, 273-283.
- <sup>36</sup> Mueller P., Egorova K., Vorgias E.C., Boutou E., Trauthwein H., Verseck S., Antranikian G., *Prot. Express. Purif.*, **2006**, 47, 672-681.
- <sup>37</sup> Zhu D., Mukherjee C., Yang Y., Rios E.B., Gallagher D.D.T., Smith N.N., Biehl E.R., Hua L. *J. Biochem.*, **2008**, 133, 327-333.
- <sup>38</sup> Rey P., Rossi J.C., Taillades J., Gros G., Nore O., *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 8155-8162.
- <sup>39</sup> Chauhan S., Wu S., Blumerman S., Fallon R.D., Gavagan J.E., DiCosimo R., Payne M.S., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2003**, 61, 118-122.
- <sup>40</sup> Bergeron S., Chaplin D.A., Edwards J.H., Ellis B.S.W., Hill C.L., Holt-Tiffin K., Knight J.R., Mahoney T., Osborne A.P., Rucroft G., *Org. Process. Res. Dev.*, **2006**, 10, 661-665.
- <sup>41</sup> Zhu D., Mukherjee C., Biehl E.R., Hua L., *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, 349, 1667-1670.
- <sup>42</sup> Xie Z., Feng J., Garcia E., Bernett M., Yazbeck D., Tao J., *J. Mol. Catal. B Enz.*, **2006**, 41, 75-80.
- <sup>43</sup> Brady D., Beeton A., Zeevaart J., Kgaje C., Rantwijk V.F., Sheldon R.A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2004**, 64, 76-85.
- <sup>44</sup> Vejvoda V., Šveda O., Kaplan O., Přikrylová V., Elišáková V., Himl M., Kubáč D., Pelantová H., Kuzma M., Křen V., Martínková L., *Biotechnol. Lett.*, **2007**, 29, 1119-1124.
- <sup>45</sup> Wu S., Fogiel A.J., Petrillo K.L., Jackson R.E., Parker K.N., DiCosimo R., Ben-Bassat A., O'Keefe D.P., Payne M.S., *Biotechnol. Bioeng.*, **2008**, 99, 717-720.
- <sup>46</sup> Zhanga Z.J., Pana J., Liua J.F., Xua J.H., Heb Y.C., Liu Y.Y., *J. Biotechnol.*, **2011**, 152, 24-29.
- <sup>47</sup> Kaul P., Banerjee A., Mayilraj S., Banerjee U.C., *Tetrahedron Asym.*, **2004**, 15, 207-221.
- <sup>48</sup> Ewert C., Lutz-Wahl S., Fischer L., *Tetrahedron Asym.*, **2008**, 19, 2573-2578.
- <sup>49</sup> DeSantis G., Zhu Z., Greenberg W.A., Wong K., Chaplin J., Hanson S.R., Farwell B., Nicholson L.W., Rand C.L., Weiner D.P., Robertson D.E., Burk M.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 9024-9025.
- <sup>50</sup> Piotrowski M., Schönfelder S., Weiler E.W., *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 2616-2621.
- <sup>51</sup> Ma D.Y., Wang D.X., Pan J., Huang Z.T., Wang M.X., *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 4087-4091.
- <sup>52</sup> Winkler M., Meischler D., Klempier N., *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, 349, 1475-1480.
- <sup>53</sup> Winkler M., Kaplan O., Vejvoda V., Klempier N., Martínková L., *J. Mol. Catal. B Enz.*, **2009**, 59, 243-247.
- <sup>54</sup> Winkler M., Knall A.C., Kulterer M.R., Klempier N., *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 7423-7426.
- <sup>55</sup> Kielbasinski P., Rachwalski M., Mikołajczyk M., Rutjes F.P.J.T., *Tetrahedron Asym.*, **2008**, 19, 562-567.
- <sup>56</sup> Benz P., Muntwyler R., Wohlgemuth R., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2007**, 82, 1087-1098.
- <sup>57</sup> Wang M.X., Feng G.Q., *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 6501-6505.
- <sup>58</sup> Wang M.X., Feng G.Q., *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 621-624.
- <sup>59</sup> Wang M.X., Feng G.Q., *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 621-624.

Nous n'avons choisi dans cet état de l'art que les résultats les plus marquants. Tous les substrats testés ne sont donc pas représentés.

De nombreuses nitrilases issues de divers organismes se sont avérées être actives sur une grande variété de nitriles. En effet comme le montre cet état de l'art, des nitriles appartenant à plus de douze familles structurales sont substrats.

Globalement les nitriles hydrophobes (saturés, insaturés, et aromatiques) semblent être de bons substrats. Des substrats présentant une polarité avec un groupement de type hydroxyle peuvent être convertis (entrées 45-55). Des substrats plus polaires tels que les  $\beta$ -aminonitriles ont été testés (entrées 56-60).

Sur les dérivés chiraux racémiques ou prochiraux (entrées 20, 26, 27, 37, 39, 42, 46-49, 50-55, 60, 61-64, 72, 73), les excès énantiomériques observés sont de faibles à excellents, les nitrilases montrant dans l'ensemble une bonne stéréospécificité. On observe également des nitrilases régiosélectives conduisant au produit de monohydrolyse (entrées 31, 34, 35, 37-41) sur des dérivés dinitriles.

Le projet de la thèse repose essentiellement sur la recherche de nouvelles activités nitrilase sur les  $\alpha$ -aminonitriles. Les études sur les nitrilases actives sur cette famille de substrats sont donc présentées de façon plus exhaustive dans un autre tableau (tableau 4). Dans la première colonne sont reportés les noms des organismes et la nature des activités enzymatiques. Les produits sont tous des acides carboxyliques mais ils peuvent être obtenus soit en une étape par une activité nitrilase, soit en deux par une activité nitrile hydratase suivie d'une amidase (figure 6c).

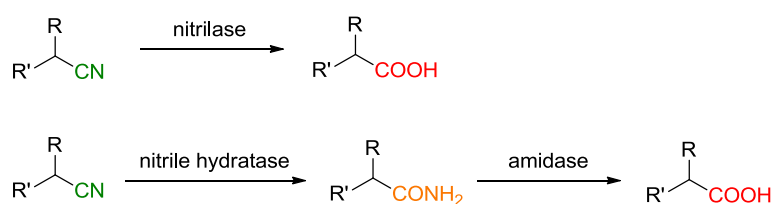


Figure 6c

**III-2 Nitrilases actives sur les  $\alpha$ -aminonitriles.**

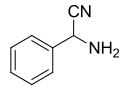
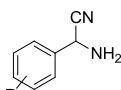
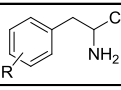
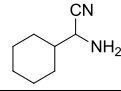
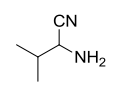
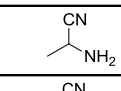
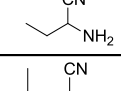
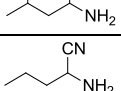
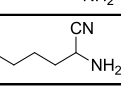
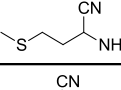
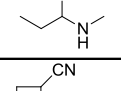
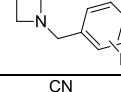
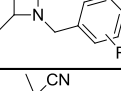
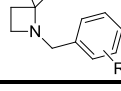
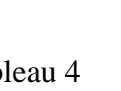
Organisme enzyme(s)	N°	Substrat	Rendement (* isolé)	E.e (* E.d)	Ref.
<i>Aspergillus fumigatus</i> nitrile hydratase/amidase	1		50%	80% (S)	60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10145 nitrilase	2	<b>81</b> 	50%	98% (R)	61
	3		52%*	99% (S)	62
<i>Rhodococcus</i> sp. AJ270 nitrile hydratase/amidase	4	<b>82</b> 	42% à 51%*	96% à 99% (S)	
	5	<b>83</b> 	42%*	51 (S)	
	6	<b>84</b> 	47%*	>99% (S)	
	7	<b>85</b> 	47%	34% (S)	
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> PA-34 nitrilase	8			100% (S)	63
	9	<b>86</b> 		57,5% (R)	
	10	<b>87</b> 		100% (S)	
	11	<b>88</b> 		90% (S)	
	12	<b>89</b> 		93% (S)	
	13	<b>90</b> 			
	14	<b>91</b> 		96% (S)	
	15	<b>92</b> 			
<i>Rhodococcus erythropolis</i> nitrile hydratase/amidase	16	<b>93</b> 	37% à 49%*	89% à 99,5% (R)	64
	17	<b>94</b> 	39%*	99% (SR)*	
	18	<b>95</b> 	30%*	91% (R)	

Tableau 4

- <sup>60</sup> Choi S.Y., Goo Y.M., *Arch. Pharm. Res.*, **1986**, *1*, 45-47.
- <sup>61</sup> Alonso O.M.A., Antunes O.A.C., Oestreicher E.G., *J. Braz. Chem. Soc.*, **2007**, *18*, 566-571.
- <sup>62</sup> Wang, M.X., Lin S.J., *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 6542-6545.
- <sup>63</sup> Bhalla T.C., Miura A., Wakamoto A., Ohba Y., Furuhashi K., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1992**, *37*, 184-190.
- <sup>64</sup> Leng D.H., Wang D.X., Pan J., Huang Z.T., Wang M.X., *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 6077-6082.

Comme nous l'avons vu précédemment dans le tableau 4, peu de nitrilases ont été testées sur les  $\beta$ -aminonitriles. C'est également le cas pour les  $\alpha$ -aminonitriles puisque seulement cinq exemples d'activités  $\alpha$ -aminonitrilases sur 15 substrats ont été publiés dont aucun sur enzyme isolée. Parmi eux on trouve deux activités nitrilase (entrées 2, 8-12 et 14) et trois activités couplées nitrilase hydratase/amidase (entrées 1, 3-7 et 16-18) conduisant toutes aux acides  $\alpha$ -aminés correspondants. Les excès énantiomériques sont bons ou excellents et même si les composés obtenus sont majoritairement de configuration absolue (*S*), certaines nitrilases conduisent à la formation de l'acide  $\alpha$ -aminé (*R*) (entrées 2 et 9). On voit là tout l'intérêt de chercher des nitrilases actives sur les  $\alpha$ -aminonitriles, substrats facilement synthétisables par différentes méthodes, car on peut ainsi avoir accès à des acides  $\alpha$ -aminés naturels ou non naturels.

## IV- Les $\alpha$ -aminoacides.

### IV-1 Présentation.

Les  $\alpha$ -aminoacides sont des molécules aux multiples propriétés. 22 sont constitutifs des protéines (les 21<sup>ème</sup> et 22<sup>ème</sup> sont la sélénocystéine et la pyrrolysine) et leurs enchainements sont codés par le code génétique, ils sont dits protéinogènes. On les retrouve, parfois modifiés, dans des peptides linéaires, comme l'enképhaline (**96**), ou cycliques à activité variée (figure 7).

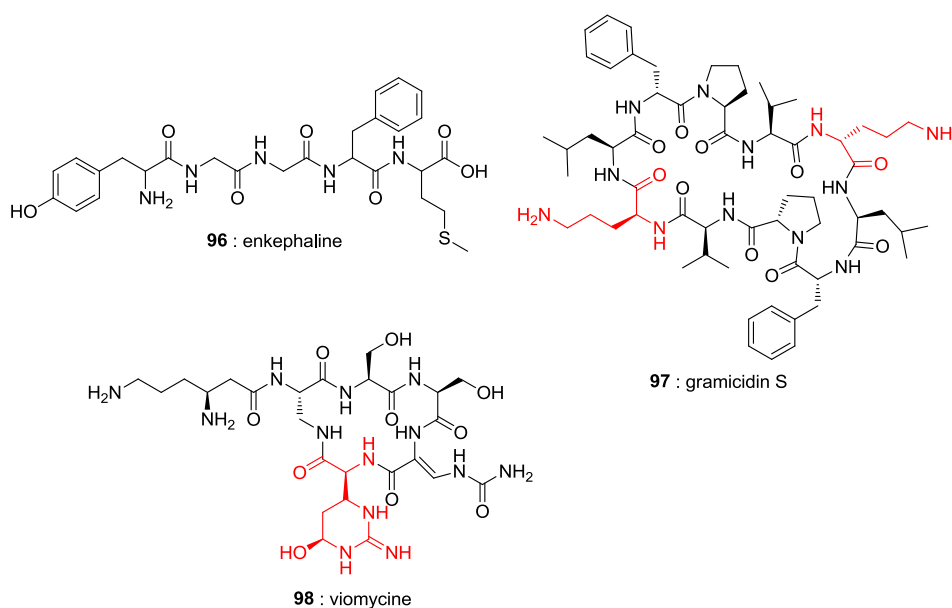
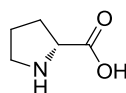


Figure 7

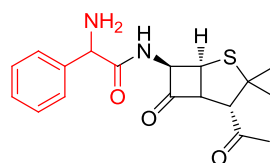
D'accès facile, à faible coût, ils sont utilisés en synthèse organique comme briques chirales élémentaires de construction pour l'élaboration de molécules plus complexes, par exemple des protéines synthétiques<sup>65</sup> ou comme organocatalyseurs, un des plus utilisés étant la proline (**99**)<sup>66</sup> (figure 8).



**99** : proline

Figure 8

Les  $\alpha$ -aminoacides non naturels ont eux aussi de nombreuses applications : également comme briques élémentaires pour la synthèse, intégrés dans des structures à géométrie contrainte ou molécules d'intérêt pharmacologique, leur grande variété permet le développement de molécules peptidiques ou non peptidiques de structures très variées. Par exemple, la phénylglycine est constitutive de l'ampicilline (**100**), un antibiotique synthétique de type aminopénicilline (figure 9).



**100** : ampicilline

Figure 9

La 2-naphtylalanine est retrouvée dans le synarel, médicament contenant de la nafareline, un peptide utilisé dans le traitement de l'endométriose<sup>67</sup>. La L-homophénylalanine est utilisée pour la synthèse de l'énalapril (**102**), un antihypertenseur<sup>68</sup>. Certains acides aminés non naturels sont utilisés pour l'élaboration de pseudopeptides comme le telaprevir (**103**)<sup>69</sup>, inhibiteur de la sérine protéase NS3-NS4A du virus de l'hépatite C ou pour l'élaboration de peptidomimétiques comme celui synthétisé par Singh *et al.* pour inhiber l'activité d'une protéase à sérine<sup>70</sup> (figure 10).

<sup>65</sup> Koder L.R., Anderson J.L.R., Solomon L.A., Reddy K.S., Moser C.C. & Dutton P.L., *Nature*, **2009**, 458, 305-309.

<sup>66</sup> Hajos Z.G., Parrish D.R., *J. Org. Chem.*, **1974**, 39, 1615-1621.

<sup>67</sup> Schriock E., Monroe S.E., Henzl M., Jaffe R.B., *Fertil. Steril.* **1985**, 44, 583-588.

<sup>68</sup> Grunfeld J.P., Landais P., Ferran C., *Presse medicinale*, **1985**, 14, 2213-2214.

<sup>69</sup> Smith L.S., Nelson M., Naik S., Woten J., *Annals of pharmacotherapy*, **2011**, 45, 639-648.

<sup>70</sup> Singh S., Sieburth S.M.N., *Org. Lett.*, **2012**, 14, 4422-4425.

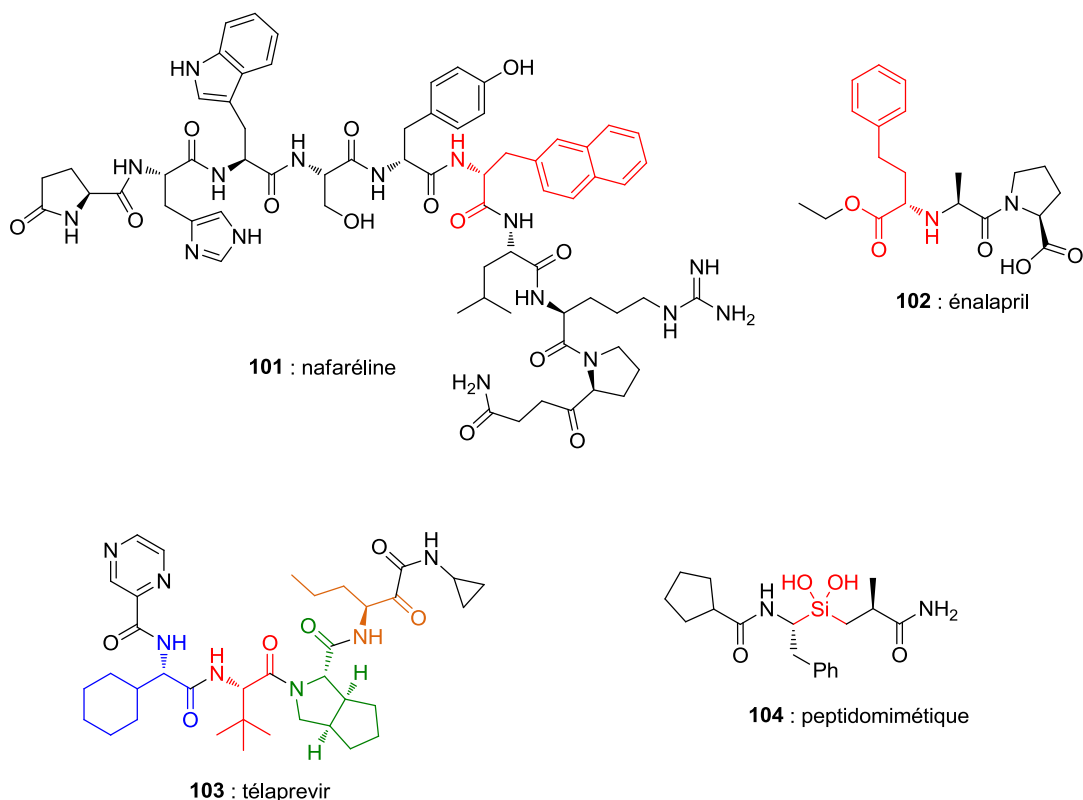


Figure 10

Tout récemment, dans le domaine de l'ingénierie des protéines, les  $\alpha$ -aminoacides non naturels ont aussi été utilisés pour modifier le site actif<sup>71</sup> d'une enzyme.

#### IV-2. Synthèse d' $\alpha$ -aminoacides.

Les acides aminés naturels et non naturels sont utilisés de façon multiples. C'est pourquoi, depuis le 19<sup>ème</sup> siècle, de nombreux procédés de synthèse ont été mis au point, donnant dans un premier temps accès au mélange racémique, puis, avec le développement des méthodes de synthèse asymétrique, aux acides aminés énantiopurs. Aujourd'hui de nouvelles approches se développent. Les synthèses les plus courantes sont discutées ci-après.

##### IV-2.a Synthèse racémique.

Il existe trois grandes synthèses génériques des acides aminés. La première date de 1850 et a été mise au point par un chimiste allemand, Adolph Strecker<sup>72</sup>. Cette réaction, qui porte

<sup>71</sup> Hosseini M., Jiang L., Sorensen H.P., Jensen J.K., Christensen A., Fogh S., Yuan C., Andersen L.M., Huang M.D., Andreasen P.A., Jensen K.J., *Mol. Pharm.*, **2011**, 80, 585-59.

<sup>72</sup> Strecker A., *Annalen der Chemie und Pharmazie*, **1850**, 75, 27-45.



le nom de son inventeur, permet de synthétiser à partir d'un aldéhyde, de chlorure d'ammonium et de cyanure de potassium un intermédiaire  $\alpha$ -aminonitrile qui est converti par hydrolyse en milieu acide conduit à l' $\alpha$ -aminoacide correspondant (schéma 15).

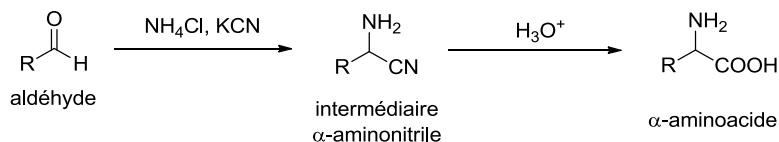


Schéma 15

La réaction de Strecker permet de synthétiser une assez grande variété d'acides aminés du fait de la diversité de groupement R porté par l'aldéhyde de départ.

La synthèse de Gabriel<sup>73</sup>, qui a initialement été mise au point pour la synthèse d'amines primaires à partir d'un ion phthalimide et d'un halogénure d'alkyle primaire ou secondaire, a aussi été utilisée pour la synthèse racémique d' $\alpha$ -aminoacides. Cette réaction est réalisée en présence de bromomalonate de diéthyle (**105**), de phthalimide et d'un halogénure d'alkyle en milieu basique et suivie d'une hydrolyse en milieu acide pour donner l' $\alpha$ -aminoacide racémique (schéma 16).

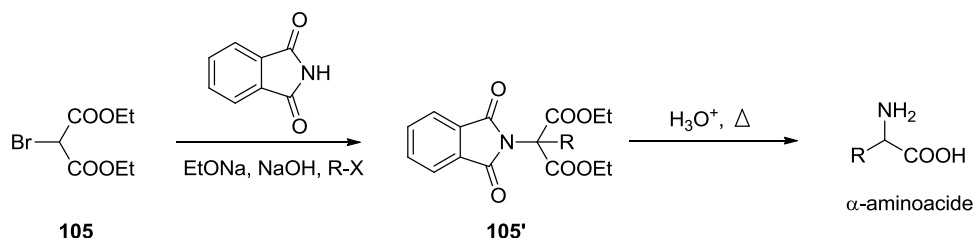


Schéma 16

Comme pour la réaction de Strecker, un assez grand nombre d' $\alpha$ -aminoacides peuvent être synthétisés par cette méthode grâce à la variété de groupement R du dérivé halogéné.

La réaction d'Hell-Volhard Zelinsky<sup>74</sup> découverte initialement pour la synthèse d' $\alpha$ -halogénures d'acide, a été appliquée à la synthèse d' $\alpha$ -aminoacides en utilisant un acide carboxylique en présence de dibrome et de tribromophosphine en milieu aqueux pour

<sup>73</sup> Gabriel S., *Berichte*, **1887**, 20, 2224.

<sup>74</sup> (a) Hell C., *Berichte*, **1881**, 14, 891-893.

(b) Volhard J., *Annalen der Chemie*, **1887**, 242, 141-163.

(c) Zelinsky N., *Berichte*, **1887**, 20, 2026.

former l' $\alpha$ -halogénoacide, qui en présence d'ammoniaque donne l' $\alpha$ -aminoacide (schéma 17).

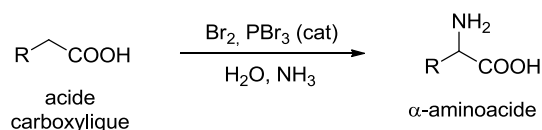


Schéma 17

#### IV-2.b Synthèse asymétrique.

Il existe de très nombreuses méthodes de synthèse asymétrique d' $\alpha$ -aminoacides. Nous en citerons quelques-unes d'application générale à partir de molécules issues du pool chiral et par catalyse asymétrique.

##### IV-2.b.i Utilisation du pool chiral.

Un exemple de synthèse est décrit par Schöllkopf *et al.*<sup>75</sup>. La méthode consiste à utiliser un dérivé dicétopiperazine **106** formé à partir de la valine et la glycine. L'alkylation stéréocontrôlée de ce dérivé suivie d'une hydrolyse acide permet ainsi d'obtenir une large gamme d' $\alpha$ -aminoesters **109** avec formation de valine estérifiée (**108**) (schéma 18).

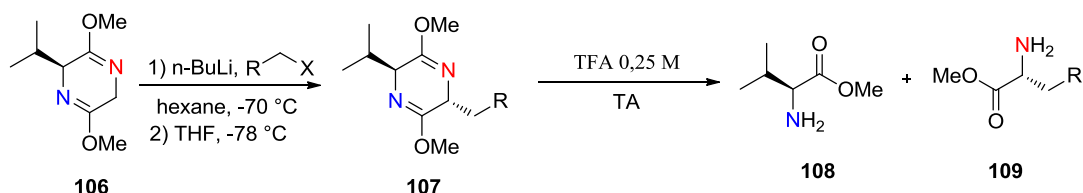


Schéma 18

Une autre méthode est l'amination électrophile asymétrique d'Oppolzer<sup>76</sup>. Cette méthode très efficace permet d'obtenir de nombreux composés chiraux dont des  $\alpha$ -aminoacides et ce, à partir d'un sultame **111** synthétisé à partir du camphre. L'étape clé est l'addition énantiospécifique du camphosultame acylé **112** sur un composé halogéné (schéma 19).

<sup>75</sup> Groth U., Schmeck C., Schöllkopf U., *Liebigs Ann. Chem.*, **1993**, 321-323.

<sup>76</sup> Oppolzer W., Moretti R., Zhou *CHelv. Chim. Acta*, **1994**, 77, 2363-2380.

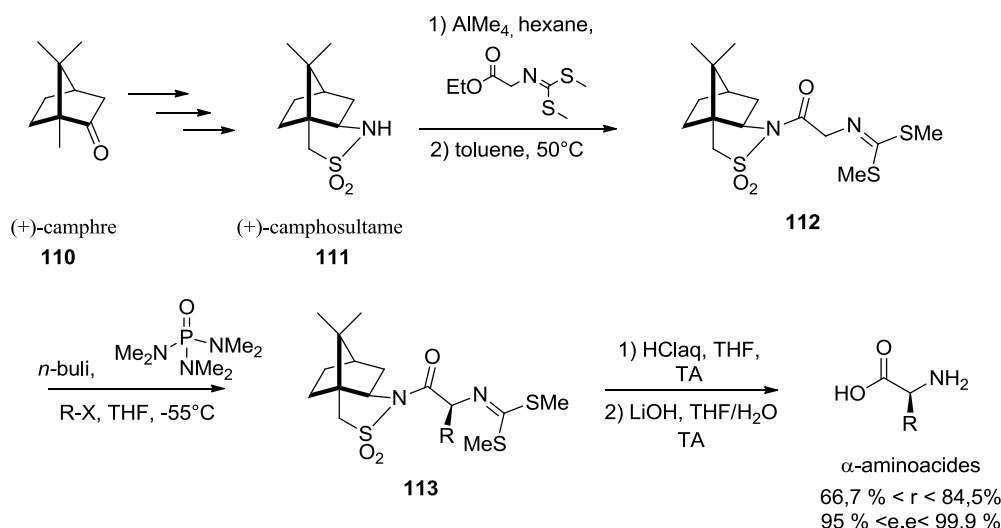


Schéma 19

Un autre exemple d'utilisation du camphre comme copule chirale a été publié récemment par Lu *et al.*<sup>77</sup>. Une oxazolidinone chirale **115** est obtenue par couplage entre le camphre et la glycine, après alkylation diastéréosélective et hydrolyse, les  $\alpha$ -aminoacides sont obtenus avec d'excellents excès énantiomériques (schéma 20). En partant du (-)-camphre, les D- $\alpha$ -aminoacides sont obtenus, en partant du (+)-camphre, on obtient les L- $\alpha$ -aminoacides.

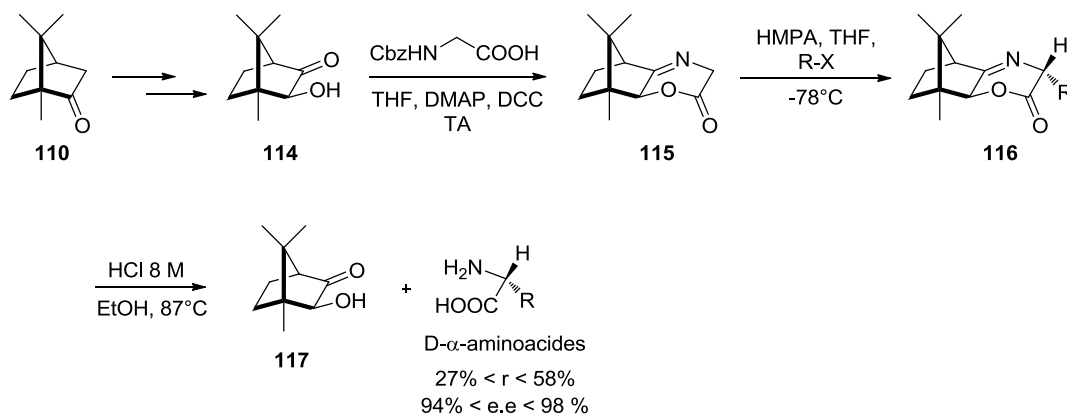


Schéma 20

#### IV-2.b.ii Catalyse asymétrique.

De nombreux catalyseurs asymétriques ont été utilisés et/ou mis au point pour la synthèse énantiosélective d' $\alpha$ -aminoacides naturels et non naturels<sup>78</sup>. Un des exemples les plus

<sup>77</sup> Xu P-F., Chen Y-S., Lin S-I., Lu T-J., *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 2309-2314.

<sup>78</sup> Nájera C., Sansano J.M., *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 4584-4671.

marquants est celui du catalyseur au rhodium décrit par Knowles *et al.*<sup>79</sup>, dérivé de celui utilisé pour la production à grande échelle d'acide acétique. Ce catalyseur chiral a permis l'hydrogénation asymétrique d'alcènes pour la production d' $\alpha$ -aminoacides énantioenrichis. Par exemple, selon ce procédé, la L-DOPA (**120**) est produite avec un rendement de 50 % et 95 % d'e.e. Ce travail a été récompensé par le prix Nobel de chimie en 2001<sup>80</sup> attribué à William S. Knowles, Ryoji Noyori et K. Sharpless (schéma 21).

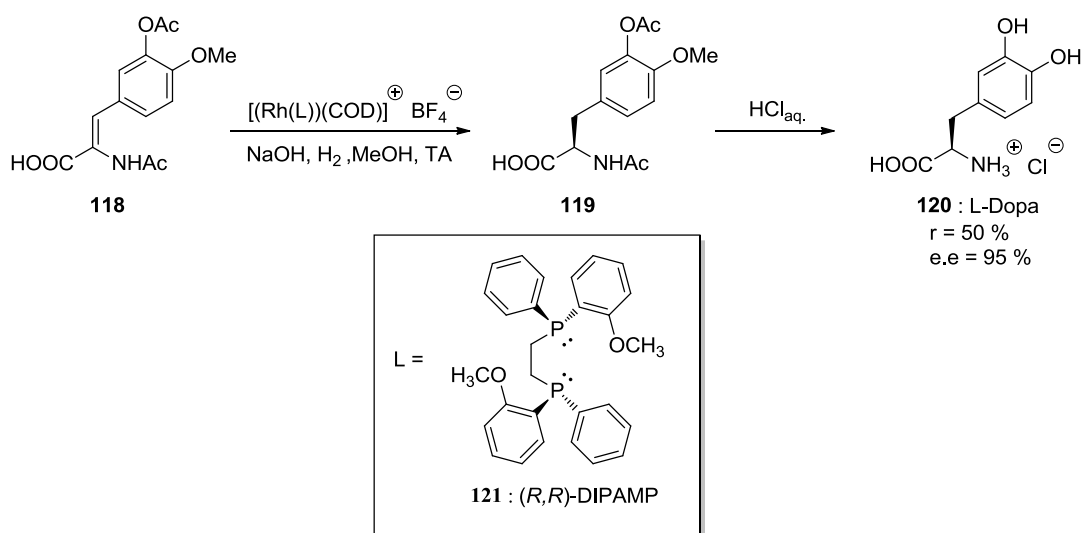


Schéma 21

Nous avons cité précédemment l'intérêt des acides aminés en organocatalyse, par exemple pour la synthèse asymétrique d'acides aminés aromatiques non naturels. La dicétopipérazine Phe-Arg (**125**) catalyse l'addition asymétrique de cyanure sur une imine *N*-alkylée **122** avec des rendements compris entre 80 % et 97 % et des e.e compris entre 10 % et 99%<sup>81</sup> (schéma 22).

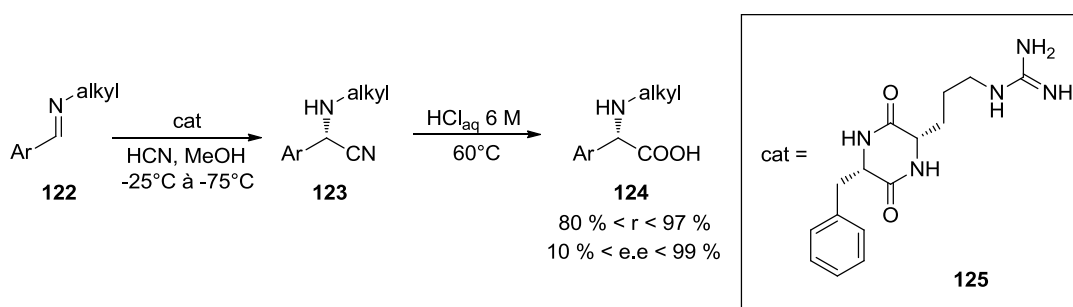


Schéma 22

<sup>79</sup> Vineyard B.D., Knowles W.S., Sabacky M.J., Bachman G.L., Weinkauff D.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 5946-5952.

<sup>80</sup> [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2001/advanced-chemistryprize2001.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2001/advanced-chemistryprize2001.pdf)

<sup>81</sup> Iyer M.S., Gigstad K.M., Namdev N.D., Lipton M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 4910-4911.

#### IV-2.c Synthèse par Dédoublément Cinétique Dynamique (DCD).

Le Dédoublément Cinétique est basé sur la différence de vitesse de réaction de deux énantiomères d'un mélange racémique. On obtient alors un rendement maximal de 50% en produit désiré. Il existe peu de dédoublément cinétique chimique alors que c'est l'une des principales utilisations de la biocatalyse. Comme nous l'avons exposé plus haut (Cf. II), le Dédoublément Cinétique Dynamique (DCD), en couplant une réaction de racémisation à la réaction principale, permet d'obtenir un rendement théorique de 100% (schéma 23).

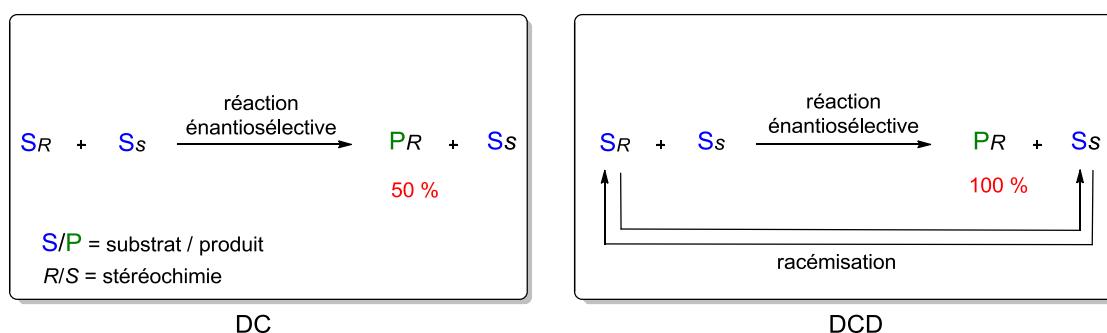


Schéma 23

#### IV-2.c.i Synthèse par DCD chimique.

Il existe peu de méthodes de DCD chimique pour la synthèse générique d' $\alpha$ -aminoacides. Cependant quelques exemples ont été décrits. On peut citer les travaux publiés par l'équipe de Kubo *et al.*<sup>82</sup> adaptés de la synthèse de Gabriel. Ils décrivent l'alkylation stéréosélective de phtalimide, conduisant à l'obtention d'un composé (*S,S*) majoritaire **127** avec des rendements compris entre 51 % et 90 % avec un e.e compris entre 88 % et 97 %. Ce procédé permet ainsi d'obtenir des acides aminés L (schéma 24).

<sup>82</sup> Kubo A., Kubota H., Takahashi M., Nunami K.I., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 4957-4960.

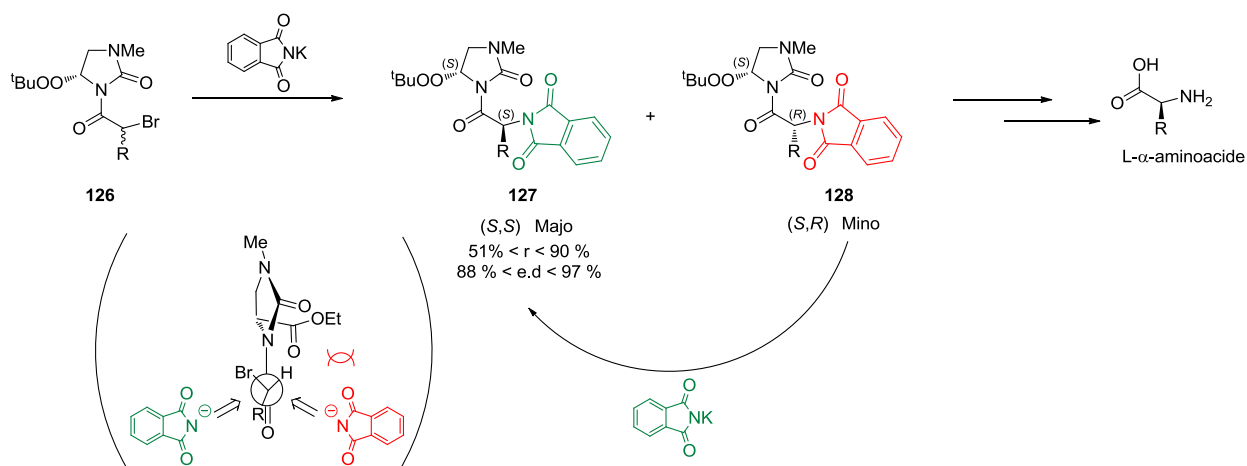


Schéma 24

#### IV-2.c.ii Synthèse par DCD chémoenzymatique.

D'autres exemples de synthèse générique d' $\alpha$ -aminoacides ont été reportés avec un DCD chémoenzymatique.

Celui décrit par Arosio *et al.*<sup>83</sup> a été réalisé à l'aide d'une thioestérase (subtilisine) stéréospécifique, le milieu basique permet la racémisation chémoélective du thioester restant **130**, le H en  $\alpha$  du thioester étant plus acide que le H en  $\alpha$  de l'acide formé (schéma 25).

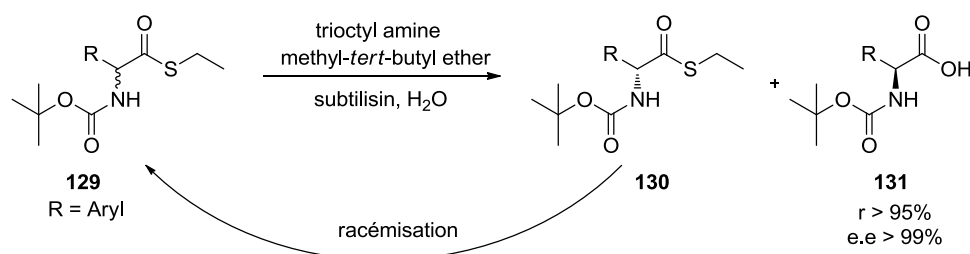


Schéma 25

Des rendements supérieurs à 95 % et des e.e supérieurs à 99 % ont été obtenus.

La méthode chémoenzymatique développée par Schichl *et al.*<sup>84</sup> est basée sur la racémisation par un équilibre entre deux imines **133** et **134** d'un  $\alpha$ -aminoester. Seul le (S)- $\alpha$ -aminoester est hydrolysé en  $\alpha$ -aminoacide **135** par une alcalase, l' $\alpha$ -aminoester (R) restant réagit avec un dérivé du benzaldéhyde pour former une imine « exo » en équilibre

<sup>83</sup> Arosio D., Caligiuri A., D'Arrigo P., Pedrocchi-Fantoni G., Rossi C., Saraceno C., Servi S., Tessaro D., *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, 349, 1345-1348.

<sup>84</sup> Schichl D.A., Enthaler S., Holla W., Riermeier T., Kragl U., Beller M., *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 3506-3512.

avec une imine «endo», selon le principe des racémases à PLP, dans une réaction réversible conduisant ainsi à la racémisation de l'énantiomère restant (schéma 26). Les rendements sont compris entre 87 % et 99 % avec des e.e. compris entre 64 % et 99 %.

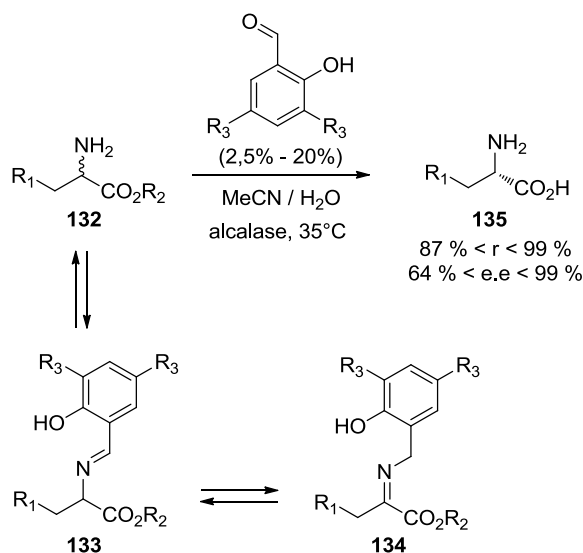


Schéma 26

#### IV-2.c.iii Synthèse par DCD enzymatique.

Plusieurs méthodes ont permis la synthèse d' $\alpha$ -aminoacides par DCD en couplant deux ou trois enzymes. Une première méthode est l'utilisation d'une hydantoïne racémique, obtenue par condensation d'un  $\alpha$ -aminoacide et du cyanate de potassium suivie d'une amidation en milieu acide. Un DCD sur ce type de composés a été réalisé avec une hydantoinase, une hydantoïne racémase et l'utilisation d'une carbamoylase pour l'hydrolyse énantiospécifique de l'urée intermédiairement formée. Selon l'énantiospécificité du couple hydantoinase/carbamoylase il est alors possible de générer des  $\alpha$ -aminoacides L ou D (schéma 27).

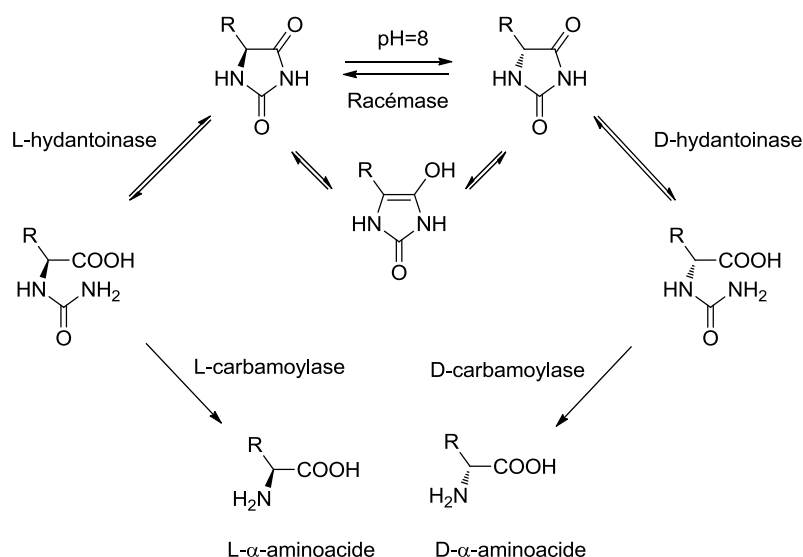


Schéma 27

Olivieri *et al.*<sup>85</sup> ont d'ailleurs montré qu'en travaillant sur organisme entier, un couple D-hydantoinase/D-carbamoylase d'*Agrobacterium radiobacter* avait permis de synthétiser une large gamme d' $\alpha$ -aminoacides D avec des e.e. supérieurs à 99 %. Cet organisme a d'ailleurs été utilisé pour la synthèse de D-para-hydroxy phénylgyline et de D-citrulline à partir de L-ornithine<sup>86,87</sup>. Une autre méthode a été utilisée avec un couple d'enzymes N-acylases/N-acylases racémase, pour la synthèse d' $\alpha$ -aminoacides comme par exemple la L-méthionine produite à l'échelle de la tonne<sup>88</sup> (schéma 28).

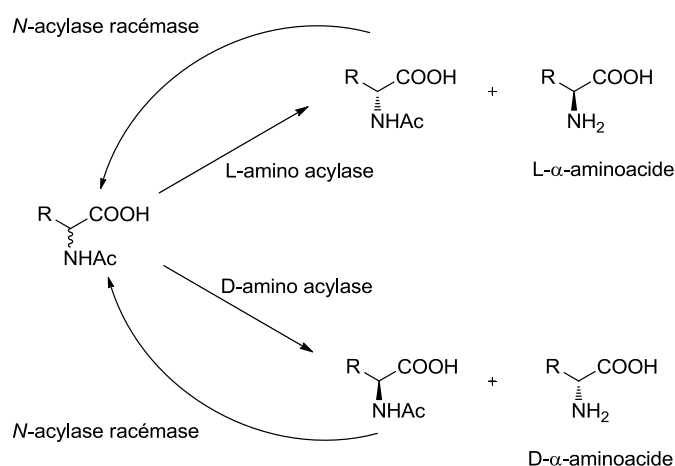


Schéma 28

<sup>85</sup> Olivieri R., Fascetti F., Angelini L., Degen L., *Biotechnol. Bioeng.*, **1981**, 23, 2173-2183.

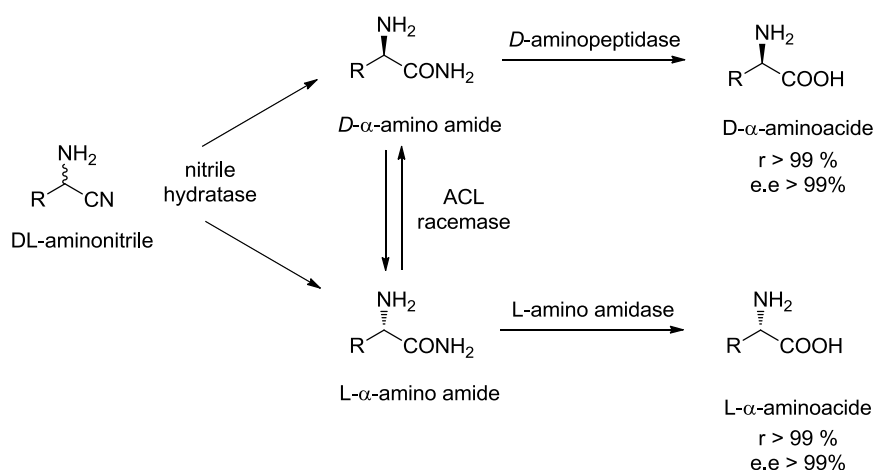
<sup>86</sup> Pietzsch M., Syldatk C., Drauz K., Waldmann H., *Enz. Catal. Org. Synth.*, **2002**, 2, 761.

<sup>87</sup> Ogawa J., Soong C.L., Kishino S., Li Q.S., Horinouchi N., Shimizu S., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2004**, 70, 574-582.

<sup>88</sup> Bommarius A.S., Drauz K., Klenk H., Wandrey C., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1992**, 672, 126-136.



Durant nos travaux, Asano et son équipe<sup>89</sup> ont publié une approche très similaire à la nôtre. Un mélange racémique d' $\alpha$ -aminonitriles est hydrolysé en amide par une nitrile hydratase. Cette réaction n'est pas stéréospécifique et un mélange racémique est obtenu. L'étape d'hydrolyse en  $\alpha$ -aminoacide est, elle, stéréospécifique et conduit, suivant la nature de l'aminopeptidase, à l' $\alpha$ -aminoacide D ou L. Une ACL racémase permet de racémiser l'énantiomère n'ayant pas réagi. Ainsi, l'alanine, la phénylalanine, la valine, la leucine, et la norvaline sont obtenues avec d'excellents rendements (>99%) et d'excellents excès énantiomériques (>99%) (schéma 29).



#### IV-2.d Enrichissement énantiomérique par Dédoublage par Stéréo-Inversion (DSI).

Cette méthode n'est pas une synthèse à proprement parlé, elle consiste à enrichir un mélange racémique  $R_s$  et  $S_s$  en un des deux énantiomères en ne transformant qu'un énantiomère de départ en un intermédiaire prochiral  $I_p$  qui subit une réaction énantiosélective ou non. Ainsi plusieurs cycles permettent d'obtenir un énantiomère préférentiellement pour un rendement théorique de 100 % (schéma 30).

<sup>89</sup> Yasukawa K., Hasemi R., Asano Y., *Adv. Synth. Catal.*, **2011**, 353, 2328-2332.

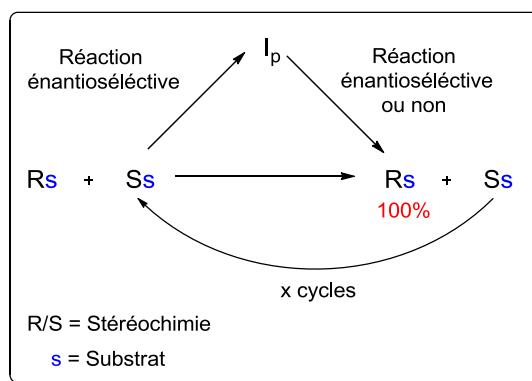


Schéma 30

Quelques exemples de DSI chemoenzymatique et enzymatique ont été décrits pour l'enrichissement énantiomérique d' $\alpha$ -aminoacides.

#### IV-2.d.i DSI chemoenzymatique.

Une des méthodes décrites passe par l'utilisation d'une L-Amino Acide Oxydase (L-AAO) et d'un réducteur non stéréosélectif. Sur plusieurs cycles sont ainsi obtenus des  $\alpha$ -aminoacides naturels ou non, énantioenrichis<sup>90,91</sup>. Les rendements obtenus vont jusqu'à 99 % avec des e.e. supérieurs à 99 % (schéma 31).

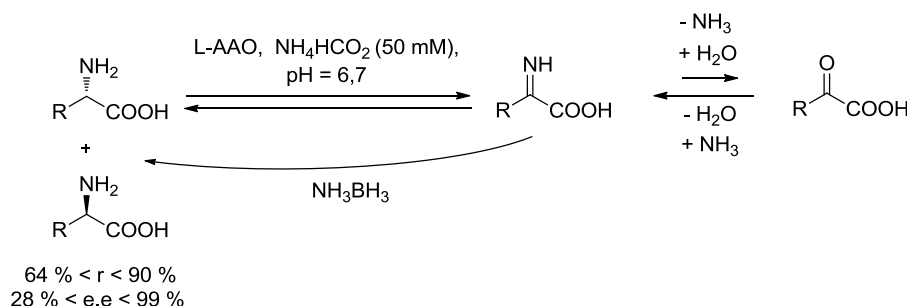


Schéma 31

#### IV-2.d.ii DSI enzymatique.

Un procédé quasi similaire a aussi été décrit par Fotheringham *et al.*<sup>92</sup> et utilisé par Monsanto pour la synthèse de plusieurs  $\alpha$ -aminoacides de la série D. Cette méthode fait intervenir une L-Amino Acide Deaminase (L-AAD) pour l'oxydation d' $\alpha$ -aminoacides racémiques. Une fois oxydé l' $\alpha$ -cétoacide subit une amination réductrice par une

<sup>90</sup> Alexandre F.R., Pantaleone D.P., Taylor P.P., Fotheringham I.G., Ager D.J., Turner N.J., *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 707-710.

<sup>91</sup> Enright A., Alexandre F.R., Roff G., Fotheringham I.G., Dawson M.J., Turner N.J., *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **2003**, 2636-2637.

<sup>92</sup> Fotheringham I.G., Taylor P.P., Ton J.L., *US Patent 5,728,555*, **1998**.

D-Aspartate Amino Transferase (D-Asp AT) générant l'acide aminé D et du 2-oxo succinate (**136**) qui, par décomposition en pyruvate et CO<sub>2</sub>, rend la réaction de déracémisation irréversible (schéma 32).

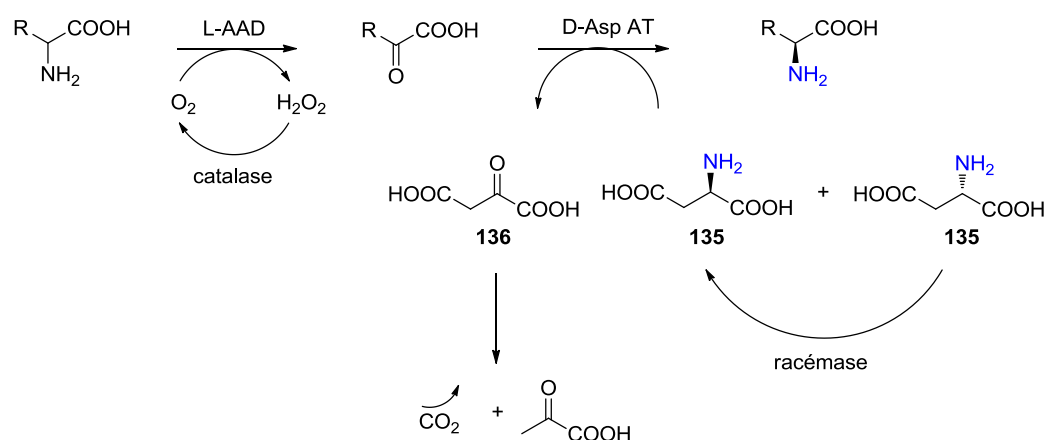


Schéma 32

Il existe donc de nombreuses méthodes d'obtention d' $\alpha$ -aminoacides. Cependant aucun procédé de dédoublement cinétique dynamique enzymatique à partir d' $\alpha$ -aminonitriles racémiques utilisant un couple d'enzymes isolées nitrilase / racémase n'a, à notre connaissance, pas encore été décrit et exploité. De plus, comme exposé au paragraphe III-2, parmi les activités nitrilases expérimentalement caractérisées, peu sont actives sur des  $\alpha$ -aminonitriles.

Mon travail de thèse a donc d'abord porté sur l'identification de nouvelles nitrilases actives sur des  $\alpha$ -aminonitriles (et plus généralement sur une grande diversité de nitriles comme expliqué au paragraphe II) ; un projet de découverte de racémases d' $\alpha$ -aminonitriles était mené en parallèle au laboratoire (LCOB).



# CHAPITRE II

Recherche de nouvelles activités nitrilase : criblage à haut débit et caractérisation fine fonctionnelle

## **CHAPITRE II : Recherche de nouvelles activités nitrilase : criblage à haut débit et caractérisation fine individuelle**

Bien que de nombreuses nitrilases soient déjà utilisées, le besoin en nouveaux biocatalyseurs, acceptant de nouveaux substrats, réalisant des réactions à des pH et températures variés, générant des stéréosélectivités différentes ou tolérant les solvants organiques, est de plus en plus pressant. Aujourd'hui, on distingue trois stratégies pour découvrir de nouvelles activités enzymatiques.

En se rapportant à la revue de Bornscheuer<sup>93a</sup>, La première consiste à explorer les capacités naturelles de bioconversion des microorganismes en culture ou d'extraits cellulaires bruts de microorganismes, de plantes ou de tissus animaux. Dans ce cas, on peut découvrir de nouvelles activités enzymatiques qui réalisent la bioconversion de notre substrat d'intérêt mais ni l'enzyme et ni le gène qui code pour cette enzyme ne sont directement identifiables. Il sera donc difficile d'améliorer l'activité de ces enzymes par les méthodes classiques d'ingénierie protéique (mutagénèse aléatoire ou dirigée, brassage de gènes - DNA shuffling-, ...) ou d'inclure cette étape précise de biocatalyse dans une cascade enzymatique.

On peut également explorer les capacités catalytiques des enzymes dont les gènes ont déjà été séquencés à partir de génomes très divers ou de métagénomes (consortium d'organismes). Dans ce cas, des outils de bio-informatique utilisés classiquement en génomique, principalement des programmes de comparaison de séquences ou de détection de motifs protéiques conservés dans les familles d'enzymes, permettent d'explorer rationnellement et systématiquement les bases de données publiques (ex : UniprotK) et de sélectionner des enzymes candidates au criblage. Une fois identifié une enzyme capable de catalyser l'activité d'intérêt, une approche d'ingénierie des protéines peut être entreprise pour modifier le biocatalyseur et optimiser son activité. La deuxième stratégie s'appuie sur l'avancée des outils de biologie moléculaire et des programmes informatiques développés pour la modélisation des structures tridimensionnelles des protéines et leur maniement (analyse des sites actifs, docking, ...). La mutagénèse aléatoire est souvent utilisée pour essayer d'étendre les capacités enzymatiques d'une enzyme déjà connue. Si la structure

d'une protéine est connue ou modélisable, on peut alors entreprendre des modifications ciblées de la protéine (souvent du site actif) par mutagenèse dirigée.

Enfin, une troisième stratégie encore très peu développée consiste à concevoir *in silico* le site actif idéal capable en théorie de réaliser la réaction d'intérêt. On utilise ensuite comme châssis moléculaire une enzyme connue dont on modifie la structure primaire pour accueillir ce site actif de manière optimale (schéma 34)<sup>93a</sup>. La protéine artificielle conçue *in silico* pourra être obtenue par l'expression d'un gène synthétique.

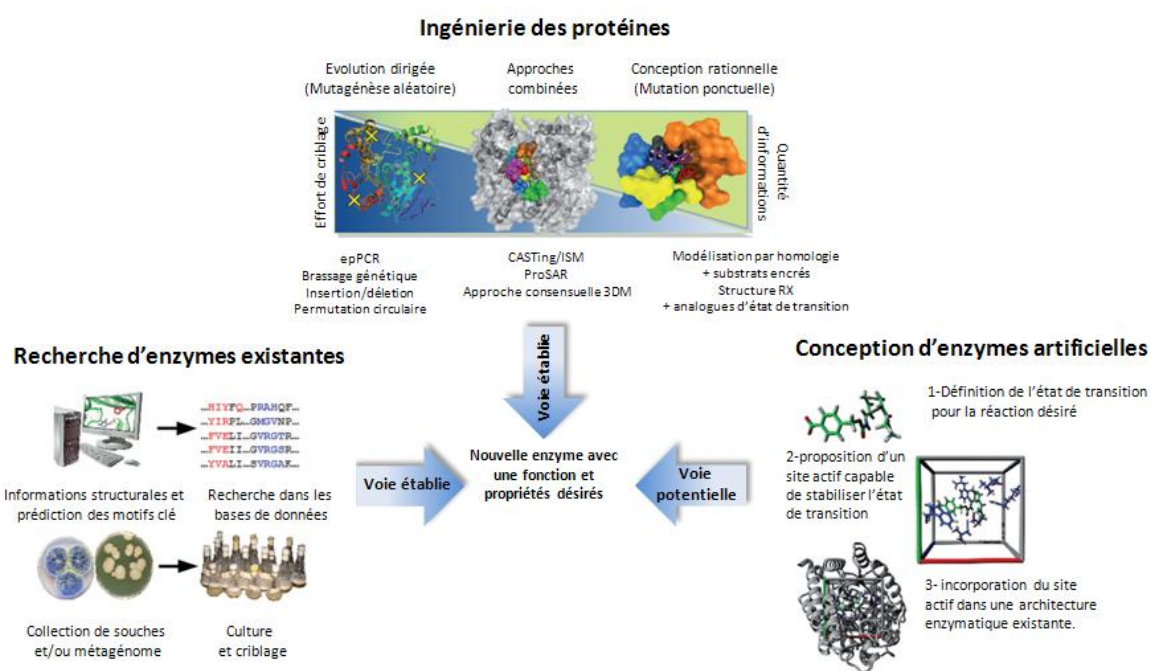


Schéma 34 d'après Bornscheuer<sup>93a</sup>

L'approche développée au Genoscope correspond à la deuxième stratégie : exploration rationnelle et systématique de la biodiversité enzymatique naturelle. Elle s'appuie sur les compétences solides du Genoscope en matière d'analyse des génomes et l'expérience acquise sur le criblage haut débit des enzymes. Ses points forts sont :

- une plateforme de bioinformatique qui permet d'analyser efficacement les bases de données de séquences protéiques disponibles (26 079 529 protéines dans UniprotKB au 31.10.2012) et de réaliser une sélection de protéines représentantes de la biodiversité. Ces analyses principalement basées sur des comparaisons de séquences fournissent un

<sup>93a</sup> Behrens G.A., Hummel A., Padhi S.K., Schätzle S., Bornscheuer U.T., *Adv Synth Catal.*, **2011**, 353, 2191-2215.

sous-ensemble représentatif de la diversité naturelle des protéines permettant ainsi de réduire coûts et temps des recherches.

- une plateforme de clonage et de criblage à haut débit pour la recherche d'activités enzymatiques, gérée par le Laboratoire de Clonage et de Criblage des Activités de Bioconversion (LCAB).

- des ressources biologiques pour la recherche et l'amplification des gènes par PCR en vue du clonage : le LCAB dispose d'une collection (« souchothèque ») d'environ 700 souches d'organismes procaryotes et d'un métagénome provenant de la station d'épuration d'Evry (projet « Cloaca Maxima ») séquencé au Genoscope.

## **I- Sélection et obtention des nitrilases candidates.**

### ***I-1 Approche génomique.***

La sélection des nitrilases candidates a été réalisée par le LCAB en utilisant un set de référence de 34 enzymes possédant une activité nitrilase expérimentalement prouvée et liée à une publication. Les séquences de référence ont été utilisées par le programme de comparaison de séquences BLAST sur l'ensemble des séquences répertoriées dans la base UniprotKB. Cette analyse est uniquement basée sur les homologies de séquences qui existent entre les nitrilases connues et les protéines ainsi rapatriées d'UniProtKB et ne tiennent donc pas compte de l'annotation des gènes afin de s'affranchir des ambiguïtés ou inexactitudes dues aux processus automatiques d'annotation des génomes. Les séquences présentant un seuil d'identité supérieur à 30% sur 80% de la longueur avec une séquence du set de référence ont donc été identifiées et rapatriées. Afin de réduire le nombre de candidats à tester, on constitue des groupes (ou clusters) de protéines que l'on postule comme « iso-fonctionnelles » au sein de chaque groupe. L'étape suivante consiste à choisir pour le criblage une enzyme représentante par groupe. Le critère de regroupement au sein d'un même cluster est un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 80 %. Les séquences trop divergentes qui n'entrent dans aucun groupe se retrouvent en « singleton » et seront proposées à la sélection pour le criblage systématiquement. Finalement, en tenant compte de la disponibilité des souches dans la souchothèque du Genoscope (une trentaine de souches commerciales ont été achetées pour le projet), 284 enzymes candidates ont été



choisies (schéma 35) afin d'amplifier les gènes codant pour les enzymes sélectionnées ci-dessus.

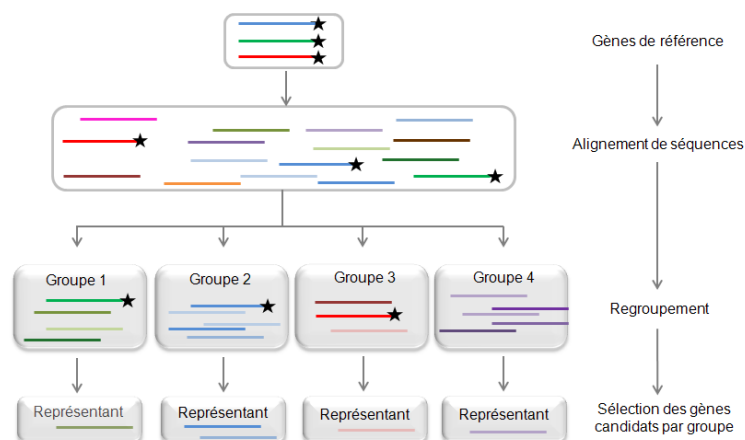


Schéma 35

### ***I-2 Production des nitrilases candidates.***

La production des nitrilases candidates a été réalisée par le LCAB selon le procédé décrit très brièvement ci-après. L'amplification par PCR des gènes candidats à partir des souches bactériennes correspondantes est réalisée dans des plaques 96 puits. Le clonage est ensuite réalisé dans le plasmide d'expression de protéines selon la méthode de Ligation Independent Cloning développé par Aslanadis et deJong<sup>94</sup> et adapté au LCAB au format 96 puits. Les plasmides contenant les gènes d'intérêt ont ensuite été introduits par transformation dans la bactérie hôte *E.coli* BL21 (Cf. matériels et méthodes). Après induction de l'expression des gènes par l'IPTG et synthèse des protéines, les bactéries ont été lysées et les lysats cellulaires conservés dans des plaques 96 puits à -80 °C (schéma 36). Pour 284 enzymes candidates (trois plaques 96 puits), 163 nitrilases ont pu être produites de manière satisfaisante et réorganisées dans deux plaques 96 puits (NIT-4 et NIT-5). Le taux d'échec de 43 %, s'explique principalement par de mauvais rendement d'amplification par PCR ou par de nombreux gènes très riches en GC (%GC > 70%) dont l'amplification est généralement difficile.

<sup>93b</sup> Aslanidis C., de Jong P.J., *Nucleic Acids Res.*, **1990**, 20, 6069-6074.

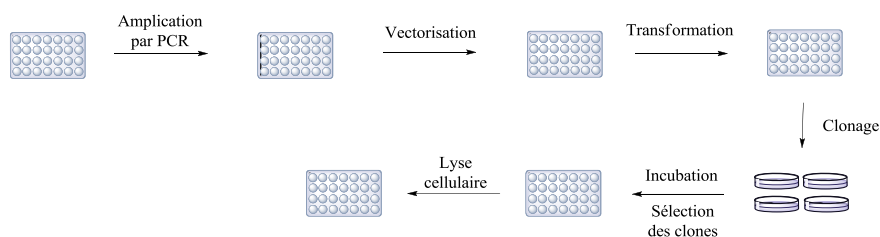


Schéma 36

## II- Sélection et synthèse des substrats.

### II-1 Sélection des substrats.

Bien que l'objectif principal de la thèse soit la recherche de nouvelles nitrilases actives sur des  $\alpha$ -aminonitriles, nous avons élargi le criblage à d'autres substrats afin d'explorer au mieux les enzymes candidates sélectionnées. Le criblage des  $\alpha$ -aminonitriles sera exposé dans le chapitre III.

Ainsi, pour explorer l'activité nitrilase des enzymes candidates nous avons défini un panel de substrats représentatifs de la diversité structurale des dérivés nitrilés. Nous avons choisi des nitriles saturés de longueur de chaîne variée, des nitriles insaturés **29**, **137**, **75**, **138**, **139**, aryles **140**, **141**, **142** et alcènes **143**, **45**, **74**, des nitriles  $\beta$ -substitués par un groupe aryle **40**, **22**, **144**, **145**, **41**, des  $\alpha$ - et  $\beta$ -hydroxynitriles **62**, **20**, **146**, **147**, **148**, **149**, et enfin des  $\beta$ -aminonitriles **150**, **151**, **152** (figure11).

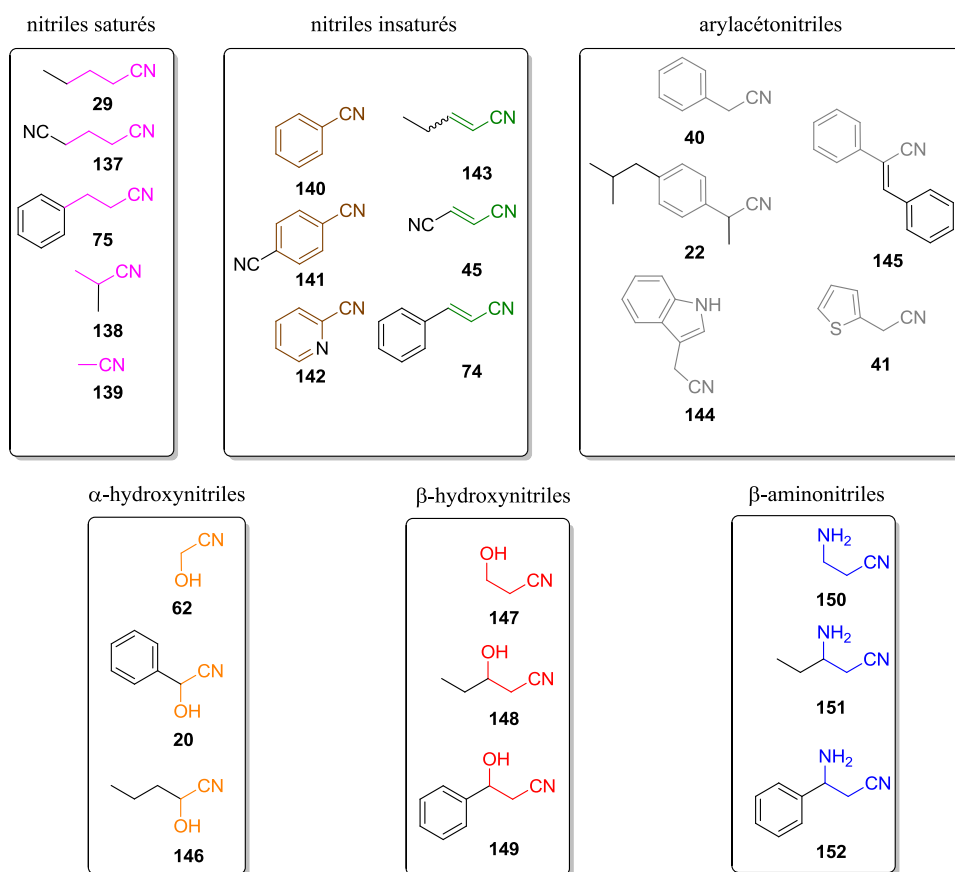


Figure 11

Pour ce criblage, nous avons choisi un représentant alkyle et aryle avec un squelette carboné de base commun aux différentes familles de nitrile pour évaluer l'influence des substituants. Une liste de nitriles extraits de la base de données Kegg a été établie en prenant en compte leur disponibilité dans le commerce ou la facilité de leur synthèse, l'(indol-3-yl)acétonitrile (**144**), le 2-thienylacétonitrile (**41**) et le picolinonitrile (**142**) ont été sélectionnés d'autant plus que ces nitriles apparaissent dans des voies de biosynthèse. Le mandélonitrile (**20**) et le 2-(4-isobutylphényl)propanenitrile (**22**) ont été ajoutés à la liste car ce sont des précurseurs de molécules d'intérêt (Cf. I-2.c). Cette sélection de substrats, basée sur une exploration restreinte de la diversité structurale, permettra d'évaluer la sélectivité des nitrilases candidates et leur promiscuité. À partir des résultats positifs, elle permettra également, pour un substrat donné, de sélectionner la nitrilase la plus efficace parmi la bibliothèque créée, et de la tester sur des composés présentant des variations structurales.

## II-2 Synthèse des substrats.

Les substrats choisis étaient en majorité disponibles commercialement, un certain nombre d'entre eux ont été synthétisés en suivant un protocole existant (**146**<sup>94</sup>, **149**<sup>95</sup>, **168**<sup>96</sup>) ou en mettant au point une synthèse (**148**, **151**, **152**).

### II-2.a Synthèse du 3-hydroxypentanenitrile (**148**).

Deux méthodes principales sont utilisées pour la synthèse de  $\beta$ -hydroxynitriles. La première est une réaction de substitution nucléophile par l'ion cyanure sur un  $\beta$ -halogénoalcool, la deuxième est l'ouverture régiosélective d'un époxyde (schéma 37).

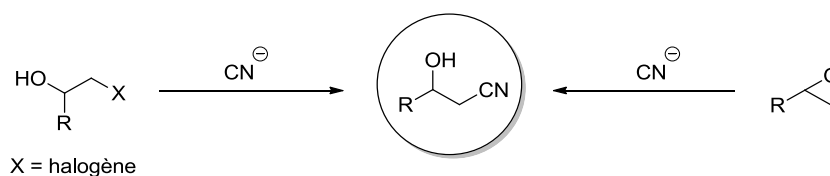


Schéma 37

La deuxième méthode a été retenue pour la synthèse du composé **148** pour des facilités de protocole expérimental. En adaptant le mode opératoire décrit par Chini *et al.* le  $\beta$ -hydroxynitrile<sup>97</sup> **148** a été obtenu avec un rendement de 60% par ouverture du 2-éthylloxirane par l'ion cyanure. Ce rendement moyen peut s'expliquer par une purification délicate (schéma 38).

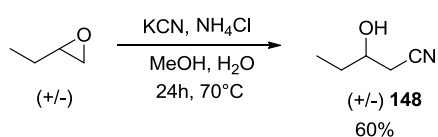


Schéma 38

<sup>94</sup> Chandia N.P., Canales J.C., Azocar I., Vanlaer S., Pawar V.G., De Borggraeve W.M., Costamagna J., Dehaen W., *Synth. Comm.*, **2009**, 39, 9024-9025.

<sup>95</sup> Kamila S., Zhu D., Biehl E.R., Hua L., *Org. Lett.*, **2006**, 8, 4429-4431.

<sup>96</sup> DeSantis G., Zhu Z., Greenberg W.A., Wong K., Chaplin J., Hanson S.R., Farwell B., Nicholson L.W., Rand C.L., Weiner D.P., Robertson D.E., Burk M.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 9024-9025.

<sup>97</sup> Chini M., Crotti P., Favero L., Macchia F., *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 4775-4778.

## II-2.b Synthèse des $\beta$ -aminonitriles.

Les  $\beta$ -aminonitriles peuvent être obtenus par différentes méthodes de synthèse. Les plus communes sont l'addition de Michaël d'ammoniaque sur un dérivé de type acrylonitrile, l'ouverture d'aziridine par l'ion cyanure et la substitution nucléophile d'ion cyanure sur un mésylate (schéma 39).

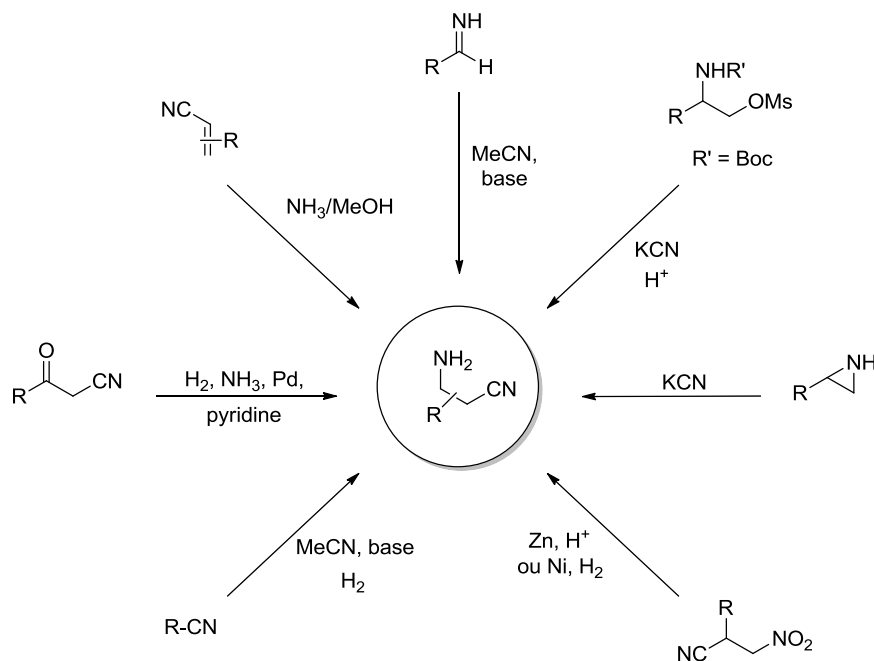


Schéma 39

### II-2.a.i Synthèse du 3-aminopentanenitrile (**151**).

La synthèse du 3-aminopentanenitrile (**151**) a été réalisée en trois étapes (schéma 40) à partir du DL-*N*-Boc-2-amino-1-butanol (**153**). Après mésylation de la fonction alcool, le composé **155** a été obtenu par réaction de substitution nucléophile avec le cyanure de potassium avec un rendement de 59% pour les deux étapes. La fonction amine a ensuite été déprotégée en milieu acide pour donner le composé **151** sous forme de sel d'acide trifluoroacétique et du composé **156** *N*-terbutylé obtenu en proportion 50/50.

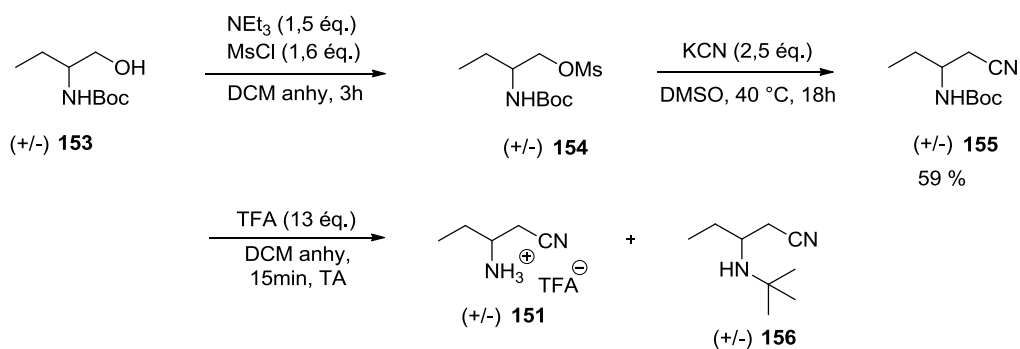


Schéma 40

La formation du composé **156** s'explique par la réaction entre l'amine libre et le cation *t*-butyle formé lors de la coupure du groupe *t*-butyloxycarbonyl en milieu acide (schéma 41).

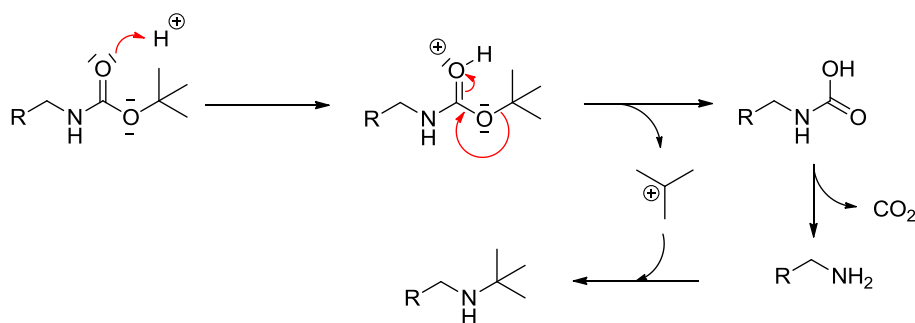


Schéma 41

Pour éviter la formation de ce produit, un réducteur, l'hydruure de triéthylsilane, a été ajouté au milieu réactionnel (schéma 42).

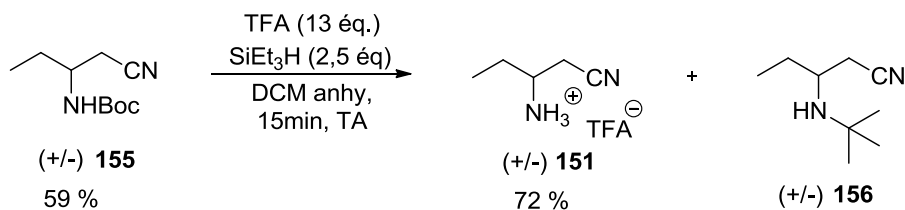


Schéma 42

Cet ajout (2,5 éq.) a permis d'abaisser le ratio du mélange **151/156** de 50/50 à 98/2.

### II-2.a.ii Synthèse du 3-amino-3-phénylpropanenitrile (**152**).

La synthèse du  $\beta$ -aminonitrile **152** a été réalisée en quatre étapes (schéma 42) à partir du 2-phénylglycinol racémique (**157**). Après protection de la fonction amine par un groupement *t*-butyloxycarbonyle et méthylation de la fonction alcool, le composé **160** a été obtenu par réaction de substitution nucléophile avec le cyanure de potassium avec un rendement de 34% pour les trois étapes. La fonction amine a ensuite été déprotégée en milieu acide pour donner le composé **152** sous forme de sel d'acide trifluoroacétique et la présence d'un sous-produit **161** *N*-terbutylé (schéma 43) avec un ratio **152/161** de 84/16.

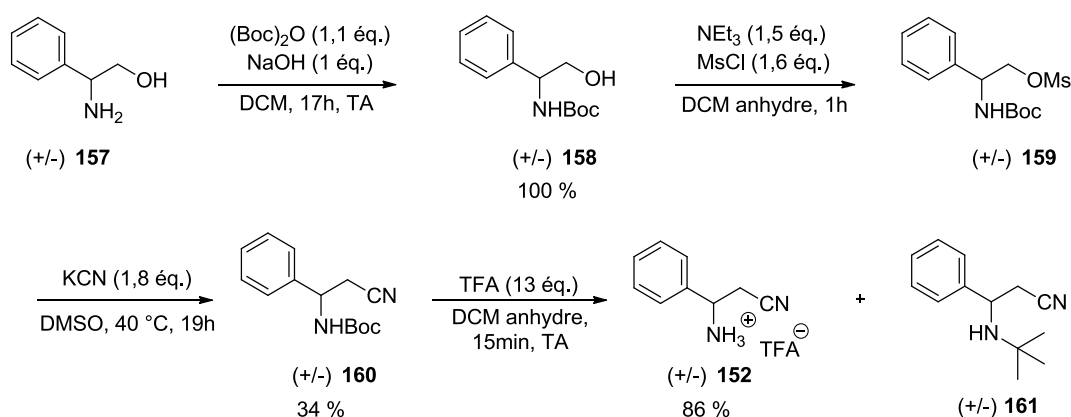


Schéma 43

Pour éviter la formation du produit **161**, de l'hydruure de triéthylsilyle a été rajouté (jusqu'à 10 éq.) mais le ratio **152/161** est resté inchangé. Nous avons donc décidé que ce substrat serait testé tel quel lors du criblage.

## III- Détection de l'activité nitrilase.

### III-1 Les méthodes utilisées.

Le choix d'un test de détection lors de l'étude d'une activité enzymatique est crucial surtout lorsqu'on envisage un criblage à haut débit. Le test d'activité doit analyser la chimie de la transformation enzymatique et la traduire en un signal détectable, tel qu'un signal lumineux, un changement de couleur de l'échantillon ou par sélection biologique. Un test enzymatique doit être fiable pour qualifier et/ou quantifier l'avancement d'une réaction, étudier si possible les stéréo- et régiosélectivités de l'enzyme ainsi que ses caractéristiques cinétiques et d'affinité ( $K_m$ ,  $k_{cat}$ ,  $V_{max}$ ...). Les techniques GC-MS, HPLC et RMN ont souvent été utilisées pour un suivi analytique de réactions catalysées

par une nitrilase par détection de l'acide carboxylique formé. Dans certains cas, il est possible d'évaluer la stéréospécificité de la réaction par mesure d'un excès énantiomérique, par utilisation de colonnes d'HPLC chirales<sup>62</sup>. Une autre façon de mesurer l'activité des nitrilases est de doser l'ammoniaque libérée lors de la réaction. Cette approche présente l'avantage d'être basée sur la détection d'un élément commun à toutes les réactions catalysées par les nitrilases et s'affranchit donc de la nature de l'acide carboxylique formé.

### III-1.a Dosage chimique d'ammoniaque.

L'ammoniaque peut être dosée par spectrophotométrie, notamment par la méthode de Berthelot au bleu d'indophénol, utilisée par Kobayashi *et al* en 1990<sup>23</sup> et par Kim *et al.* en 2009<sup>35</sup>. En présence de phénol **162**, d'hypochlorite de sodium et d'ammoniaque, il se forme une imine **163** de couleur bleu voire bleu violacé foncé, facilement détectable par spectrophotométrie à 630 nm avec une sensibilité allant jusqu'à 10 µM. (schéma 44).

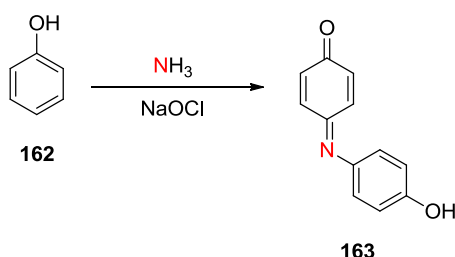


Schéma 44

La méthode de Nessler utilisée par Matamá et al. en 2007<sup>98</sup> consiste, à partir d'un complexe de iodomercurate en milieu basique, à générer un nouveau complexe de mercure soluble détectable par spectrophotométrie entre 410 et 425 nm et ce, avec un seuil de sensibilité de 29 µM (schéma 45). L'inconvénient de cette méthode est l'utilisation de mercure hautement toxique.

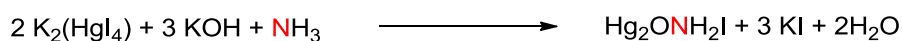


Schéma 45

Une autre méthode par fluorimétrie a été utilisée par Tao *et coll.*<sup>42</sup> Cette méthode pouvant être sensible jusqu'à des concentrations du nanomolaire, est basée sur la détection d'un fluorophore, ici un isoindole sulfoalkylé **165**, formé par réaction entre l'ammoniaque, le

<sup>98</sup> Matamá T., Carneiro F., Caparrós C., Gübitz G. M., Paulo A.C., *Biotechnol. J.*, **2007**, 2, 353-360.



phthalaldéhyde et un thiol (schéma 46). Ce dernier est par ailleurs souvent utilisé sous forme chirale pour des études en HPLC achirale<sup>99</sup>.

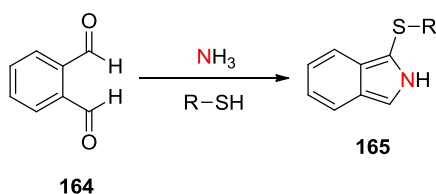


Schéma 46

### III-1.b Dosage chimique d'acide carboxylique.

La détection directe de l'acide carboxylique a été réalisée par Banerjee *et al.*<sup>100</sup> à l'aide d'un test spectrophotométrique avec le bleu de bromothymol jouant le rôle d'indicateur coloré (schéma 47). Nous l'avons testé, mais nous n'avons pas pu l'utiliser car l'excès d'acide en présence des nitriles salifiés perturbait le test.

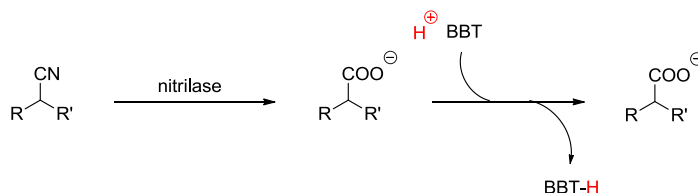


Schéma 47

Les méthodes de Berthelot ou celle basée sur la fluorimétrie auraient pu être utilisées pour notre criblage car elles sont sensibles (10  $\mu$ M et du nM respectivement) et peu compliquées à mettre en oeuvre. Cependant, le Laboratoire de Génomique et de Biochimie du Métabolisme (LGBM) avec qui nous collaborons au quotidien disposait d'un test enzymatique couplé très sensible (0,3 mM) et robuste pour la détection d'ammoniaque, utilisé pour la détection d'activités d'ammonia-lyase et le dosage de l' $\alpha$ -cétoglutarate. Nous l'avons donc mis au point pour le suivi de la réaction nitrilase en plaque 96 puits. La nitrilase d'*Arabidopsis Thaliana* commerciale ainsi qu'une nitrilase du métagénome de *Cloaca maxima* ont été utilisées pour mettre au point le test.

<sup>99</sup> Ilisz I., Berkecz R., Péter A., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2008**, 47, 1-15.

<sup>100</sup> Banerjee A., Kaul P., Sharma R., Banerjee U.C., *J. Biomol. Screen.*, **2003**, 8, 559-565.

### III-1.c Dosage enzymatique d'ammoniaque.

La Glutamate Deshydrogénase (GDH) est une enzyme NADH dépendante catalysant l'amination réductrice de l' $\alpha$ -cétoglutarate (**166**) en glutamate (**167**). La réaction est suivie en mesurant la disparition du NADH au cours du temps à la longueur d'onde  $\lambda = 340$  nm. La disparition du NADH reflète la consommation d'ammoniaque, elle permet donc de mesurer l'activité de la nitrilase (schéma 48).

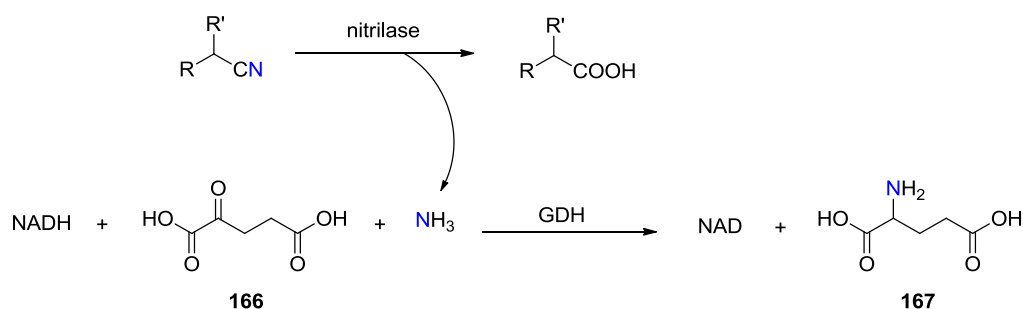


Schéma 48

Cependant il a été impossible de doser toute l'ammoniaque libérée car le fort coefficient d'extinction molaire du NADH ( $\epsilon = 6220 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) ne permettait pas de mesurer sa concentration au-delà de 0,5 mM pour des raisons de saturation du spectrophotomètre. La concentration de NADH a donc été abaissée à 0,3 mM pour être dans une gamme de densité optique (D.O) convenable (inférieure à 2).

### III-2 Criblage à haut débit.

#### III-2.a Procédure.

Les nitrilases candidates ont été réparties sur deux plaques 96 puits (NIT-4 et NIT-5) et seront nommées en fonction de leur position sur la plaque (ex : NIT-4-A01, NIT-4-A02...), la liste des organismes d'où proviennent les enzymes candidates est donnée en annexe 1.

Le criblage des 163 nitrilases a été réalisé en collaboration avec le LCAB sur les 25 substrats choisis précédemment. Chaque substrat a été testé séparément ce qui, à deux plaques par substrat, en incluant les blancs, a conduit à un total de 50 plaques. La réaction a été réalisée sur un volume total de 50  $\mu\text{L}$  dans un tampon phosphate pH=7,3 100 mM, en présence du substrat (10 mM) et de dithiothreitol (1 mM) pour s'assurer que la cystéine du

site actif soit sous forme réduite. La réaction a été déclenchée par addition des lysats (0,05 mg/mL – 0,1 mg/mL) (Cf. partie expérimentale). Après 4 h d'incubation à 30 °C, la réaction a été stoppée par addition de 1 µL d'acide trifluoroacétique pur. Pour le test d'activité enzymatique couplé, le pH a été ajusté à 8,1 par addition de 2,5 µL d'une solution aqueuse de carbonate de potassium (5 M), pH optimum pour la GDH. Après ajout de la GDH (0,015 mg/mL), la réaction a été déclenchée par addition d'une solution tampon phosphate pH=8,1 (100mM), du NADH (300 µM), de l' $\alpha$ -cétoglutarate (10 mM), et de l'ADP (100 µM) afin d'induire une meilleure activation de l'enzyme. La réaction a été suivie au spectrophotomètre à  $\lambda = 340$  nm (schéma 49).

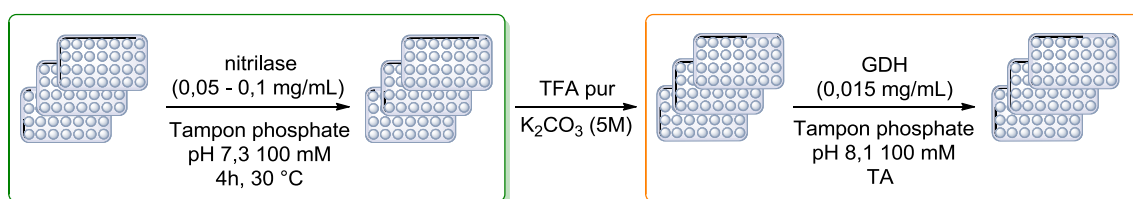


Schéma 49

Ce test enzymatique est semi quantitatif. La concentration de nitrile était de 10 mM pour une concentration maximale d'ammoniaque attendue de 10 mM. L'activité de la GDH peut être mesurée de deux manières. Soit par lecture de la D.O à un temps précis (point final), soit en mesurant la pente reflétant la diminution de la D.O sur un intervalle de temps précis. La première méthode utilisée seule ne permet pas de visualiser en continu le signal et donc de se rendre compte de problèmes expérimentaux à l'origine de perturbations, comme des bulles par exemple. Nous avons jugé cette méthode trop risquée pour un criblage. La deuxième méthode présente l'avantage de mieux refléter la quantité d'ammoniaque présente, une forte pente renvoyant à une réponse forte, une plus faible à une réponse positive c'est à dire à un substrat moins affiné. Ainsi de faibles et moyennes réponses peuvent être hiérarchisées mais les fortes se retrouvent sous estimées (figure 12a). Une visualisation de l'ensemble des chromatogrammes a donc été réalisée en parallèle afin de distinguer les fortes réponses positives qui se caractérisent par une D.O initiale plus basse (reflétant une consommation de NADH avant le début de la lecture de la D.O par conséquent une réaction enzymatique qui a déjà bien débuté). Cette visualisation permet aussi de pointer les problèmes expérimentaux (bulles) qui peuvent avoir lieu en début ou au cours de la lecture et induisent une rupture de pente (figure 12b). La durée de la cinétique, à concentration de GDH fixe, a été choisie en fonction des pentes observées qui présentaient un domaine de linéarité. Une cinétique sur 500 secondes nous permettait de

discriminer les fortes, moyennes et faibles pentes. Les très fortes pentes qui présentait une D.O finale quasi nulle avant 500 secondes de cinétique ont été calculées sur une cinétique de 100 secondes.

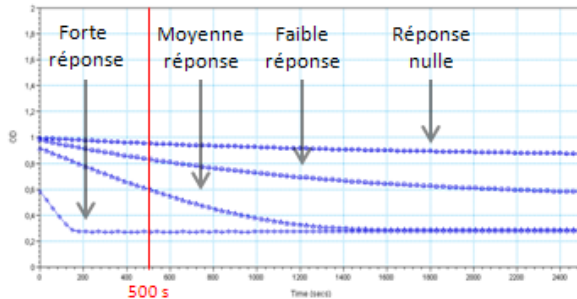


Figure 12a

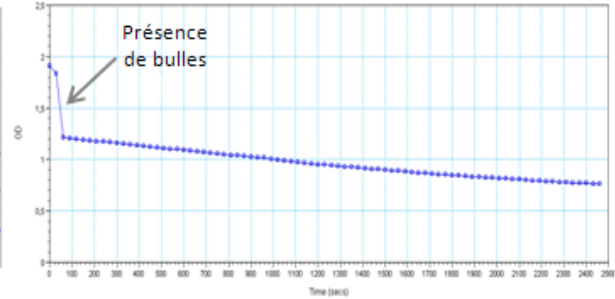


Figure 12b

Les pentes obtenues à l'issue du criblage ont été calculées puis soustraites à une pente d'un blanc sans substrat pour donner une variation de D.O corrigée. Cette variation a ensuite été divisée par la concentration totale de protéines dosées par un test de Bradford. Cette opération avait pour but d'homogénéiser les résultats puisque les lysats n'ont pas les mêmes concentrations d'enzymes. Une fois les valeurs d'activité calculées sur l'ensemble des pentes (0 à 3000), une valeur arbitraire maximale de 4000 a été attribuée aux fortes pentes.

### **III-2.b Résultats du criblage.**

Pour chaque couple enzyme / substrat on dispose donc d'une variation de pente corrigée. Le bruit de fond généré par l'ensemble des tests a été éliminé afin de ne retenir que les enzymes réellement actives sur les substrats. Pour cela, des seuils ont été choisis pour chaque substrat (Cf. annexe 2). Les résultats corrigés par substrat, en fonction des enzymes candidates, sont représentés dans la figure 13. Pour chaque lysat cellulaire testé en abscisse est représentée l'activité obtenue pour chaque substrat testé (unité arbitraire). Ce graphique en trois dimensions permet d'avoir une vue d'ensemble des activités nitrilases candidates sur les nitriles choisis (une couleur par nitrile). Cela nous a permis de visualiser leurs activités relatives vis-à-vis des nitriles testés avec une notion d'activité faible, moyenne et forte. Cette notion doit être fortement nuancée puisque la concentration en nitrilases dans les lysats cellulaires est fonction de leur surexpression.

Des constatations préliminaires peuvent être faites :

- Le nombre de réponses positives est très important, ce qui indiquerait que les protéines candidates ont bien une activité nitrilase.
- Certains substrats répondent très fortement sur peu de lysats (nitrile **75** en rose), d'autres faiblement mais sur beaucoup de protéines candidates, (nitrile **138** en violet) (figures 13 et 14).

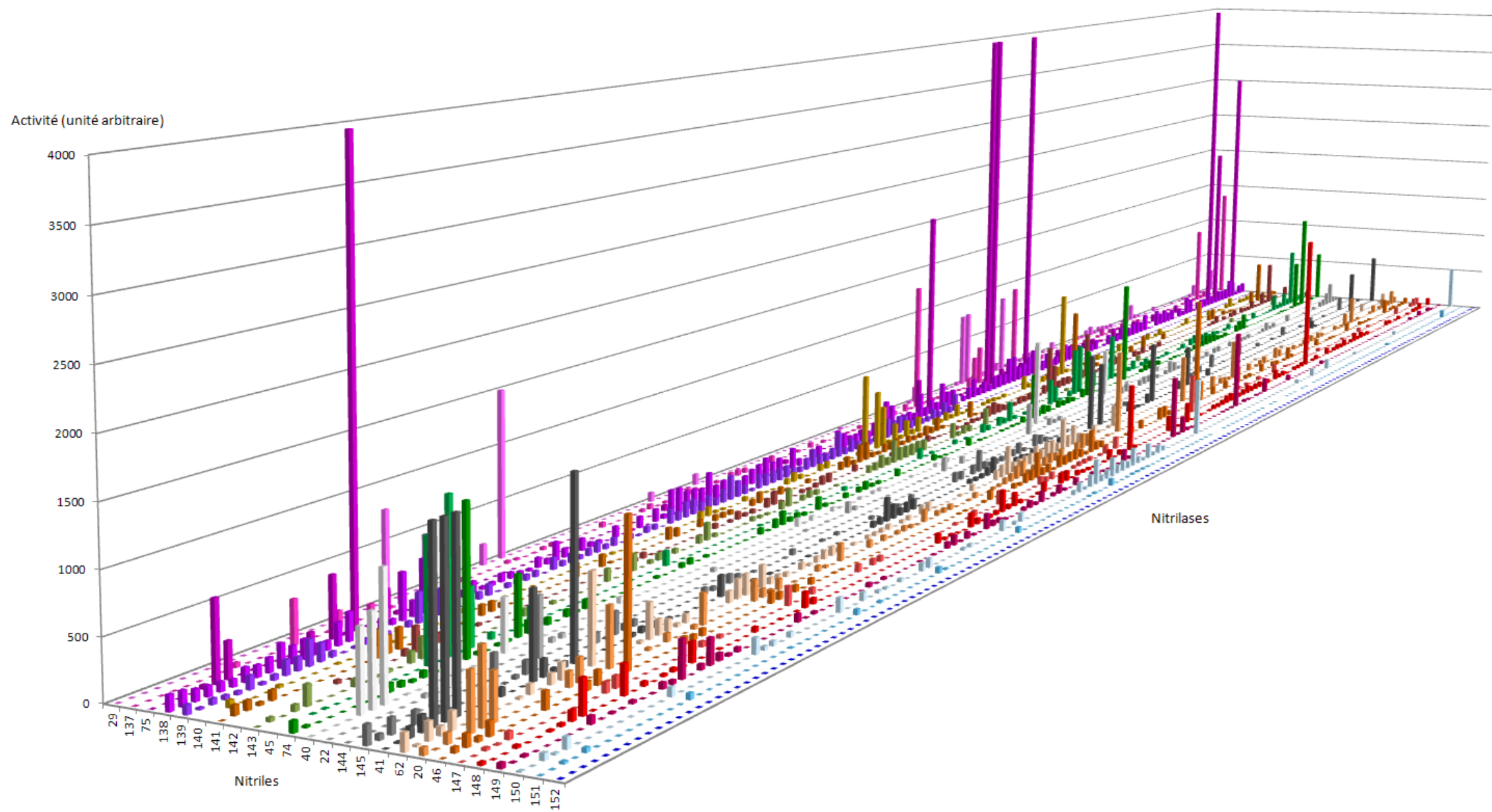


Figure 13

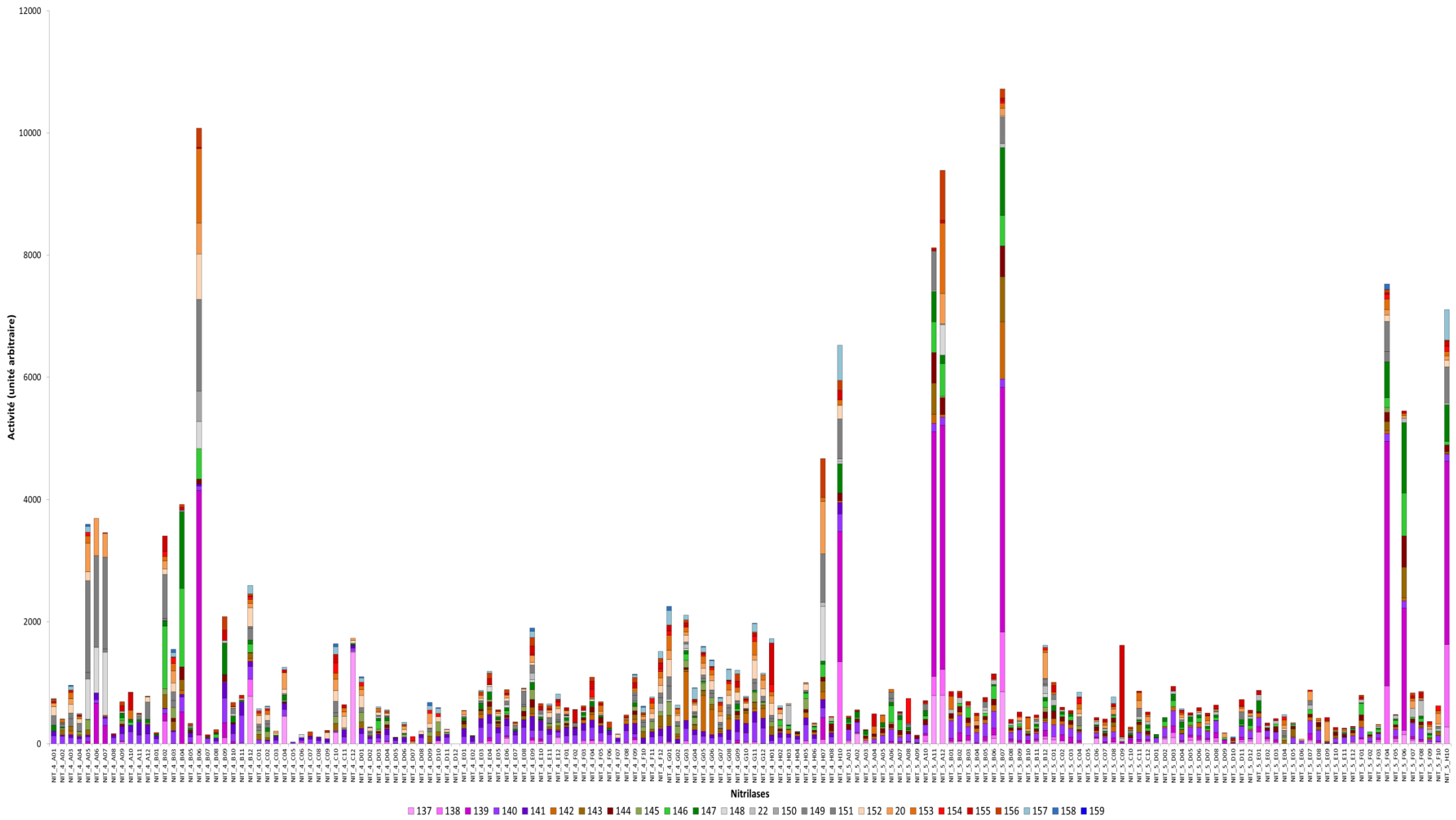


Figure 14

Le graphique présenté en figure 14 exprime les activités en ordonnée et des lysats cellulaires en abscisse sur l'ensemble des nitriles testés. Chaque nitrile est représenté par une couleur, la hauteur de chaque barre est proportionnelle à l'activité d'un même pour différents substrats lysat cellulaire.

Il est alors possible de comparer les différentes activités pour un même lysat cellulaire mais la comparaison des activités entre lysats cellulaires sur un même nitrile est impossible à cause de la différence d'expression des lysats cellulaires. Néanmoins, cet histogramme nous donne accès à plusieurs informations importantes :

- tous les lysats sauf deux (NIT-5-C05, NIT-4-D12) ont donné une réponse même faible, ou plusieurs.
- la grande majorité des lysats ont une activité sur des nitriles de structures variées, ils sont dits promiscuitaires. Seules deux protéines candidates semblent être très sélectives (NIT-4-C12 et NIT-5-C09)

Ce graphique permet de visualiser l'activité des protéines candidates sur les substrats testés mais ne nous donne pas d'information facilement lisible en fonction du substrat. Nous avons donc également représenté les activités en fonction des substrats. Ainsi d'un seul coup d'œil il nous est possible de visualiser quelles sont les protéines candidates actives sur un substrat donné (tableau 5).



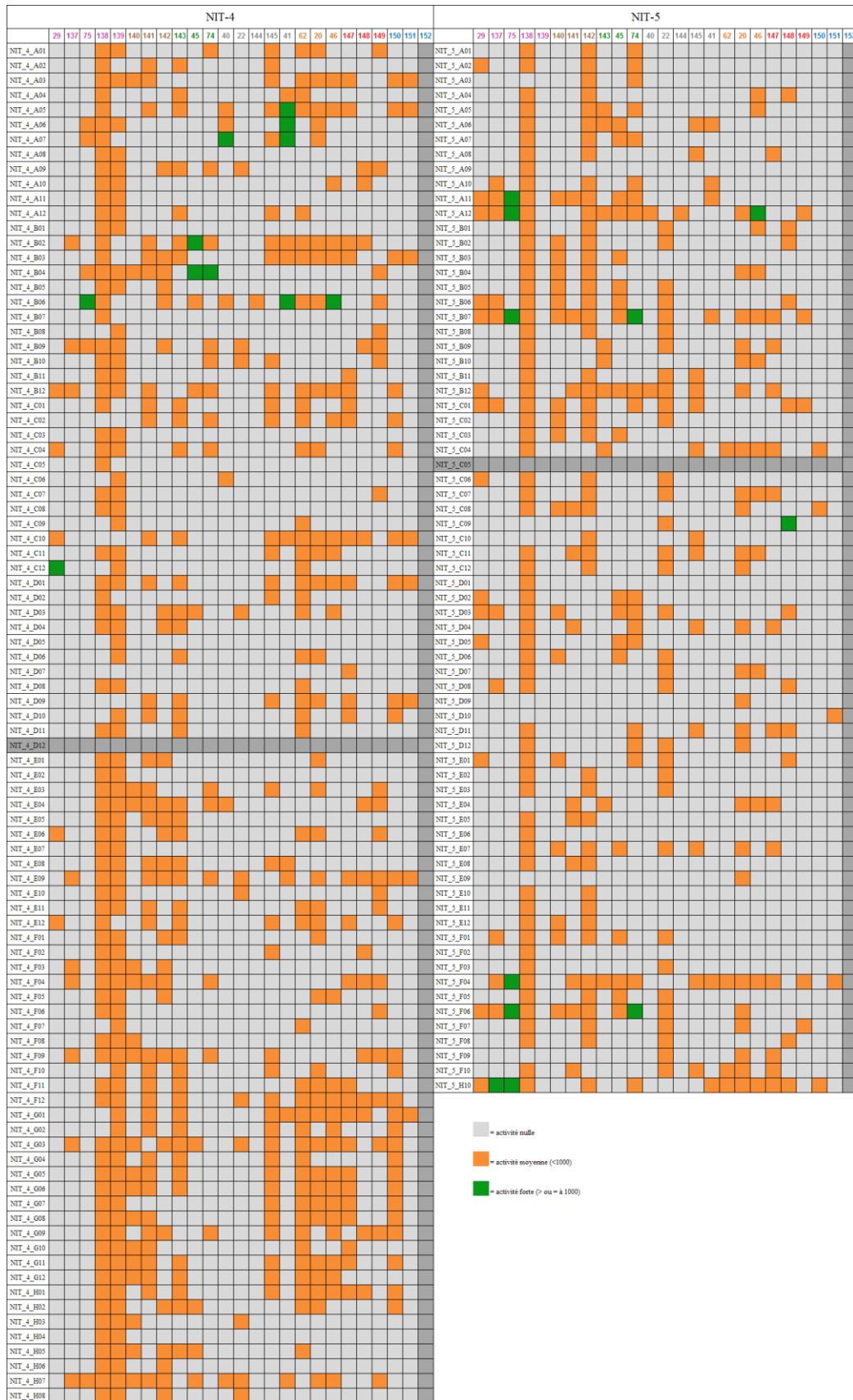


Tableau 5

Pour lire facilement l'ensemble des résultats, un code couleur a été attribué en fonction de la valeur d'activité. En gris les activités nulles, en orange les activités inférieures à 1000 et en vert les activités supérieures ou égales à 1000. Ce tableau permet ainsi une lecture rapide des réponses en fonction des substrats tout en ayant toujours à l'esprit que la valeur de l'activité est directement liée à l'expression de la protéine étudiée et à son efficacité catalytique.

### *III.2.c Analyses des résultats.*

Le graphique (figure 14) et le tableau 5 nous permettent respectivement d'avoir accès rapidement aux activités relatives vis-à-vis des différents substrats de chaque protéine candidate et aux activités en fonction des substrats.

Le tableau 5 nous permet d'avoir une vue d'ensemble sur le criblage et d'identifier précisément les lysats cellulaires d'intérêt pour la transformation des substrats testés, ce qui était notre but dans ce criblage.

Ainsi ce tableau met en évidence la bonne couverture de la diversité structurale des nitriles :

- seul un substrat, le 3-amino-3-phénylpropanenitrile (**152**), de la famille des  $\beta$ -aminonitriles, n'a pas été transformé,
- Le (indol-3-yl)acétonitrile (**144**) est le substrat qui a le moins répondu avec seulement deux lysats positifs, ce nitrile est pourtant connu expérimentalement pour être substrat de sept nitrilases d'après la base de données BRENDA,
- le 3-aminopentanenitrile (**151**) est un des substrats le moins converti avec 10 lysats positifs, il appartient également à la famille des  $\beta$ -aminonitriles,
- les petits substrats, acétonitrile (**139**) et isobutyronitrile (**138**) sont les substrats convertis par le plus grand nombre d'enzymes
- les fortes réponses sont trouvées pour les substrats saturés, insaturés et aryles à l'exception des régioisomères 2-hydroxypentanenitrile (**146**) et 3-hydroxypentanenitrile (**148**).

Le grand nombre de réponses positives sur les substrats **138** et **139**, plus particulièrement sur l'isobutyronitrile (**138**) pour lequel seulement 22 lysats n'ont pas donné de réponses, nous amène à penser que pour ces deux substrats les seuils ont été sous-estimés et que

certainement beaucoup des réponses sont des faux positifs. Cette hypothèse reste cependant à être vérifiée.

Le tableau 5 qui renseigne entre autres la promiscuité des enzymes montre celles qui sont potentiellement sélectives de quelques substrats tel que NIT-5-C09 et NIT-4-C12 (tableau 6).

	29	137	75	138	139	140	141	142	143	45	74	40	22	144	41	62	20	146	147	148	149	150	
NIT_4_B06																							
NIT_5_A12																							
NIT_5_B07																							
NIT_5_H10																							
NIT_5_C09																							
NIT_4_C12																							

= activité nulle  
 = activité moyenne (<1000)  
 = activité forte (> ou = à 1000)

Tableau 6

Les deux représentations mettent en évidence les lysats cellulaires inactifs lors de ce criblage (NIT-4-D12 et NIT-5-C05) (tableau 5). On peut supposer que les lysats cellulaires ne contiennent pas de nitrilases ou que le(s) substrat(s) préférentiel(s) n'a (ont) pas été choisi(s). Nous pouvons aussi supposer que les enzymes candidates avaient une activité nitrile hydratase.

Lors de la sélection des séquences candidates, l'annotation n'avait pas été un critère de sélection. Les annotations des séquences retenues étaient assez diverses, 6 % étaient annotées nitrilase, 7 % putative amidohydrolase, 10 % uncharacterized protein, 15 % carbon-nitrogen hydrolase family protein et 26 % nitrilase/cyanide hydrolase family protein.

En regroupant les 14 lysats ayant donné de fortes réponses sur les substrats testés, on constate que cinq d'entre eux correspondent à des protéines annotées comme nitrilase et une comme putative nitrilase (tableau 7) :

NIT-4-B02, NIT-4-B04, NIT-4-B06, NIT-5-A12 et NIT-5-B07.

		29	137	139	45	74	40	145	151	146	148
NIT_4_A05	Methylthioribose recycling protein										
NIT_4_A06	Putative uncharacterized protein										
NIT_4_A07	Putative amidohydrolase										
NIT_4_B02	Nitrilase										
NIT_4_B04	Putative nitrilase										
NIT_4_B06	Nitrilase										
NIT_4_C12	N-carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase										
NIT_5_A11	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase										
NIT_5_A12	Nitrilase (NitA)										
NIT_5_B07	Nitrilase										
NIT_5_C09	Beta-ureidopropionase										
NIT_5_F04	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase										
NIT_5_F06	Putative amidohydrolase										
NIT_5_H10	Metagenome-Nitrilase										

= activité nulle  
 = activité moyenne (<1000)  
 = activité forte (> ou = à 1000)

Tableau 7

Sur les neuf lysats correspondant aux protéines annotées comme nitrilase, tous ont montré une activité sur les nitriles testés :

NIT-4-B02, NIT-4-B06, NIT-4-C08, NIT-4-D03, NIT-4-H04, NIT-4-H07, NIT-4-H08, NIT-5-A12 et NIT-5-B07 (tableau 8).

		29	137	75	138	139	140	141	142	143	45	74	40	22	144	145	41	62	20	46	147	148	149	150	151	152
NIT_4_B02	Nitrilase																									
NIT_4_B06	Nitrilase																									
NIT_4_C08	Nitrilase family protein																									
NIT_4_D03	Nitrilase																									
NIT_4_H04	Nitrilase																									
NIT_4_H07	Nitrilase																									
NIT_4_H08	Nitrilase																									
NIT_5_A12	Nitrilase (NitA)																									
NIT_5_B07	Nitrilase																									

= activité nulle  
 = activité moyenne (<1000)  
 = activité forte (> ou = à 1000)

Tableau 8

La méthode de criblage utilisée pour rechercher de nouvelles activités nitrilases a été très satisfaisante puisque 10 % des lysats cellulaires testés ont montré une activité importante. Les 4075 tests enzymatiques réalisés en quelques semaines avec succès montrent l'efficacité de cette méthode. Ces résultats sont un premier pas dans la construction d'une bibliothèque de nitrilases. Ils permettent pour un substrat de structure donnée de trouver l'enzyme la plus efficace. Pour confirmer les meilleurs résultats et entreprendre des applications sur de nouveaux substrats, nous avons vérifié sur enzymes purifiées certains résultats qui nous paraissaient les plus pertinents.

#### IV- Vérification des résultats positifs sur enzymes purifiées.

Après analyse des résultats (figure 14 et tableau 5) pour chaque substrat, nous avons sélectionné les trois ou quatre nitrilases les plus actives, soit un total de 38 protéines.

Les enzymes ont été purifiées sur colonne d'affinité, des concentrations de 0,02 à 1,72 mg/mL ont été obtenues (voir matériel et méthodes).

Les 38 enzymes ont été criblées sur l'ensemble des 25 substrats ainsi que sur le 2-hydroxy-3-phénylpropanenitrile (**168**) et deux oxocyclonitriles **169** et **170** qui étaient en cours de synthèse lors du criblage (figure 15).

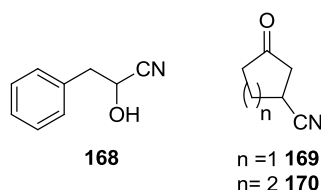


Figure 15

Nous avons décidé de tester les oxocyclonitriles **169** et **170** car les acides carboxyliques correspondants ont un intérêt en synthèse comme briques de construction chirales élémentaires.

Le protocole expérimental est identique à celui utilisé lors du criblage des lysats cellulaires (Cf. III-2.a). L'activité enzymatique a été évaluée avec le test enzymatique couplé à la GDH.

Les étapes d'acidification et de basification ont néanmoins été supprimées. La concentration des enzymes purifiées étaient comprises entre 0,05 mg/mL à 0,1 mg/mL.

Les résultats obtenus avec les enzymes purifiées sont présentés pour chaque substrat et comparés avec les résultats obtenus avec les lysats sauf pour les substrats **168**, **169**, **170** (tableau 9).

	29	137	75	138	139	140	141	142	143	45	74	40	22	144	145	41	62	20	146	168	147	148	149	150	151	152	169	170
	L P	L P	L P	L P	L P	L P	L P	L P	L P	L P	L P	L P	L P	L P	L P	L P	L P	L P	L P	P	L P	L P	L P	L P	L P	L P	P	P
NIT_4_A05																												
NIT_4_A06																												
NIT_4_A07																												
NIT_4_A10																												
NIT_4_A12																												
NIT_4_B02																												
NIT_4_B03																												
NIT_4_B04																												
NIT_4_B06																												
NIT_4_B09																												
NIT_4_B11																												
NIT_4_B12																												
NIT_4_C10																												
NIT_4_C12																												
NIT_4_E09																												
NIT_4_F04																												
NIT_4_G01																												
NIT_4_G03																												
NIT_4_G04																												
NIT_4_G05																												
NIT_4_G11																												
NIT_4_H01																												
NIT_4_H03																												
NIT_4_H05																												
NIT_4_H07																												
NIT_4_H10																												
NIT_5_A08																												
NIT_5_A11																												
NIT_5_A12																												
NIT_5_B01																												
NIT_5_B07																												
NIT_5_C09																												
NIT_5_E06																												
NIT_5_E09																												
NIT_5_F04																												
NIT_5_F06																												
NIT_5_F07																												
NIT_5_F08																												

= activité nulle  
 = activité moyenne (<1000)  
 = activité forte (> ou = à 1000)  
**L = Lysat**  
**P = enzyme purifiée**

Tableau 9

Dans l'ensemble, les résultats obtenus avec les lysats se retrouvent sur enzymes purifiées. Cependant cinq des fortes activités détectées sur lysat n'ont pas été confirmées sur enzymes purifiées (NIT-4-A05, NIT-4-A06, NIT-4-A07, NIT-4-C12 et NIT-5-C09).

Ces résultats peuvent s'expliquer par une inactivation de l'enzyme lors de la purification mais des vérifications préliminaires de l'activité vue sur lysat doivent être menées par HPLC.

Des différences d'activité sont observées entre les lysats et les enzymes purifiées, cela est certainement dû à la différence de concentration effective en enzymes candidates ou à la stabilité de l'enzyme après purification.

De très faibles réponses en lysat ne se sont pas retrouvées sur enzymes purifiées, principalement sur les nitriles **138** et **139**, ce qui confirme ce qui avait été vu dans le tableau 9, à savoir que les seuils ont été mal évalués et que le bruit de fond n'a pas été totalement éliminé.

La nitrilase NIT-4-G05 qui n'a donné que quelques réponses positives sur enzyme purifiée sur les 25 substrats du premier criblage, s'est avérée fortement active sur le nouveau nitrile **168**. De plus, NIT-5-A12 s'est également montrée active sur l'oxocyclonitrile à cinq chaînons **169**. De la même façon, NIT-4-B06 est active sur l'oxocyclonitrile à six chaînons **170**.

Le criblage de nouvelles activités nitrilases réalisé sur lysat cellulaire nous a permis dans un premier temps d'avoir une vue d'ensemble de l'activité nitrilase des protéines candidates sur les substrats sélectionnés. Pour chaque substrat transformé, l'activité enzymatique des meilleures réponses observée sur lysat cellulaire a été vérifiée sur enzymes purifiées. Nous disposons ainsi de nitrilases actives sur des substrats structurellement variés et nous allons utiliser ces résultats en testant des substrats obtenus par déclinaison de certains d'entre eux.

## **V- Déclinaisons.**

### *V-1 Déclinaisons du 3-phénylpropanenitrile (75).*

Le criblage réalisé nous a permis de créer un catalogue de nitrilases qui a pour vocation d'être utilisé comme un outil pour des applications en biocatalyse. Si un substrat simple issu du criblage a été transformé par une nitrilase, on peut alors envisager que cette nitrilase sera active sur un substrat structurellement proche, obtenu par « décoration » du squelette de base.

Nous avons décidé dans un premier temps de faire des déclinaisons autour du 3-phénylpropanenitrile (**75**). Les substrats envisagés (**39**, **75a**, **75b**, **75c**, **75d**) (schéma 50) possèdent une substitution en  $\beta$ , pas directement proche du centre réactionnel, et donc un centre stéréogène. Une application potentielle des composés obtenus est la synthèse de quinolines fonctionnalisées (schéma 51).

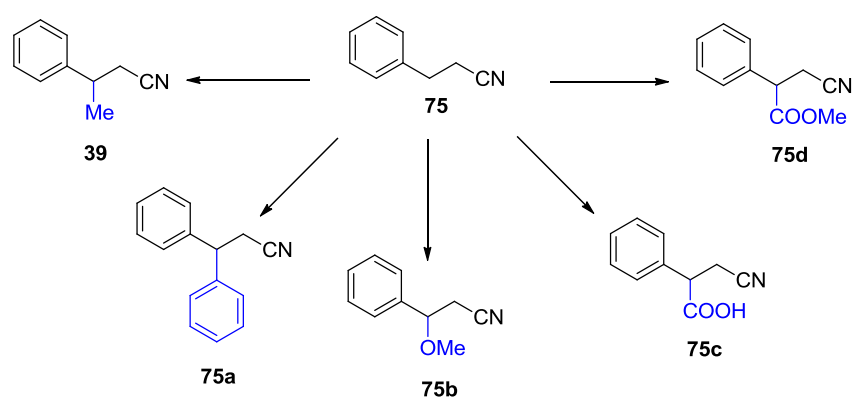


Schéma 50

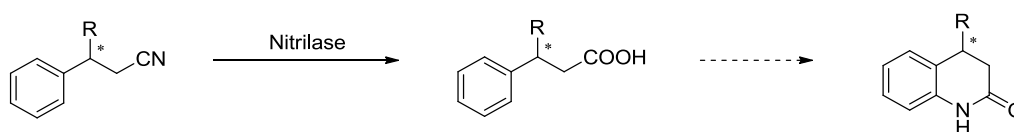


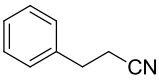
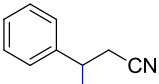
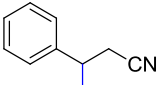
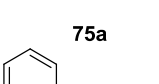
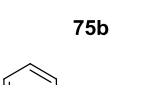
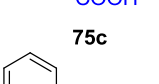
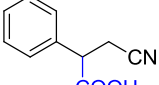
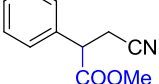
Schéma 51

Dans un premier temps, nous nous intéresserons à la conversion de la fonction nitrile en acide carboxylique, et dans un second sur les réponses positives, à la stéréospécificité de la transformation.

Les cinq substrats déclinés du 3-phénylpropanenitrile (**75**) ont été testés sur les huit nitrilases de notre bibliothèque actives sur ce dernier.

Le criblage a été effectué dans les conditions expérimentales décrites précédemment pour le criblage général (Cf. III-3.a). Les résultats sont présentés dans le tableau 10.



	75	39	75a	75b	75c	75d	
NIT 4 A05							
NIT 4 A06							
NIT 4 A07							
NIT 4 A10							
NIT 4 A12							
NIT 4 B02	Orange						
NIT 4 B03							
NIT 4 B04							<b>75</b>
NIT 4 B06	Green	Orange		Orange		Orange	
NIT 4 B09							
NIT 4 B11							<b>Me</b>
NIT 4 B12							<b>39</b>
NIT 4 C10	Yellow						
NIT 4 C12	Yellow						
NIT 4 E09							<b>75a</b>
NIT 4 F04	Yellow						
NIT 4 G01							<b>75b</b>
NIT 4 G03							
NIT 4 G04							<b>75c</b>
NIT 4 G05	Orange						
NIT 4 G11							<b>75d</b>
NIT 4 H01							
NIT 4 H03							
NIT 4 H05							
NIT 4 H07	Yellow						<b>75c</b>
NIT 4 H10	Orange						
NIT 5 A08							<b>75d</b>
NIT 5 A11	Green						
NIT 5 A12	Green	Orange	Orange	Orange		Orange	
NIT 5 B01							
NIT 5 B07	Orange						
NIT 5 C09							
NIT 5 E06							
NIT 5 E09							
NIT 5 F04	Green						
NIT 5 F06							
NIT 5 F07							
NIT 5 F08							



-  = non testé
-  = activité nulle
-  = activité moyenne (< 1000)
-  = activité forte (> ou = à 1000)

Tableau 10

Sur les huit substrats testés, seul l'acide 3-cyano-2-phénylpropanoïque (**75c**) n'a pas été transformé. Pour tous les autres substrats sauf un, le **75a**, il y a plusieurs nitrilases actives.

NIT-5-A12 et NIT-4-B06 sont les seules enzymes parmi les huit actives sur le 3-phénylpropanenitrile (**75**) à être actives sur les substrats déclinés, sauf **75c**, NIT-5-A12 et NIT-4-B06 étant les seules actives sur **75d**, cependant les activités observées sont moindres que sur le 3-phénylpropanenitrile (**75**).

Les études au laboratoire ont montrés qu'en travaillant à l'échelle préparative, 47 mg du (*R*) acide β-esters a été obtenu issus de la réaction de **75d** avec NIT-4-B06 avec un rendement de 96 % et un e.e de 46 %. De même pour le (*S*) β-oxo acides issus de **169** qui a été obtenu avec 74 % de rendement et 48 % d'e.e avec NIT-5-F04.

### V-2 Déclinaison des dinitriles.

L'hydrolyse chimique des dinitriles conduit à la formation des diacides carboxyliques correspondant, par voie enzymatique il est possible de réaliser la monohydrolyse (Cf. chapitre I). L'hydrolyse enzymatique par une nitrilase est alors d'un grand intérêt pour la désymétrisation de substrats symétriques.

Sur les 38 enzymes purifiées, 9 enzymes se sont avérées actives sur les dinitriles **137** et/ou **45** lors du criblage, nous avons décidé d'étendre la gamme des dinitriles en variant la longueur de la chaîne carbonée saturée, substrats **46**, **47**, **48**, **50**, ou non, substrat **171**, et en introduisant un hétéroatome, substrat **44**. Ce substrat est intéressant car son produit d'hydrolyse est un intermédiaire dans la synthèse du glyphosate, le principe actif de l'insecticide Roundup (figure 16).

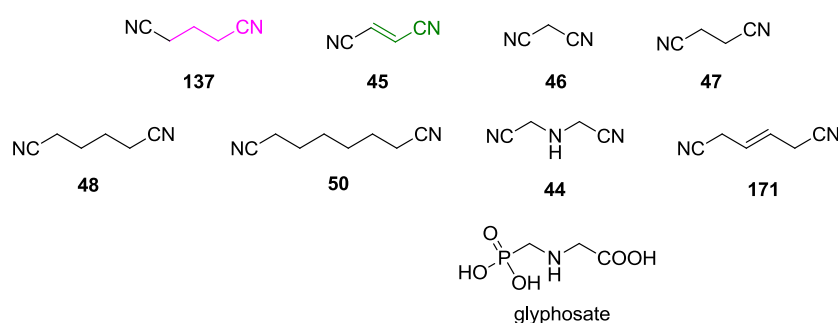


Figure 16

Nous avons ensuite choisi les 12 lysats cellulaires présentant une forte activité sur les dinitriles **137** et **45** afin de les tester sur notre nouvel ensemble de substrats. Le criblage a été réalisé dans les mêmes conditions que précédemment (Cf. III-3.a). Les résultats sont résumés dans le tableau 11 ci-dessous.

	137	45	46	47	48	50	44	171
NIT_4_B02	Orange	Vert	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
NIT_4_B04	Orange	Vert	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
NIT_4_B06	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
NIT_4_B12	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
NIT_4_H07	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
NIT_4_H10	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
NIT_5_A11	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
NIT_5_A12	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
NIT_5_B07	Orange	Orange	Vert	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
NIT_5_F01	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
NIT_5_F04	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
NIT_5_F06	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange



Tableau 11

Pour tous les composés testés nous avons obtenu plusieurs réponses positives. Trois des 12 nitrilases testées, NIT-5-A12, NIT-5-B07 et NIT-4-B02, ont montré une activité sur tous les substrats dinitriles, NIT-5-B07 montrant une très forte activité sur le malonitrile (**46**). NIT-4-B02, NIT-4-B06, NIT-4-H10, NIT-5-A11, NIT-5-A12 et NIT-5-B07 sont actives sur tous les nouveaux nitriles.

Si ce criblage nous a permis de tester l'activité sur les dinitriles, il n'a pas permis de montrer la sélectivité mono/di hydrolyse. Nous avons étudié plus particulièrement ce point pour le composé **44** sur enzymes purifiées, par HPLC. Sur l'ensemble des 11 lysats actifs sur ce composé (tableau 11), seules les enzymes purifiées NIT-5-A11, NIT-4-B06, NIT-4-H07 et NIT-5-B07 ont montré une sélectivité totale pour la monohydrolyse. L'optimisation au laboratoire des conditions réactionnelles avec NIT-4-H07 a permis l'obtention de 25 mg d'acide 2-((cyanométhyl)amino) acétique (**172**) (figure 17) avec un rendement de 96 %

(travaux en cours de publication). Dans la littérature, aucun travail ne mentionnait la désymétrisation du composé **44**, seule la dihydrolyse avait été constaté ou le composé avait été transformé sans aucune analyse du produit formé<sup>102,103</sup>.

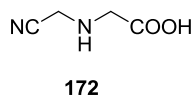


Figure 17

## VI- Conclusion.

L'approche génomique utilisée pour rechercher de nouvelles activités nitrilase s'est avéré être une méthode efficace. Seulement deux enzymes candidates n'ont pas répondu (NIT-4-D12 et NIT-5-C05). Seul le  $\beta$ -aminonitrile **152** n'a pas été transformé lors du criblage sur lysat cellulaire, montrant que la diversité structurale a été bien couverte. L'évaluation des activités nitrilases réalisée sur lysat cellulaire nous a permis de réaliser une sélection des activités les plus représentatives sur toutes les catégories de substrats, ainsi 38 activités enzymatiques ont été sélectionnées. Une vérification de ces activités sur enzymes purifiées nous a permis de valider la concordance des résultats avec ceux obtenu sur lysat cellulaire. NIT-4-B06 et NIT-5-A12 sont actives sur de nombreux substrats et sont donc promiscuitaires. Une déclinaison du 3-phénylpropanenitrile (**75**) a été réalisée, les substrats issus de la déclinaison ont été testés sur notre sélection d'enzymes purifiées. Le nitrile  $\beta$ -ester **75d** est un bon substrat de NIT-4-B06 et une étude pour une réaction à l'échelle préparative est soumise à publication. La déclinaison réalisée sur les dinitriles a permis de trouver quatre nitrilases d'intérêt (NIT-5-A11, NIT-4-B06, NIT-4-H07 et NIT-5-B07) dont NIT-4-H07 qui a montré une importante régiosélectivité sur le nitrile **44**. Ce travail est actuellement soumis à publication.

Ce criblage nous a permis de découvrir de nouvelles activités nitrilases et de réaliser un catalogue dont nous avons montré l'utilité avec deux applications. Comme nous l'avons vu lors des analyses, les fortes activités nitrilases observées étaient majoritairement annotées

<sup>101</sup> (a) Zhu D., Mukherjee C., Biehl E.R., Hua L., *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, 349, 1667-1670.

b) Mukherjee C., Zhu D., Biehl E.R., Hua L., *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 5238-5242.

c) Rey P., Rossi J.C, Taillades J., Gros G., Nore O., *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 8155-8162.

<sup>102</sup> Shekhter O.V., Kuklenkova O.B., Sergovskaya N.L., Tsizin Y.S., *Chem. Heterocycl. Compds.*, **1993**, 29, 170-173.

<sup>103</sup> Berk H.C., Franczyk II T.S., Weisenfeld R.B., Morgenstern D.A., Arhancet J.P., Moench J.R.W.L., Peterson J.C. *Patent US2002/19565 A1*, **2002**.

« nitrilase ». L'ensemble des activités nitrilases testées ne recouvre pas du tout l'ensemble des branches de la superfamille nitrilase. Dans le chapitre suivant, toujours selon une approche génomique, sera exposée une nouvelle stratégie de recherche d'activité nitrilase visant à mieux représenter la superfamille nitrilase.

# CHAPITRE III

Recherche d'activités  $\alpha$ -aminonitrilase

## CHAPITRE III : Recherche d'activités $\alpha$ -aminonitrilase

Le criblage de l'activité de 163 nitrilases potentielles a permis de trouver 38 nouvelles enzymes actives sur des substrats structurellement variés. Les substrats de type  $\alpha$ -aminonitrile n'ont pas été inclus dans ce criblage car le test enzymatique couplé utilisé pour la détection de l'activité nitrilase est incompatible avec ce type de substrat. En effet, les  $\alpha$ -aminonitriles sont obtenus par une réaction de Strecker, c'est-à-dire par réaction d'un ion cyanure sur un aldéhyde en présence d'ammoniaque (Cf. chapitre I). Cette réaction est une réaction réversible. Dans le test enzymatique couplé, l'activité enzymatique est mesurée par dosage de l'ammoniaque libérée lors de l'hydrolyse du nitrile en acide carboxylique. Ce dosage pourrait donc être faussé par la réversibilité de la réaction de Strecker et le test par dosage de l'ammoniaque formée n'est donc pas applicable aux substrats  $\alpha$ -aminonitriles (schéma 52).

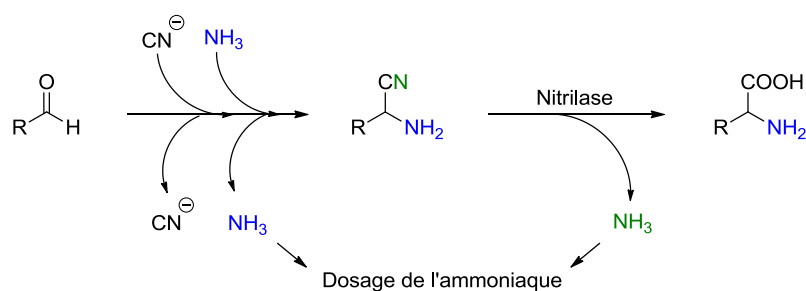


Schéma 52

Comme nous l'avons exposé au chapitre I, l'objectif principal de la thèse est la recherche de nouvelles nitrilases actives sur des  $\alpha$ -aminonitriles. Notre première approche nous a permis d'obtenir 163 enzymes qui appartiennent en majorité à la branche 1 de la super famille nitrilase (Cf. chapitre II). Afin de mieux couvrir la diversité de cette super famille, et d'augmenter les chances de trouver des  $\alpha$ -aminonitrilases, nous avons effectué une seconde recherche selon une approche différente. Nous avons également développé un nouveau test de détection permettant d'évaluer l'activité de l'enzyme et sa stéréospécificité. Ce chapitre présente après une brève explication de la nouvelle sélection des protéines candidates, le choix et la synthèse des substrats, le développement du test de détection de l'activité enzymatique puis les résultats du criblage.

## I- Sélection et obtention des enzymes candidates.

Lors du premier criblage, 163 nitrilases avaient été sélectionnées à l'aide d'un groupe de nitrilases de référence. Comme mentionné dans le chapitre I, l'arbre de la superfamille des nitrilases comporte 13 branches qui ont été peu, voire pas du tout, explorées lors de la sélection des enzymes du premier criblage (nitrilases candidates bleues) (figure 18). Il y a donc une partie de l'arbre de la superfamille nitrilase qui n'avait pas été explorée (branches 7, 8 et 9). Lors de la première sélection, comme aucune nitrilase connue du set de référence ne ressemblait assez aux protéines des branches inexplorées, il était alors peu probable d'en rapatrier lors du BLAST (figure 18).

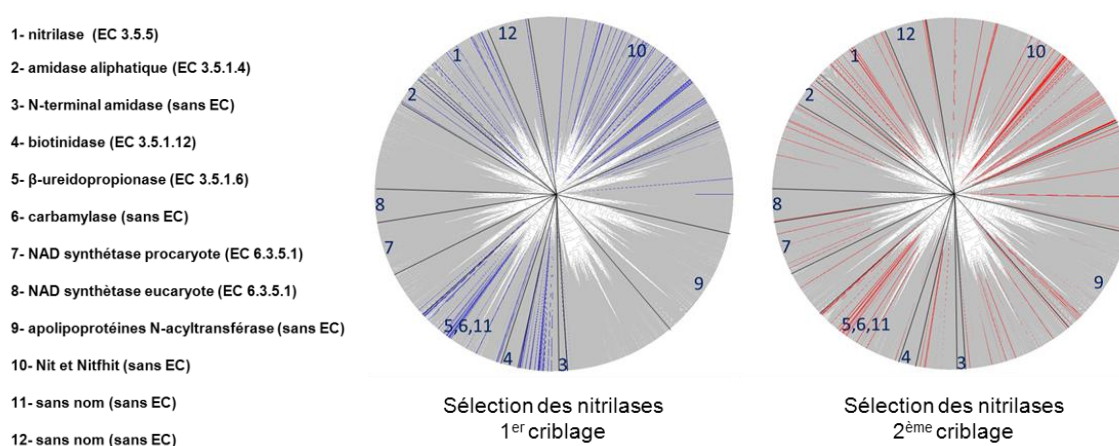


Figure 18

Afin de mieux couvrir la diversité de la superfamille nitrilase, une nouvelle sélection de séquences a alors été effectuée (nitrilase candidates rouges), basée cette fois-ci sur l'arbre phylogénétique des protéines qui partagent le même motif protéique « InterPro » des nitrilases.

### *I-1 Sélection des gènes candidats par recherche de motif InterPro.*

La stratégie utilisée pour la recherche de nouvelles séquences est illustrée dans le schéma 53.



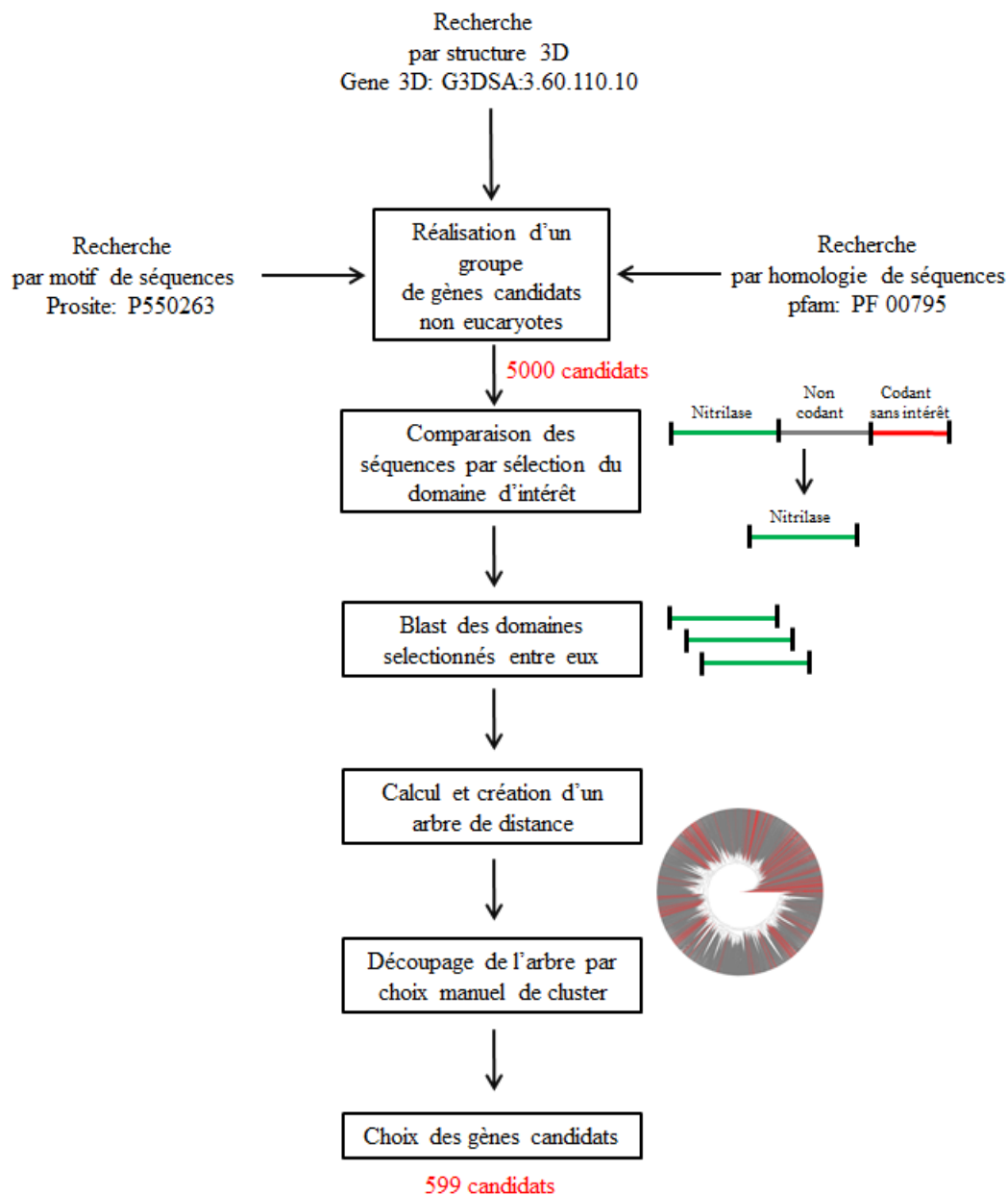


Schéma 53

La première étape a été de constituer un groupe de gènes candidats (gènes eucaryotes exclus) en utilisant la base UniprotKB selon trois critères de recherche qui sont des identifiants caractéristiques des nitrilases retrouvés dans trois bases de données ayant des critères de classifications distincts : Pfam, basée sur l'homologie de séquences ; Prosite, basée sur les signatures de séquences et Gene 3D basée sur les structures de protéines. La combinaison de ces trois bases de données a permis d'identifier 5000 protéines candidates pour lesquelles un arbre phylogénétique a pu être construit. Ce dernier a ensuite été découpé en groupe de façon systématique. Comme pour le premier criblage, la dernière étape de sélection est réalisée

selon la disponibilité des souches bactériennes dans la souchothèque du Genoscope. Pour éviter les doublons avec le premier criblage, les groupes possédant une protéine déjà étudiée dans le premier criblage ont été exclus de la nouvelle sélection, ce qui a conduit aux choix de 599 candidats représentatifs, couvrant ainsi environ 10% de la superfamille des nitrilases.

### ***I-2 Obtention des nitrilases.***

Une fois les enzymes candidates sélectionnées, les gènes correspondant ont été amplifiés et clonés, et les protéines produites selon la méthode déjà décrite dans le chapitre II. Un taux d'échec de seulement 29 %, versus 43% (cf. chapitre II), a été obtenu car cette fois-ci les gènes ayant un %GC très élevé ont été exclus de la sélection. Les 425 protéines candidates obtenues sous forme de lysat ont été réorganisées dans cinq plaques 96 puits (NIT-6, NIT-7, NIT-8, NIT-14 et NIT-15). Nous avons donc criblé 588 nitrilases au total correspondant à ces 425 nouvelles protéines produites plus les 163 nitrilases testées lors du premier criblage.

## **II- Sélection et synthèse des substrats.**

### ***II-1 Sélection des $\alpha$ -aminonitriles.***

La sélection a été réalisée afin de couvrir au mieux la diversité structurale et donc en choisissant des  $\alpha$ -aminonitriles ayant des chaînes latérales aux caractéristiques distinctes. L'objectif est de proposer des squelettes carbonés de base pour réaliser des déclinaisons par la suite.

Six  $\alpha$ -aminonitriles ont été choisis : le précurseur de la lysine **173** et de l'acide glutamique **174** pour leurs chaînes latérales respectivement basique et acide, le précurseur de la valine **85** et de la norvaline **89** pour leurs chaînes latérales respectivement ramifiée et linéaire hydrophobe et les précurseurs de la phénylglycine **81** et de la tyrosine **175** pour leur chaîne latérale aromatique de type phényle et phénol (figure 19).

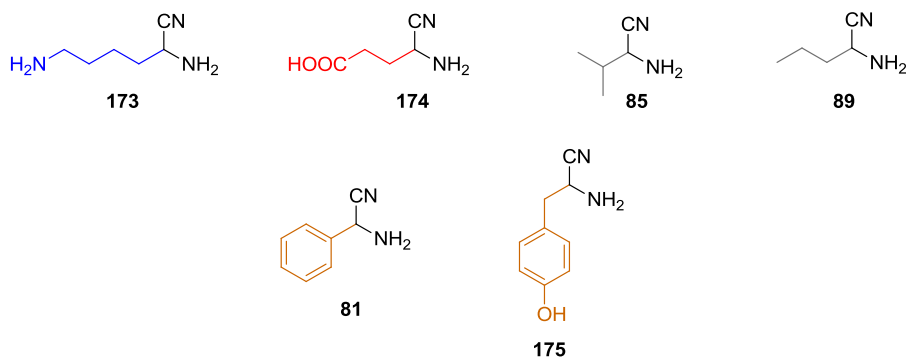


Figure 19

Dans cet ensemble, seul le précurseur de la phénylglycine est commercial, les cinq autres ont donc été synthétisés et différentes voies de synthèse ont été élaborées.

### *II-2 Synthèse des substrats.*

Il existe plusieurs stratégies de synthèse dans la littérature pour l'obtention d' $\alpha$ -aminonitriles (schéma 54), notamment la première étape de synthèse de la réaction de Strecker (Cf. chapitre I. IV-2.a). Cette synthèse a l'avantage d'être applicable à une large gamme de produits de départ. Nous avons donc employé autant que possible cette stratégie.

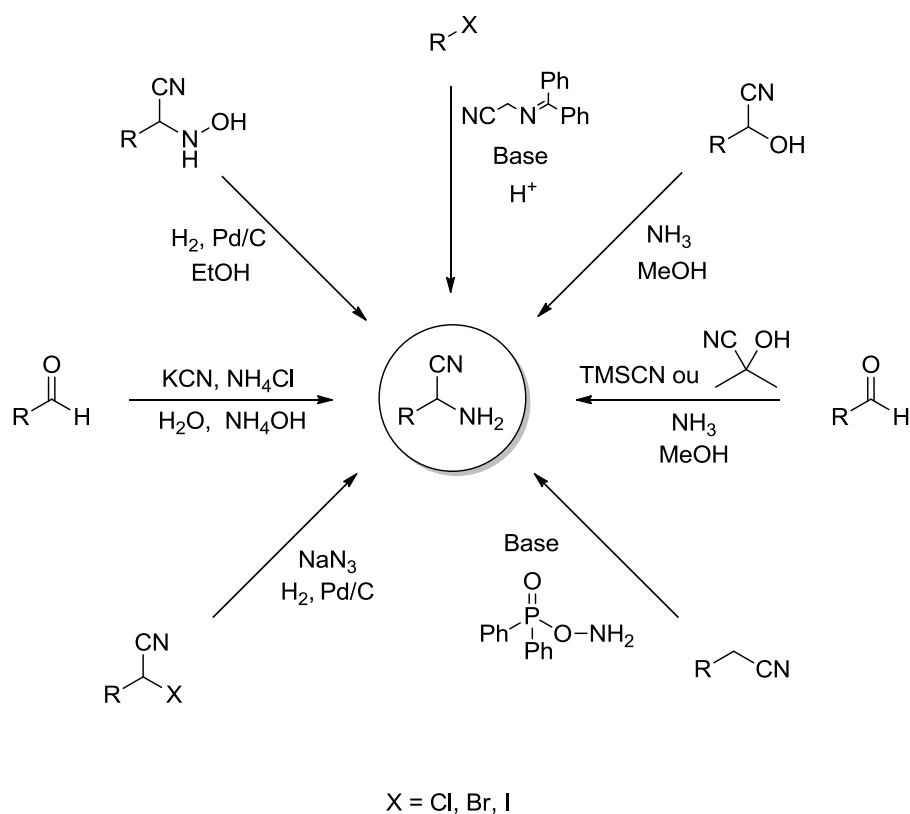


Schéma 54

Le composé **85** a été synthétisé selon le protocole décrit par López-Serrano *et al*<sup>104</sup> avec un rendement de 55 %.

Le composé **89** a été synthétisé selon le protocole décrit par Khuong et Ghanshyam<sup>105</sup> avec un rendement de 70 %.

### ***II-2.a Synthèse du composé 174, précurseur de l'acide glutamique.***

La synthèse du précurseur  $\alpha$ -aminonitrile de l'acide glutamique a déjà été décrite par Ressler *et al.*<sup>106</sup> à partir du précurseur  $\alpha$ -aminoamide *N*-substitué **177** en quatre étapes, l' $\alpha$ -aminoamide étant obtenu en cinq étapes à partir de l'acide glutamique **176** (schéma 55).

<sup>104</sup> López-Serrano J., Jongejan J.A., Rantwijk V.F., Sheldon R.A., *Tetrahedron Asymm.*, **2001**, 12, 219-228.

<sup>105</sup> Khuong M., Ghanshyam P., *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 4583-4586.

<sup>106</sup> Ressler C., Nagarajan G.R., Kirisawa M., Kashelkar D.V., *J. Org. Chem.*, **1971**, 36, 3960-3966.

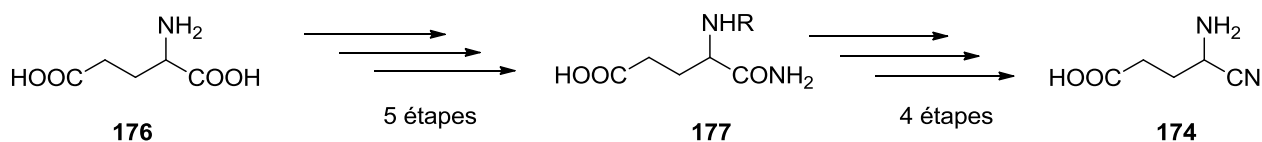


Schéma 55

Le nombre élevé d'étapes, principalement dû à des étapes de protection/déprotection et la nécessité d'utiliser l'acide glutamique comme réactif de départ alors qu'il s'agit du produit que l'on souhaite obtenir enzymatiquement nous a conduit à envisager une autre synthèse. Le produit désiré **174** peut être obtenu par réaction de Strecker à partir de l'aldéhyde **178** correspondant. Ce dernier proviendrait de l'oxydation du produit d'ouverture de la  $\gamma$ -butyrolactone **180** (schéma 56).

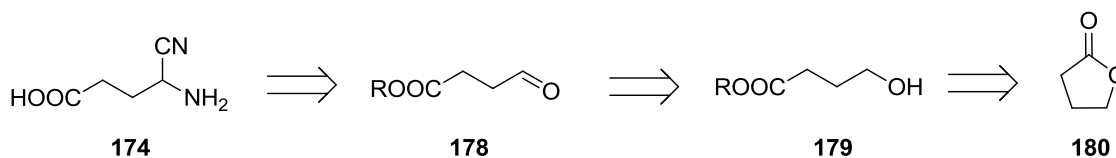


Schéma 56

L'ouverture de la lactone **180** par de l'hydroxyde de sodium suivie d'une estérification par le tétrafluoroborate de triéthylxonium a conduit à l'ester éthylique **181** correspondant. Malheureusement l'aldéhyde **182** obtenu par oxydation s'est révélé très volatil (schéma 57).

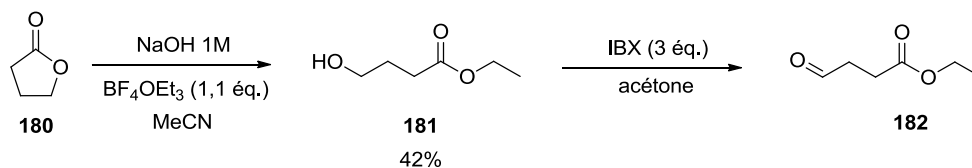


Schéma 57

Un ester benzylique a donc été synthétisé par réaction avec le bromure de benzyle après ouverture de la lactone (schéma 58).

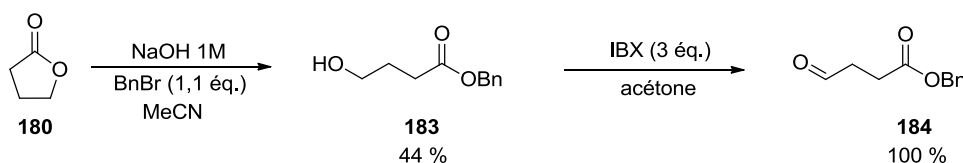


Schéma 58

L'aldéhyde  $\gamma$ -estérifié **184** a ensuite été soumis à diverses réactions de Strecker en milieu organique ou aqueux afin d'obtenir l' $\alpha$ -aminonitrile protégé **185** désiré (schéma 59).

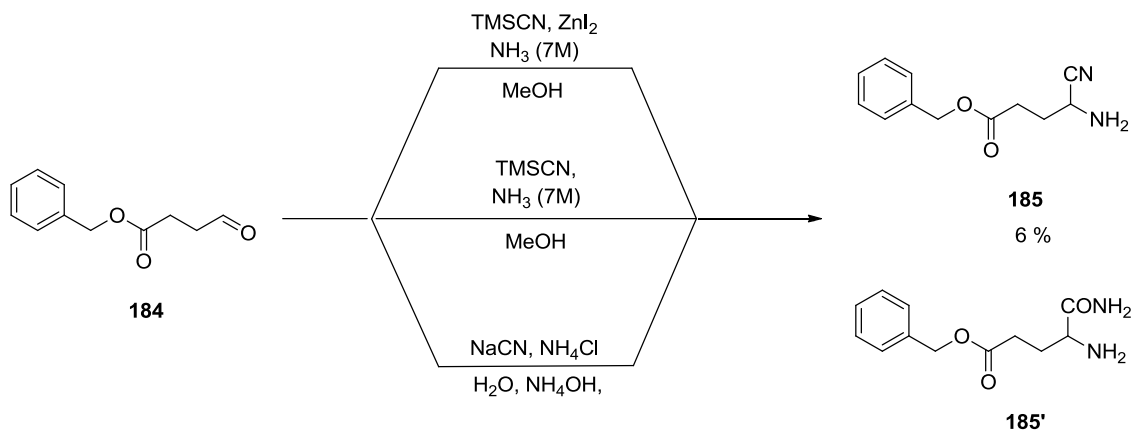


Schéma 59

Les différentes conditions citées ci-dessus ont été testées. Les analyses CCM ont montré que de nombreux produits secondaires avaient été générés et le produit **185** n'a été obtenu qu'avec des rendements très faibles (6%) du fait de la formation importante d'amide **185'** issue de l'attaque nucléophile de l'ammoniaque sur l'ester.

Pour contourner ce problème, une réaction de Strecker modifiée avec le phénylglycinol comme amine a été réalisée en milieu organique, conduisant à l' $\alpha$ -aminonitrile protégé **184'** avec 70 % de rendement. L'amine est ensuite déprotégée par action du tétraacétate de plomb et hydrolyse en milieu acide, avec un rendement modeste de 32% (schéma 60). Ce rendement s'explique par l'hydrolyse partielle de l'ester en milieu acide.

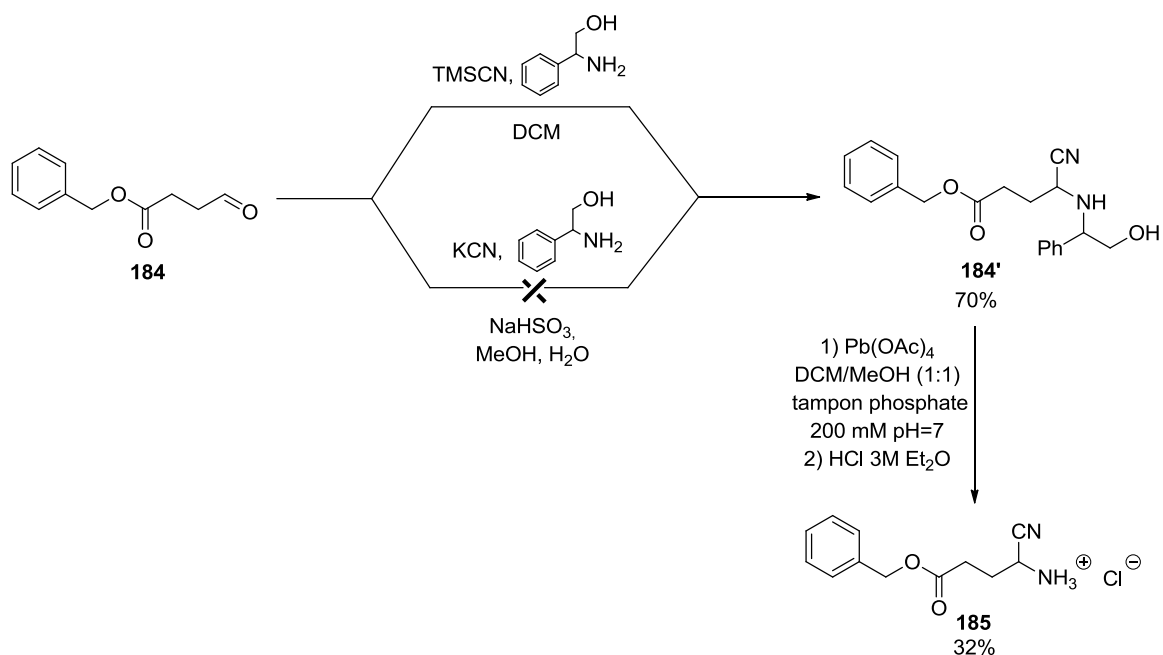


Schéma 60

Les faibles rendements obtenus nous ont amenés à chercher une autre méthode de synthèse. Le produit désiré **174** pourrait être obtenu par hydrolyse d'une imine de type **186**, résultat de la substitution nucléophile entre un  $\alpha$ -iminonitrile commercial **188** et un dérivé halogéné type **187** (schéma 61).

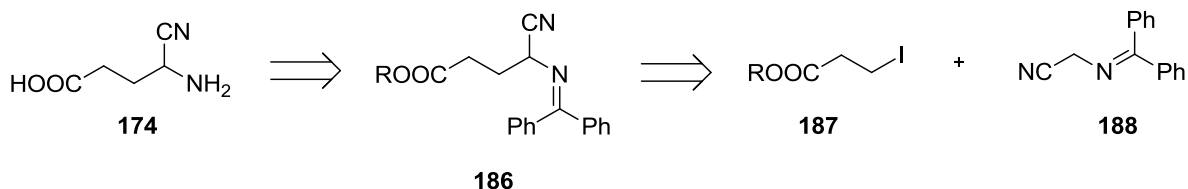


Schéma 61

Le 3-chloropropanoate d'éthyle (**189**) a été transformé en dérivé iodé **190** correspondant avec un rendement quantitatif<sup>107</sup>. Le produit de substitution nucléophile **191** a été obtenu avec un bon rendement de 85% dans des conditions de transfert de phase<sup>108</sup> (schéma 62).

<sup>107</sup> Shoup T.S., Baker D.C., Coutts S.M., Fe R.S., Hand E.S., *U.S. Patent US5019573 A1*, **1991**.

<sup>108</sup> McLaughlin M., Mohareb R.M., Rapoport H., *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 50-54.

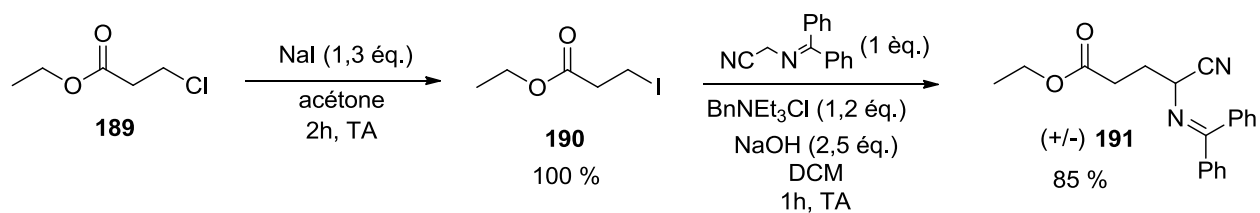


Schéma 62

La première stratégie envisagée (voie 1) a été d'hydrolyser l'imine **191** en milieu acide peu concentré (1M) pour obtenir l' $\alpha$ -aminonitrile ester **192'** avec 77 % de rendement. La déprotection de l'ester, qui doit être réalisée en condition douce pour éviter l'hydrolyse de la fonction nitrile, n'a cependant pas permis d'obtenir le produit **174** désiré. Une hydrolyse enzymatique avec une estérase porcine a été tentée mais n'a pas conduit au produit désiré malgré différentes conditions de température et pH. L'action de l'iodure de triméthylesilyle généré *in situ* n'a pas non plus conduit au produit désiré. La saponification de l' $\alpha$ -aminonitrile ester **192'** n'a pas été envisagée par risque de cyclisation intramoléculaire de l'amine sur l'ester (schéma 63).

La deuxième stratégie (voie 2) a été de saponifier l'ester de l' $\alpha$ -iminonitrile ester **191** pour conduire à l'iminoacide **192** obtenu avec un rendement quantitatif, puis d'hydrolyser l'imine dans une seconde étape. Le précurseur de l'acide glutamique racémique (**174**) a ainsi été obtenu avec un rendement satisfaisant de 61 %.



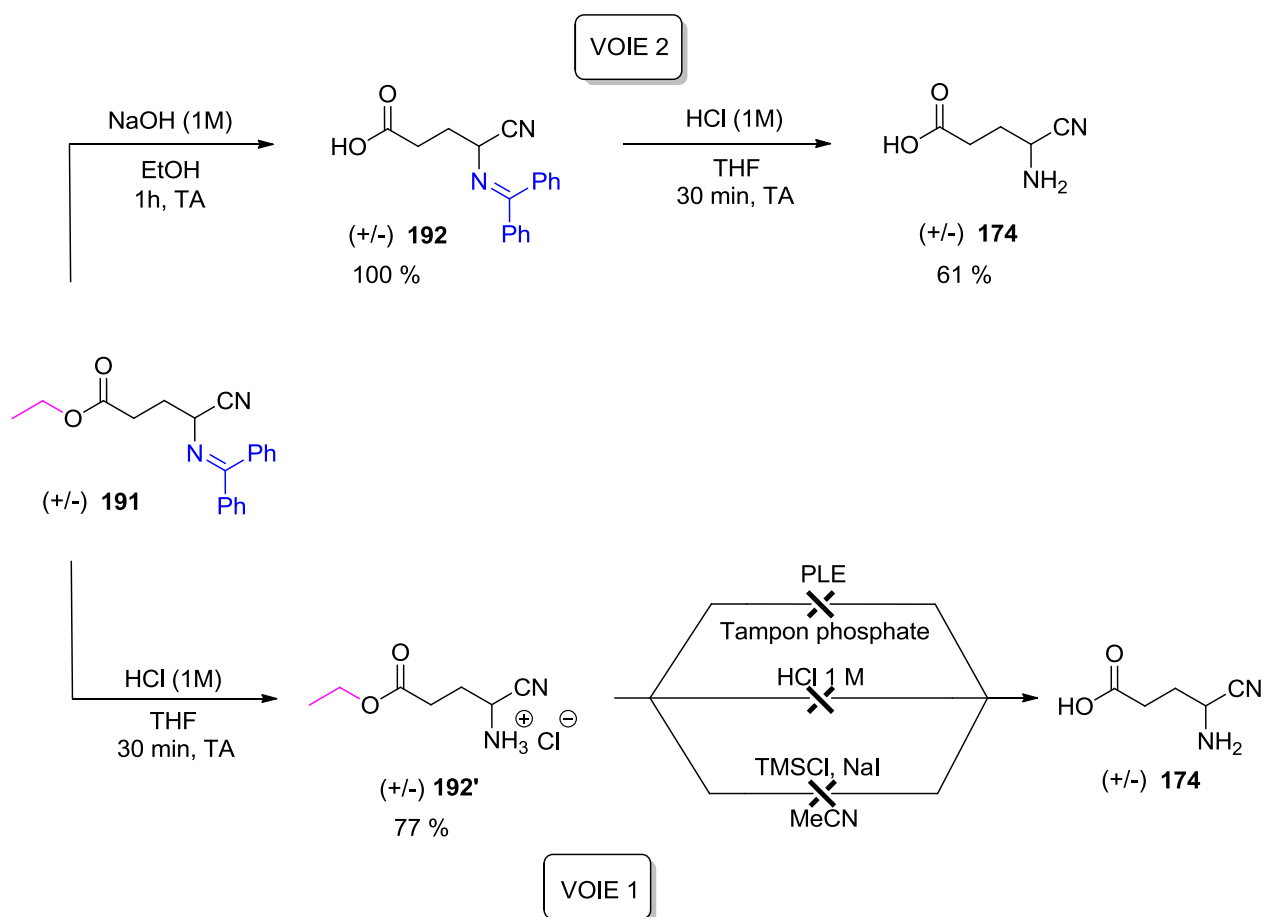


Schéma 63

### II-2.b Synthèse du composé **173**, précurseur de la lysine.

La synthèse du composé **173** a été envisagée selon le protocole de Routier *et al*<sup>109</sup>. Bien que partant de la lysine, c'est à dire du produit final visé par hydrolyse enzymatique, nous avons choisi de reproduire ce protocole car la seule modification à apporter concernait la nature des groupements protecteurs des fonctions amine, non orthogonaux dans notre cas.

La lysine racémique di-protégée **194** est obtenue avec 97 % de rendement. L'amidation de la fonction acide a été réalisée avec activation de la fonction acide par le chloroformate d'éthyle pour donner la lysine amide protégée **195** obtenue avec un rendement quantitatif. Enfin, une étape de déshydratation de l'amide a été réalisée en présence d'anhydride trifluoroacétique pour conduire au précurseur  $\alpha$ -aminonitrile protégé de la lysine racémique **196** avec 94 % de rendement (schéma 64).

<sup>109</sup> Routier S., Bernier J.L., Waring M.J., Colson P., Houssier C., Bailly C., *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 2326-2331.

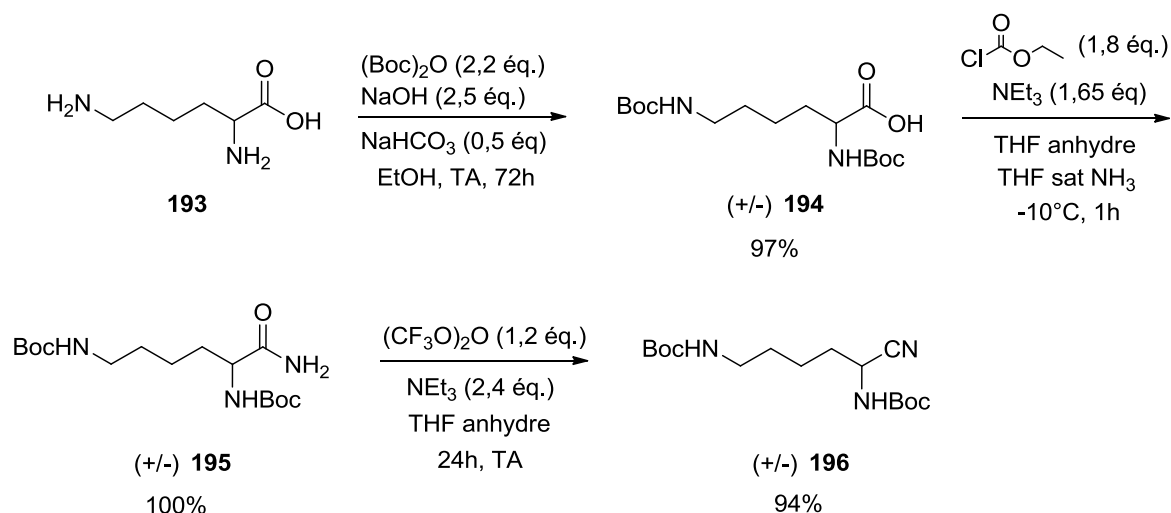


Schéma 64

La coupure du groupement *t*-butoxycarbonyl est classiquement réalisée en milieu acide (TFA, DCM). La présence de traces d'eau lors de la déprotection a entraîné l'hydrolyse du nitrile en amide. Plusieurs conditions de déprotection ont été tentées et à chaque fois, malgré les précautions prises, l'amide a été obtenue avec une proportion de 10 à 50% (schéma 65).

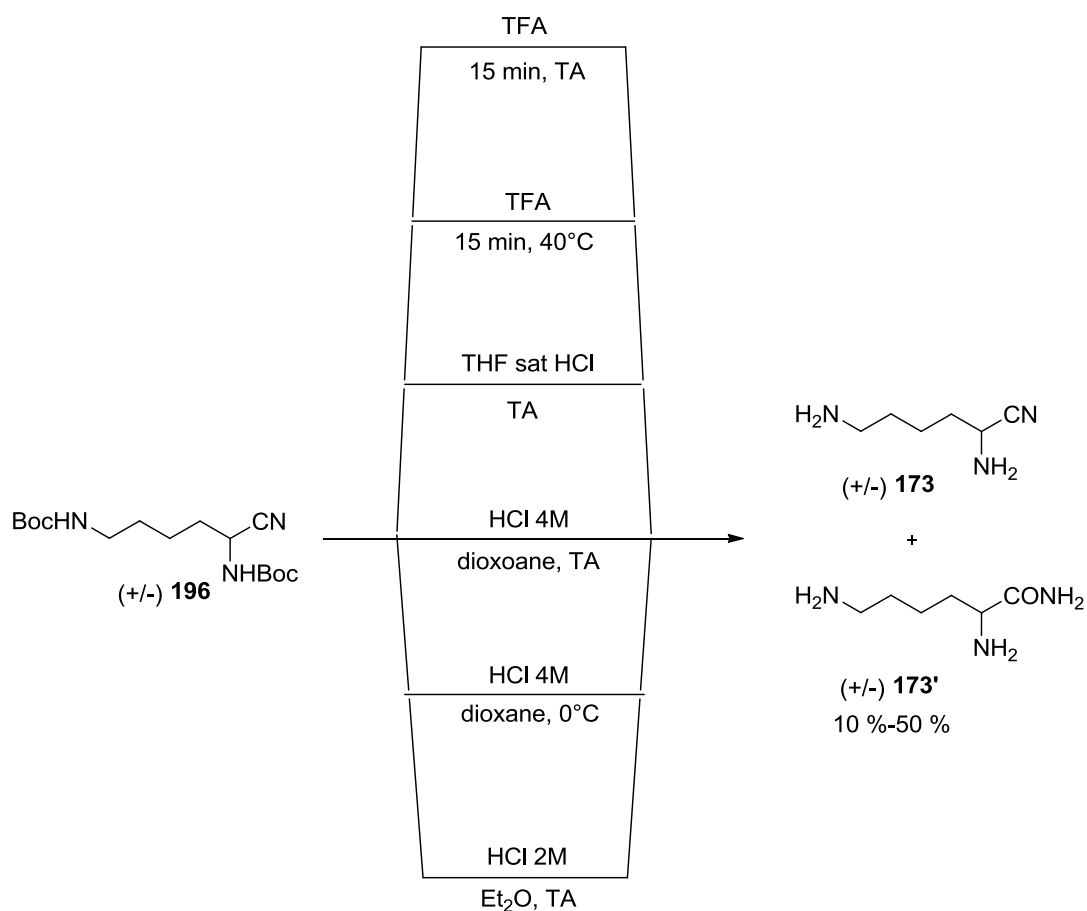
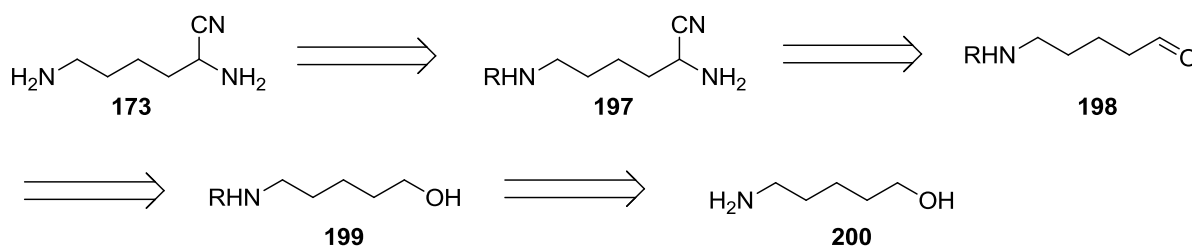


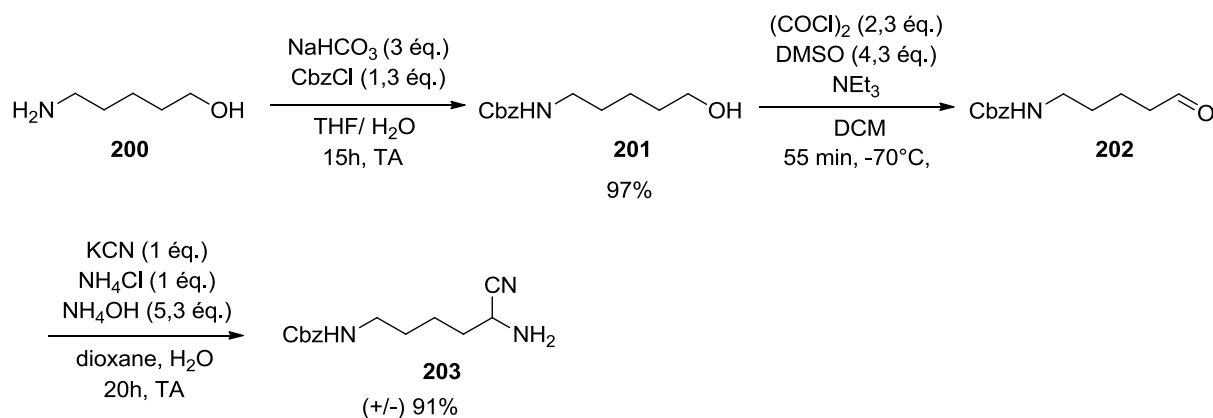
Schéma 65

La présence de l' $\alpha$ -aminoamide **173**' s'explique par l'hydrolyse partielle de la fonction nitrile du produit **173** (fortement hygroscopique) au contact de l'air.

L'instabilité de l' $\alpha$ -aminonitrile **173** sur colonne de silice ne permettant pas de le séparer de l' $\alpha$ -aminoamide **173**' par purification, une autre approche a alors été envisagée par réaction de Strecker (schéma 66).



L'amine du 5-aminopropanol (**200**) a tout d'abord été protégée par un groupement benzyloxycarbonyle selon la méthode de Chatterjee *et al.*<sup>110</sup> pour conduire à l' amino alcool protégé **201** avec 97 % de rendement. L' amino alcool a subi une oxydation de Swern pour donner l'aldéhyde **202**, directement engagé dans les conditions de la réaction de Strecker en milieu aqueux pour conduire à l' $\alpha$ -aminonitrile  $\epsilon$ -N protégé **203** avec 91 % de rendement (schéma 67).



La déprotection de l'amine terminale a, là encore, été problématique et plusieurs conditions expérimentales ont été testées avant d'aboutir au produit désiré **173** (schémas 68 et 69).

<sup>110</sup> Chatterjee M.N., Kay E.R., Leigh D.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 4058-4073.

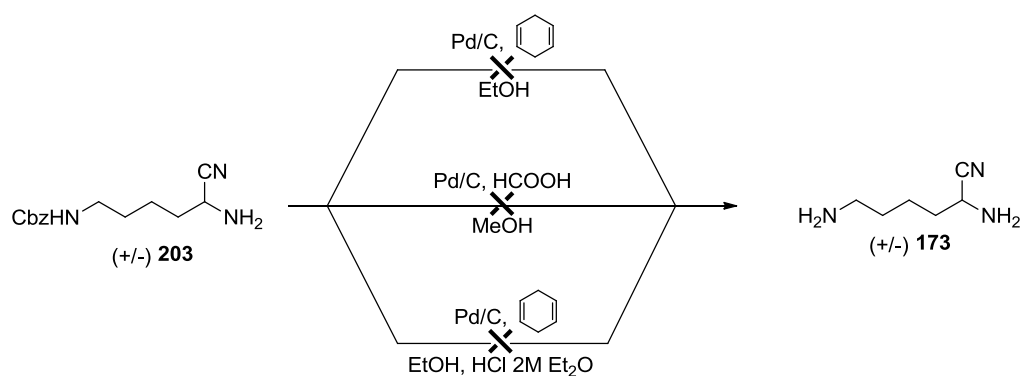


Schéma 68

L'hydrogénolyse avec génération de dihydrogène *in situ* à partir de cyclohexadiène ou d'acide formique, en conditions neutres ou acides, n'a pas permis de transformer le produit de départ **203**.

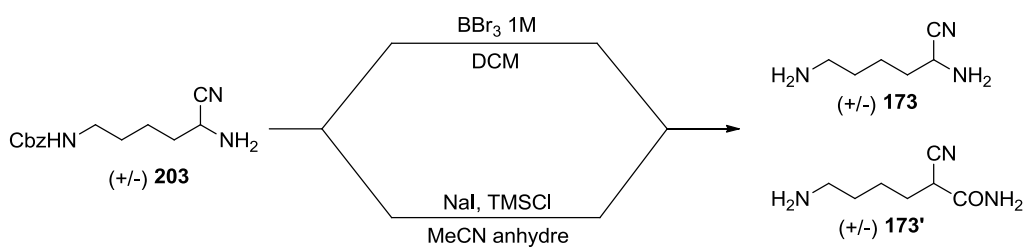


Schéma 69

L'utilisation de tribromure de bore a permis la déprotection de l'amine mais en générant une grande proportion du produit **173'**, difficile à séparer du composé **173** attendu, dans un rapport 1/4. Le produit désiré a finalement été obtenu par action d'iodure de triméthyle silyle généré *in situ*, avec un rendement satisfaisant de 75%.

Une nouvelle synthèse du précurseur de la lysine (**173**) a ainsi été développée en quatre étapes avec un rendement global de 66%.

### II-2.c Synthèse du composé **175**, précurseur de la tyrosine.

La synthèse du précurseur nitrile de la tyrosine a été décrite par Pinder *et al*<sup>111</sup> en 1970 (schéma 70).

<sup>111</sup> Pinder R.M., Burger A., Ariëns E.J., *Arzneimittel Forschung*, **1970**, 20, 245-246.

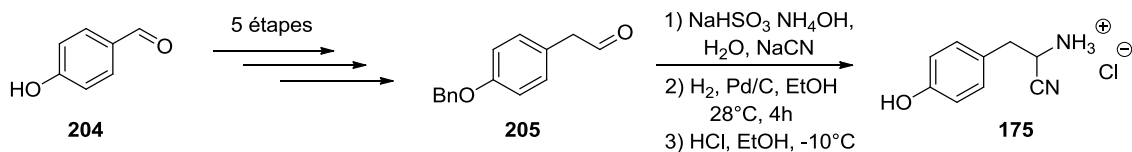


Schéma 70

Pour raccourcir cette synthèse, nous avons tenté de la reproduire sans protection sur le OH aromatique. Après l'oxydation de Parikh-Doering de l'alcool primaire du tyrosol (**206**) décrite par Ōmura *et coll.*<sup>112</sup>, l'aldéhyde **207** obtenu avec un rendement de 70% a été engagé dans la première étape de la réaction de Strecker classique. L' $\alpha$ -aminonitrile **175** est obtenu en mélange avec de très nombreux sous-produits et n'a pas pu être purifié (schéma 71).

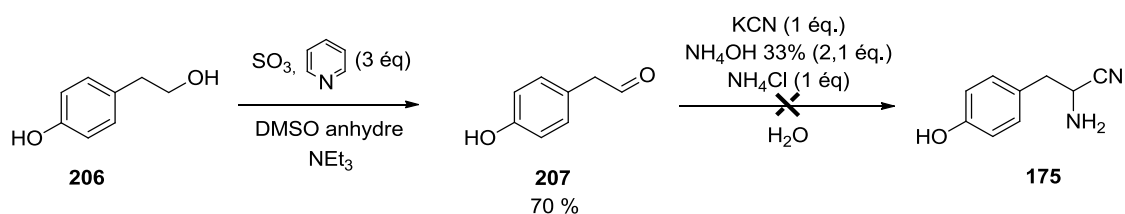


Schéma 71

Nous avons donc repris la synthèse de Pinder *et al.* et protégé le phénol par un benzyle (schéma 72).

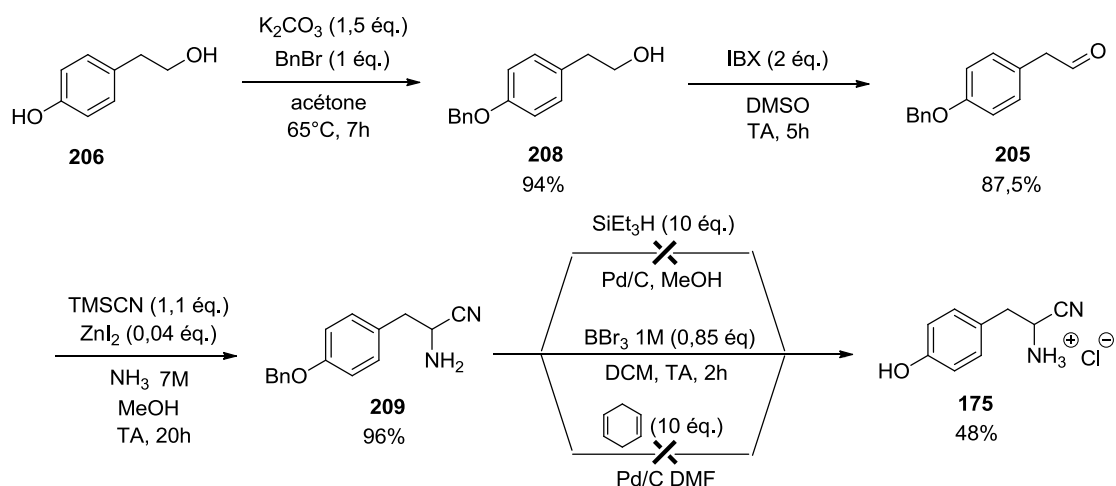


Schéma 72

<sup>112</sup> Hirose T., Sunazuka T., Zhi-Ming T., Handa M., Uchida R., Shiomi K., Harigaya Y., Omura S., *Heterocycles*, **2010**, 53, 777-784.

Après protection de l'alcool phénolique du tyrosol (**206**) par benzylation, le 2-(4-(benzyloxy)phényl)éthanol **208** a été obtenu avec 94 % de rendement. L'oxydation de ce dernier par l'IBX conduit à l'aldéhyde **205** avec 87,5 % de rendement. L'aldéhyde a été directement engagé dans une réaction de Strecker en milieu organique pour donner l' $\alpha$ -aminonitrile correspondant **209** avec un excellent rendement de 96 %. La déprotection de la partie phénol a échoué par hydrogénolyse mais a été possible par traitement par le tribromure de bore. Le précurseur  $\alpha$ -aminonitrile de la tyrosine **175** a ainsi été obtenu avec 48% de rendement. Nous avons ainsi élaboré une nouvelle synthèse de l' $\alpha$ -aminonitrile **175** en quatre étapes avec un rendement global de 38%, bien meilleur que celui obtenu par Pinder *et al.* qui était de 0,04 %.

La synthèse de l'ensemble des  $\alpha$ -aminonitriles non commerciaux a donc été réussie après un important travail de mise au point.

Notre ensemble de substrats une fois obtenu, nous nous sommes consacrés à la mise au point d'un test de détection de l'activité nitrilase sur ces composés.

### III- Recherche d'un test de détection de l'activité nitrilase sur des $\alpha$ -aminonitriles.

Comme nous l'avons déjà dit au début du chapitre, le test de détection de l'activité nitrilase par dosage de l'ammoniaque libérée n'est pas applicable lorsque les substrats sont des  $\alpha$ -aminonitriles à cause de la rétro-réaction d'addition du cyanure et de l'ammoniaque (schéma 73).

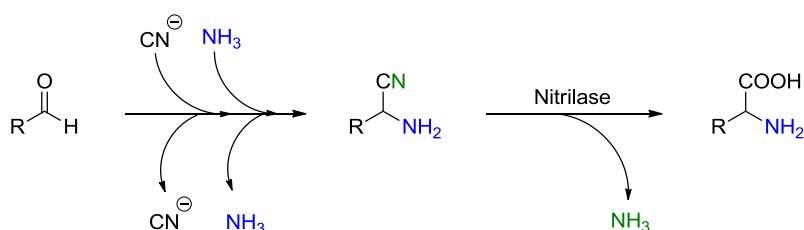


Schéma 73

Plusieurs alternatives sont envisageables : la détection des produits formés, *i.e.* les  $\alpha$ -aminoacides, la détection des produits de départ, les  $\alpha$ -aminonitriles ou un suivi analytique par HPLC ou GC. L'idéal serait de disposer d'un test sensible et rapide étant donné le nombre de nitrilases candidates à tester sur les  $\alpha$ -aminonitriles ( $588 \times 6 = 3528$  tests, soit 7 plaques 96

puits). Nous avons tout d'abord opté pour la détection du produit d'arrivée, car plusieurs méthodes de détection de la formation d'acide carboxylique sont publiées dans la littérature.

Dans un premier temps, nous avons envisagé un simple test colorimétrique au Bleu de BromoThymol (BBT) détectant le changement de pH dû à l'apparition de l'acide carboxylique. Malheureusement, comme nous l'avons observé dans le chapitre II, l'excès d'acide avec les substrats salifiés perturbait le test. De plus, la réaction de rétro-Strecker perturbe également le test car l'ammoniaque libérée basifie le milieu réactionnel.

De nombreux tests spectrophotométriques ont été développés pour la détection d'un  $\alpha$ -aminoacide, la plupart d'entre eux sont fluorimétriques.

Parmi les exemples trouvés dans la littérature on trouve l'utilisation d'agents comme la ninhydrine (**210**) (associée parfois à différents additifs)<sup>113</sup> ou la génipine<sup>114</sup> (**212**), qui forment des composés colorés absorbant à une longueur d'onde spécifique (schéma 74).

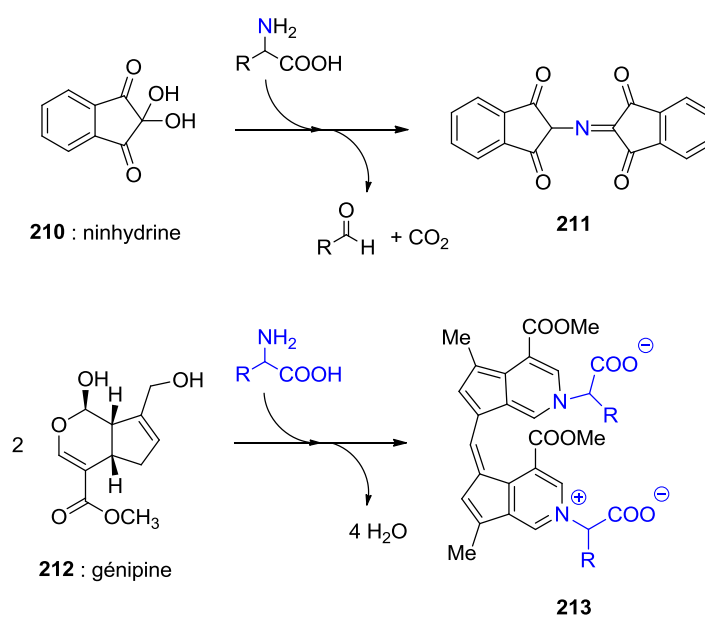


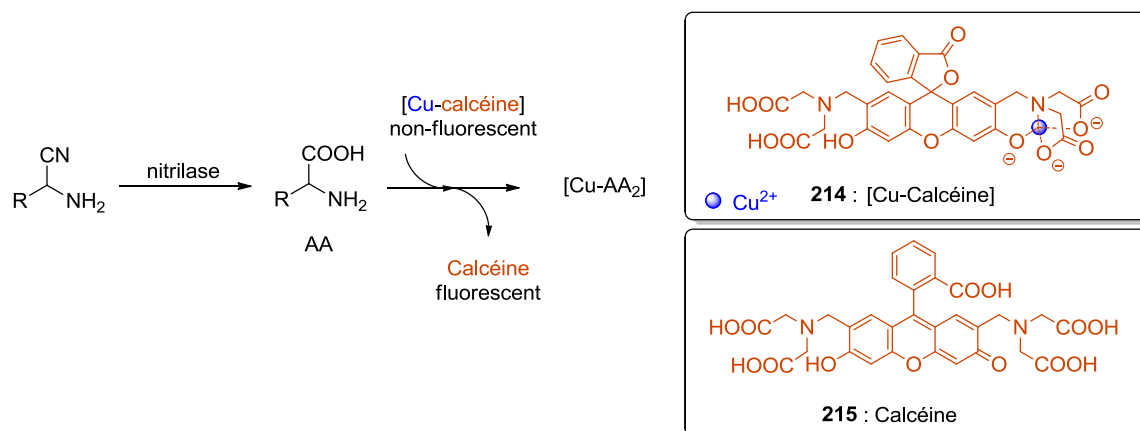
Schéma 74

Ces tests colorimétriques, d'une grande sensibilité, n'ont pas été testés et adaptés pour le criblage des activités nitrilase car l'ammoniaque libérée lors de l'hydrolyse enzymatique peut également former un adduit.

<sup>113</sup> Moore S., Stein W., *J. Biol. Chem.*, **1954**, 211, 907-913.

<sup>114</sup> Lee. S.W., Lim J.M., Bhoo S.H., Paik Y.S., Hahn T.R., *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 480, 267-274.

Dans une première approche, nous avons essayé de mettre au point un test fluorimétrique en utilisant un complexe de cuivre ligandé par la calcéine<sup>115</sup> (**215**) (schéma 75).



L'acide aminé formé se complexue au cuivre via un échange de ligand ce qui conduit à la libération de la calcéine. La concentration en calcéine libérée dosée par fluorimétrie est proportionnelle à la concentration en acide aminé formé.

La faisabilité de la méthode a été vérifiée avec la valine (10 mM) en présence de calcéine (0,1 μM) et de cuivre II (0,1 μM). Dans un premier temps, nous n'avons testé qu'en présence de calcéine et de cuivre II, tous deux à 0,1 μM, l'α-aminonitrile (10 mM) ne se complexait pas au cuivre. Cependant, en ajoutant en quantité équimolaire l'α-aminoacide et l'α-aminonitrile (5 mM), en présence de 0,1 μM de calcéine et de cuivre, un nouveau complexe s'est formé. La cinétique variable de formation de ce complexe nous a conduit à abandonner ce test fluorimétrique.

Nous avons donc recherché dans la littérature un autre test spectrophotométrique utilisant le même principe de complexation cuivre-α-aminoacide et dosable directement par spectrophotométrie. Li *et al.*<sup>116</sup> ont décrit un système semblable utilisant le chromophore **216** de structure proche de la calcéine, dérivé de la rhodamine B (**217**) (figure 20).

<sup>115</sup> Dean K.E.S., Klein G., Renaudet O., Reymond J.L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 1653-1656.

<sup>116</sup> Li Z., Qin J., Zhang L., Lou X., *Langmuir Lett.*, **2010**, 26, 1566-1569.



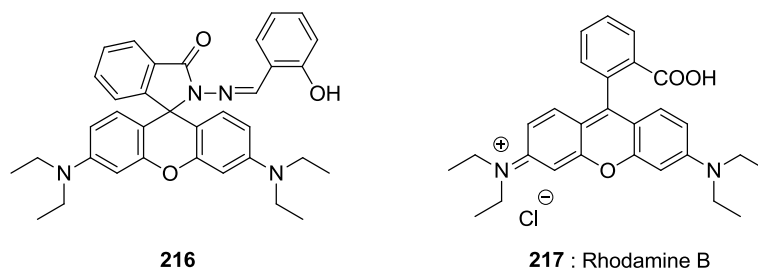


Figure 20

Mais vu les problèmes rencontrés avec la calcéine, ce test n'aurait pas fonctionné pour les mêmes raisons. Nous nous sommes alors inspirés de la réaction du Biuret connue pour le dosage des protéines, ainsi que des travaux de Duchateau *et al.*<sup>117</sup> qui avaient mis au point un test de détection basé sur la complexation d' $\alpha$ -aminoamides et d' $\alpha$ -aminoacides avec du cuivre II, et ce, en travaillant sans chromophore et dans des gammes de concentrations de l'ordre du mM.

### ***III-1 Détection d' $\alpha$ -aminoacides par complexation au cuivre II.***

Le test spectrophotométrique devait remplir deux conditions : être réalisable en plaque 96 puits et donner un accès rapide à la conversion. Le principe du test est de coordonner deux  $\alpha$ -aminoacides sur un complexe de cuivre soluble en milieu aqueux afin d'obtenir un nouveau complexe  $\alpha$ -aminoacide-cuivre émettant à une longueur d'onde  $\lambda$  maximale bien différente du complexe de cuivre initial.

#### ***III-1.a Mise au point du test.***

Le test décrit par Duchateau *et al.*<sup>117</sup> a été mis au point pour la détection d'une activité enzymatique amidase sur des  $\alpha$ -aminoamides. En milieu basique, le cuivre (II) se complexe aussi bien à l' $\alpha$ -aminoamide qu'à l' $\alpha$ -aminoacide mais les longueurs d'onde d'absorbance sont différentes ce qui permet donc de détecter l'activité enzymatique en suivant l'apparition du complexe  $\alpha$ -aminoacide-cuivre (II) à 640 nm (schéma 76).

<sup>117</sup> Duchateau A.L.L., Hillemans-Crombach M.G., Dujnhoven A.V., Reiss R., Sonke T., *Anal. Biochem.*, **2004**, 330, 362-364.

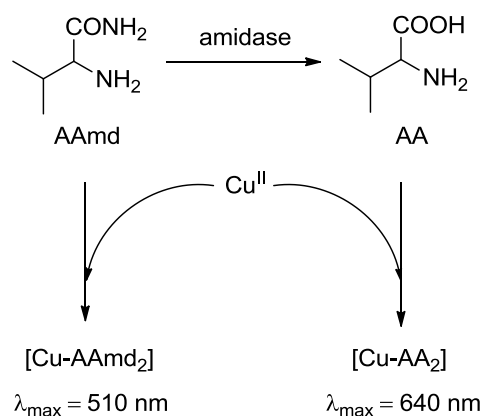


Schéma 76

Il nous a semblé que ce test pouvait convenir pour l'étude de l'activité nitrilase car la réaction étudiée par Duchateau et la nôtre sont très similaires. Nous avons donc travaillé à l'adaptation du test à nos conditions. La première difficulté rencontrée est liée à notre substrat ; si l' $\alpha$ -aminoamide se complexait au cuivre II, ce n'est pas le cas de l' $\alpha$ -aminonitrile, ce qui dans les conditions basiques du test a entraîné la précipitation du cuivre sous forme d'hydroxyde de cuivre ( $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ). Nous nous sommes alors placés à pH acide, ce qui a permis d'éviter la formation de ce complexe. Une gamme étalon simulant des conversions en valine en présence de son  $\alpha$ -aminonitrile correspondant a permis d'observer une variation linéaire de  $\lambda_{\text{max}}$  en fonction de la conversion avec une détection sensible de l'ordre du mM. Il était nécessaire d'être à pH proche de 5 vu qu'à pH supérieur à 6 le cuivre précipitait. Cependant à pH 5, l'activité nitrilase risquait d'être fortement diminuée. La réaction enzymatique effectuée à pH 7,3, nous aurions pu réaliser le test colorimétrique en milieu acide après la réaction enzymatique. Cependant, la libération d'ammoniaque étant variable d'une réaction à l'autre, la conversion n'aurait pas été correctement estimée puisque la lecture de la D.O est fonction du pH et que celui-ci peut varier en fonction de la quantité d'ammoniaque formée. L'autre solution aurait été de se placer à pH très acide pour éviter toute variabilité du pH, occasionnée par la libération d'ammoniaque, mais dans ces gammes de pH, la sensibilité était trop faible pour évaluer la conversion.

Au vu de ces problèmes, nous avons donc décidé de rechercher une méthode capable de piéger les ions  $\text{Cu}^{2+}$  en milieu alcalin pour travailler dans une gamme de pH moins acides. Nous nous sommes orientés vers la méthode du Biuret connue pour doser des protéines en milieu alcalin à l'aide de cuivre II complexé par le citrate (schéma 77).

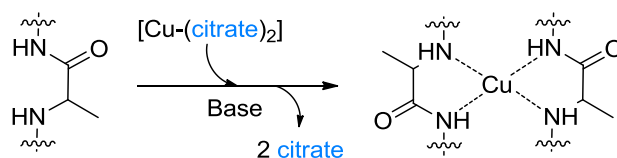


Schéma 77

Ce test colorimétrique est basé sur la complexation des ions cuivre par les amines des liaisons peptidiques générant un complexe de couleur violet détectable à une longueur d'onde  $\lambda$  de 540 nm. Nous avons adapté ce test pour doser les  $\alpha$ -aminoacides. En absence d' $\alpha$ -aminoacides, le cuivre coordonné par deux molécules de citrate se trouve ainsi soluble en condition alcaline et ne précipite donc pas (schéma 78).

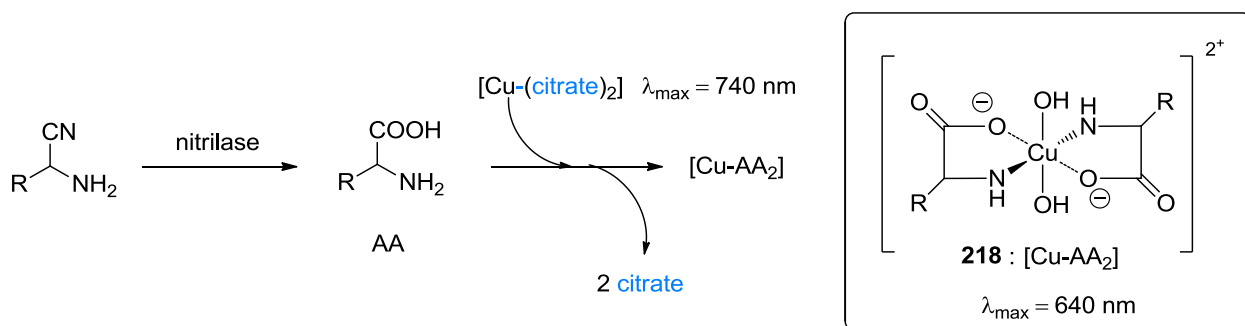


Schéma 78

Des études ont tout d'abord été réalisées sur la valine. La formation du complexe [cuivre-(citrate)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> soluble dans un tampon Borax à pH = 9,7 a été détectée avec un  $\lambda_{\max}$  de 740 nm tandis que le complexe [cuivre-(valine)<sub>2</sub>] a été détecté à un  $\lambda_{\max}$  de 640 nm. Après soustraction de deux courbes illustrant les propriétés d'absorption des deux complexes, la variation de D.O maximale de 0,3 a été obtenue pour une longueur d'onde  $\lambda$  de 595 nm en travaillant à une concentration en valine de 60 mM. Cette concentration en  $\alpha$ -aminoacide est assez élevée mais nécessaire puisque à 10mM la variation de D.O maximale n'était que de 0,13 (sensibilité trop faible) (schéma 79).

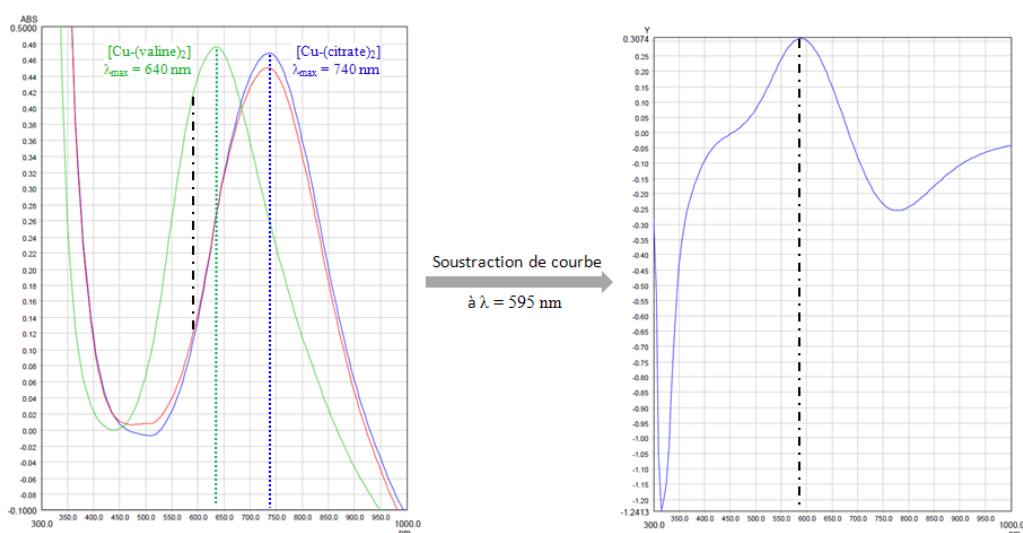


Schéma 79

L'influence de l'ammoniaque, libérée lors de la réaction de rétro Strecker de l' $\alpha$ -aminonitrile, sur le test de détection était nulle quand celle-ci était simulée à 50%, cependant une rétro réaction totale a montré une légère perte de sensibilité estimée à 20 %. Des gammes étalon ont ensuite été réalisées en plaque 96 puits, la sensibilité du test a pu être évaluée à 6 mM ce qui correspondrait à une conversion de 10%, et ce pour l'ensemble des  $\alpha$ -aminoacides étudiés. Cependant les  $\alpha$ -aminonitriles **175** et **81** à 60 mM étant peu solubles en milieu aqueux, la lecture au spectrophotomètre était difficile, nous avons donc décidé de faire une détection à l'œil nu.

### III-1.b Résultats.

Un criblage a tout d'abord été réalisé sur les nitrilases de la plaque NIT-4 et NIT-5 (Cf. chapitre II). Une lecture à l'œil nu a permis de détecter une activité nitrilase (NIT-4-B06) sur le précurseur nitrile de la phénylglycine. Aucune autre activité n'a été mise en évidence avec ce test colorimétrique. Nous étions déçus par ce résultat et bien sûr, si nous ne pouvons exclure l'absence de l'activité recherchée, nous nous sommes interrogés sur la sensibilité et la fiabilité de notre test. Nous pensons que le test n'est pas assez sensible dans les conditions opératoires du criblage. Ceci notamment à cause d'une conversion détectable à partir de 6 mM en  $\alpha$ -aminoacide (soit un test sensible à partir de 10 % de conversion), or il est fort probable que la réaction enzymatique n'ait pas excédé cette conversion lors du criblage. C'est pourquoi ce test, dans nos conditions de criblage, est sûrement à proscrire pour la détection de faibles activités nitrilases mais reste peut être utilisable pour détecter de très fortes activités. Une

autre alternative a donc été envisagée. La possibilité d'utiliser des méthodes chromatographiques comme l'HPLC a donc été revue. Étant donné la chronophagie de ce type de méthode, nous avons voulu utiliser au maximum ses potentialités et donc obtenir l'information sur l'énantiospécificité de la réaction étudiée ainsi que sa conversion.

### **III-2 Mise au point d'un test à haut débit par LC-MS.**

L'analyse par chromatographie liquide couplée à la masse, LC-MS, est très fine et permet d'accéder non seulement à la conversion  $\alpha$ -aminonitrile en  $\alpha$ -aminoacide mais aussi à la stéréospécificité de la transformation, soit en utilisant une colonne chirale, soit avec une colonne achirale après dérivatisation chimique des composés à analyser avec une copule chirale (schéma 80).

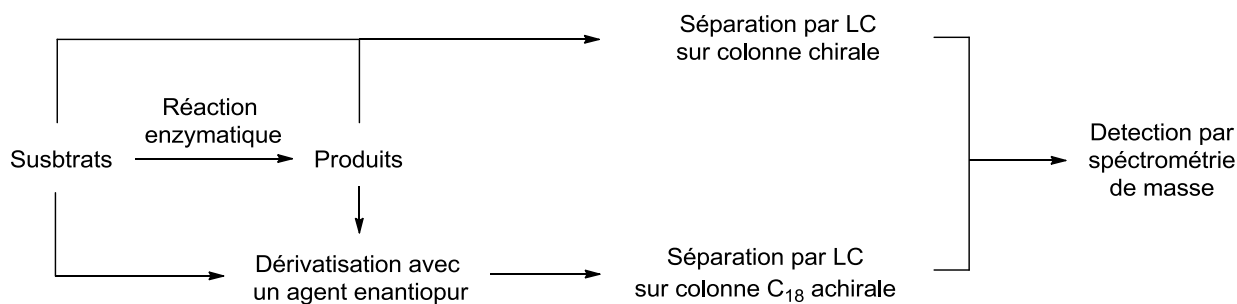


Schéma 80

Nous avons choisi la deuxième méthode pour des raisons de commodité, en effet les colonnes chirales sont peu robustes, en général peu tolérantes à l'eau, et retiennent peu ou pas les composés très polaires type acides aminés. Elles sont donc peu adaptées à l'injection de centaines d'échantillons aqueux de composés variés polaires (notre milieu contient des tampons, des traces possibles de lysats cellulaires, les  $\alpha$ -aminonitriles et  $\alpha$ -aminoacides).

#### **III-2.a Choix de l'agent dérivatisant.**

Il existe un nombre important d'agents de dérivatisation chiraux pour les  $\alpha$ -aminoacides<sup>118</sup>. L'agent choisi doit dérivatiser à la fois l' $\alpha$ -aminonitrile et l' $\alpha$ -aminoacide et donc agir sur la fonction amine, commune aux deux composés. Les conditions réactionnelles doivent être douces, pH neutre et température ambiante, pour limiter la réaction de rétro Strecker de l' $\alpha$ -aminonitrile, et si possible la réaction doit être rapide et totale. Le réactif de Marfey

<sup>118</sup> Péter A., Berkecz R., Ilisz I., *J. Phar. Biomed. Anal.*, **2008**, 47, 1-15.

((*S*)-2-((5-fluoro-2,4-dinitrophényl)amino)propanamide, FDAA) (**219**) (figure 21), classiquement utilisé pour la dérivation d' $\alpha$ -aminoacides n'a pas été choisi car la dérivation nécessitait des conditions trop drastiques pour dériver l' $\alpha$ -aminonitrile sans provoquer la rétro-Strecker.

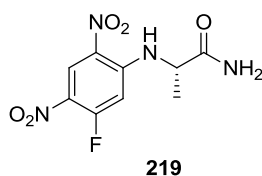


Figure 21

Dans un premier temps, nous avons donc testé le couple OPA (**164**) (*o*-phthaldialdéhyde)/NAC (**221**) (*N*-acétylcystéine) permettant la dérivation de la fonction amine (figure 22).

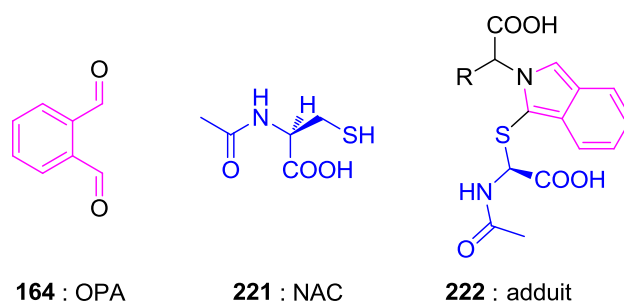


Figure 22

Les substrats et produits type **222** de la réaction ont été dérivatisés et leur stabilité étudiée, les études HPLC ont montré que l'acide glutamique dérivatisé était instable au cours du temps, empêchant la réalisation d'une gamme étalon. Cet agent de dérivation a donc été abandonné. Notre choix s'est ensuite porté sur le (*S*)-2-méthoxyéthyl 2-(((4-nitrophénoxy)carbonyl)amino)-3-phénylpropanoate (*S*-NIFE) (**223**), un agent utilisé par Péter *et al.* pour la dérivation d' $\alpha$ -aminoacides protéinogènes<sup>119</sup> et d' $\alpha$ -aminoacides porteurs d'une amine secondaire<sup>120</sup> (schéma 81).

<sup>119</sup> Péter A., Vékes E., Török G., *Chromatographia*, **2000**, 52, 821-826.

<sup>120</sup> Péter A., Vékes E., Tóth G., Tourwé D., Borremans F.I., *J. Chrom. A*, **2002**, 948, 283-294.

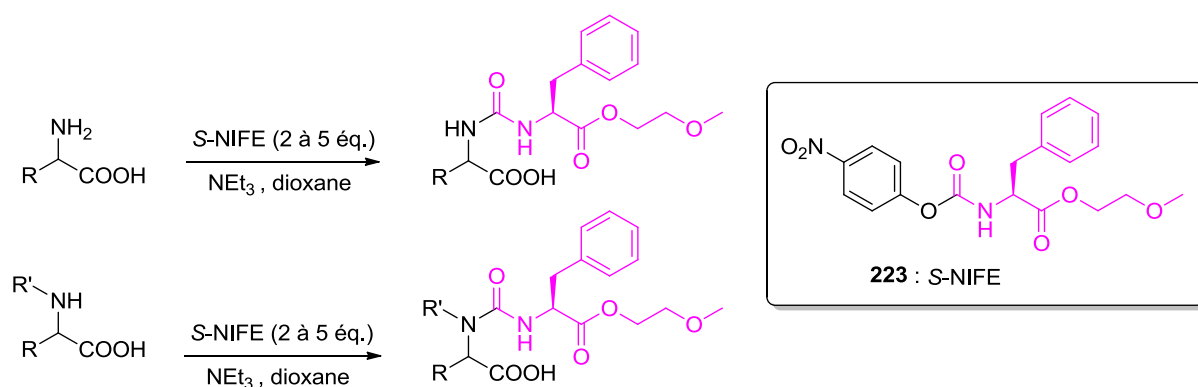


Schéma 81

Nous avons adapté les conditions opératoires de dérivatisation en travaillant à pH 7,3, même si la dérivatisation est moins efficace, elle est largement suffisante pour détecter les produits dérivatisés en spectrométrie de masse. L'inconvénient de la méthode est la formation de sous-produits, le *p*-nitrophénol (**224**), la phénylalanine méthoxyéthyl ester (**226**) et l'urée **227** formée par dimérisation du (*S*)-NIFE (**223**) (schéma 82).

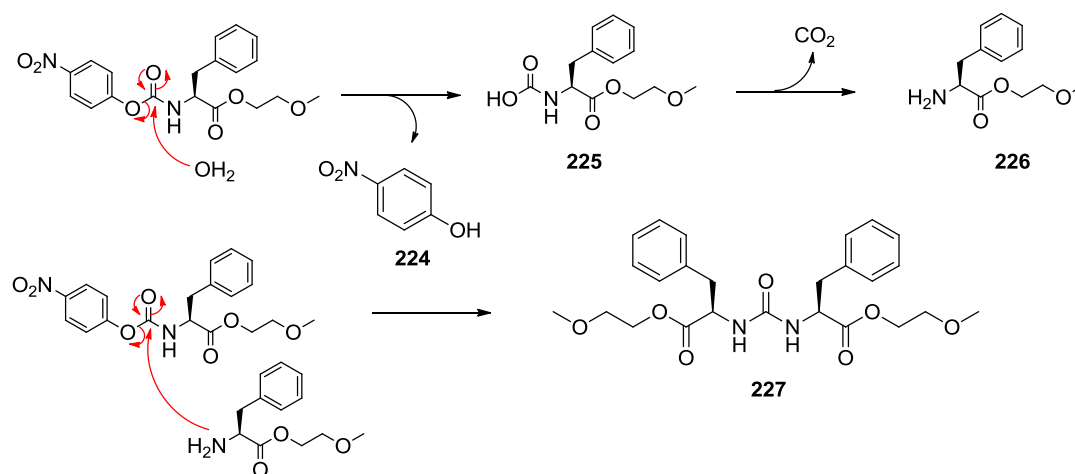


Schéma 82

Les paramètres de la réaction ont été optimisés sur l'acide glutamique et son  $\alpha$ -aminonitrile correspondant : température ambiante, 2 équivalents de *S*-NIFE sauf dans le cas du précurseur  $\alpha$ -aminonitrile de la lysine pour lequel il est nécessaire d'avoir 5 équivalents, pH = 7,3, temps de dérivatisation : 20 minutes.

Les conditions retenues ont ainsi été extrapolées pour les autres  $\alpha$ -aminonitriles et  $\alpha$ -aminoacides.

### ***III-2.b Description du système LC-MS utilisé.***

Le système LC-MS adapté à des injections sur plaques disponible au Genoscope est équipé d'un spectrophotomètre de type Triple Quadripole (AB SCIEX QTRAP 5500) disposant de la technique MRM (Multiple Response Monitoring) qui est d'une grande fiabilité pour réaliser des analyses à haut débit. Elle permet de sélectionner plusieurs ions parents de charge  $m/z$  dans le premier quadripôle Q1 afin qu'ils soient envoyés dans une chambre de collision Q2 pour y être fragmentés en ions fils spécifiques des ions parents. Ces ions sont ensuite détectés dans un analyseur Q3 et les données sont traitées informatiquement (schéma 83). La partie chromatographie dispose de deux positions colonnes ce qui permet un fonctionnement en tandem (lorsque l'une injecte, l'autre est lavée), et donc un important gain de temps.

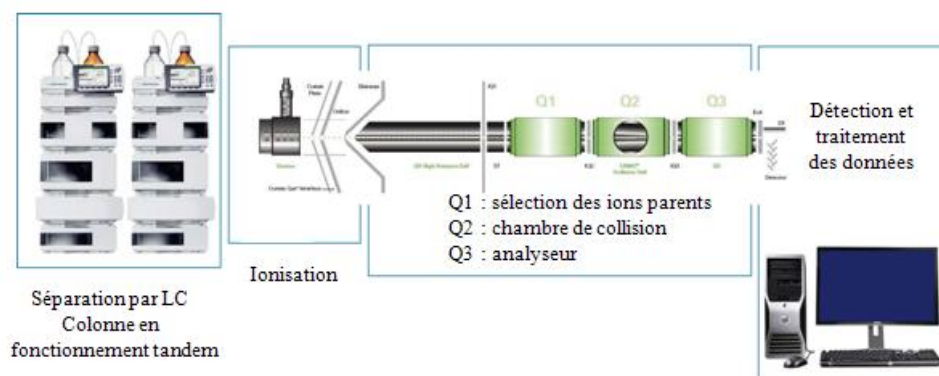


Schéma 83

### ***III-2.c Mise au point du criblage à haut débit.***

Afin d'optimiser au mieux le temps machine lors de l'analyse, nous avons regroupé les substrats pour l'analyse, en deux lots de trois, précurseurs  $\alpha$ -aminonitriles de la lysine, la tyrosine et la norvaline (mélange 1) d'une part, de l'acide glutamique, de la phénylglycine et de la valine (mélange 2) d'autre part. Dans un premier temps, nous avons cherché les conditions optimales de séparation pour les deux groupes. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Laboratoire de Génomique et de Biochimie du Métabolisme (LGBM) du Genoscope par Sabine Tricot et Ekaterina Dariy.

Deux types d'échantillons ont été préparés. Dans le premier, le mélange 1 et les acides aminés correspondant sous forme racémique, dans le second, le mélange 2 et les acides aminés



correspondant sous forme racémique. La colonne utilisée est une Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> 1.7  $\mu$ m, 2.1\*100 mm de chez Waters, l'éluant est MeCN/H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, le gradient utilisé est donné en partie expérimentale. Les chromatogrammes sont présentés dans la figure 23 où le code universel à une lettre a été utilisé pour nommer les acides aminés.

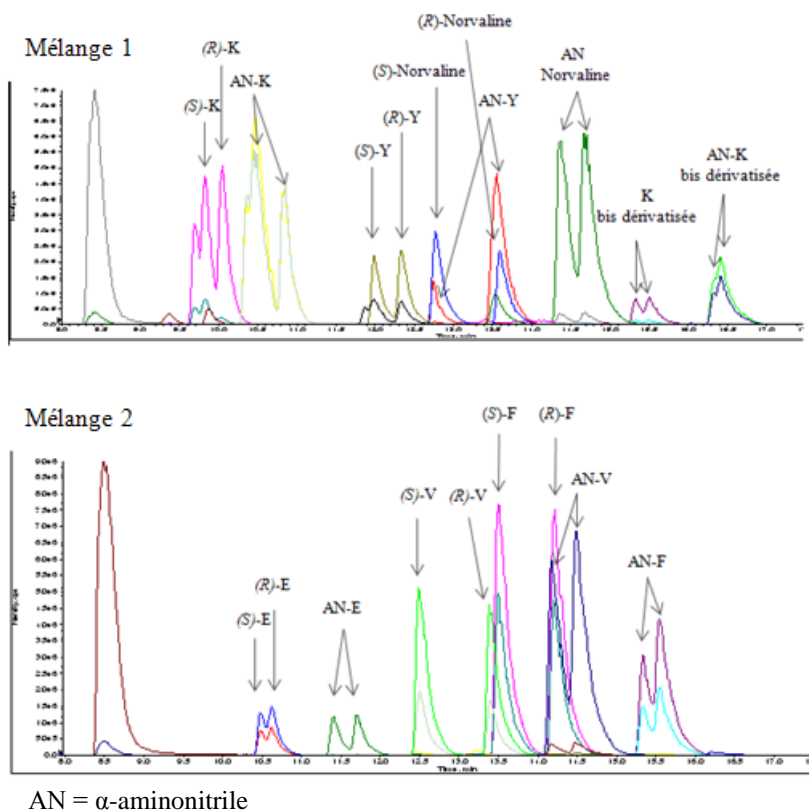


Figure 23

La détection de l'ion fils caractéristique de l'ion parent a été rajoutée sur les chromatogrammes, c'est pourquoi on voit des pics secondaires sous les pics principaux. Ceci permet de confirmer la caractérisation des ions détectés. Tous les pics des  $\alpha$ -aminoacides ont été identifiés par comparaison avec l'injection de standards  $\alpha$ -aminoacides *R* et *S* sous forme énantiopurs et dérivatisés. Nous avons cherché à détecter par cette méthode l'activité nitrile hydratase et l'analyse des  $\alpha$ -aminoamides a également été mise au point avec ces composés dérivatisés selon le même protocole. Une fois les conditions de séparation LC et de détection MS mises au point, nous avons décidé de valider cette méthode de suivi en réalisant la réaction catalysée par la protéine NIT-4-B06 qui s'était révélée active lors de notre test précédent au cuivre. L'enzyme avait montré une activité sur la transformation du précurseur  $\alpha$ -aminonitrile de la phénylglycine. Nous avons donc mis en réaction à 30 °C pendant 4h dans un tampon phosphate 50 mM à pH = 7,3, séparément les précurseurs  $\alpha$ -aminonitrile de la

phénylglycine (10 mM), de l'acide glutamique (10 mM) et de la valine (10 mM) en utilisant à la fois la protéine NIT-4-B06 purifiée (0,05 mg/mL) et sous forme de lysat cellulaire (0,05 mg/mL) pour être dans les conditions du criblage. Les trois réactions enzymatiques ont été combinées pour donner le mélange 1 comme expliqué précédemment. Le mélange a été dérivatisé selon les conditions précédemment décrites puis injecté en LC-MS selon les conditions optimisées. Les chromatogrammes obtenus du signal masse de chaque composé sont présentés en figure 24.

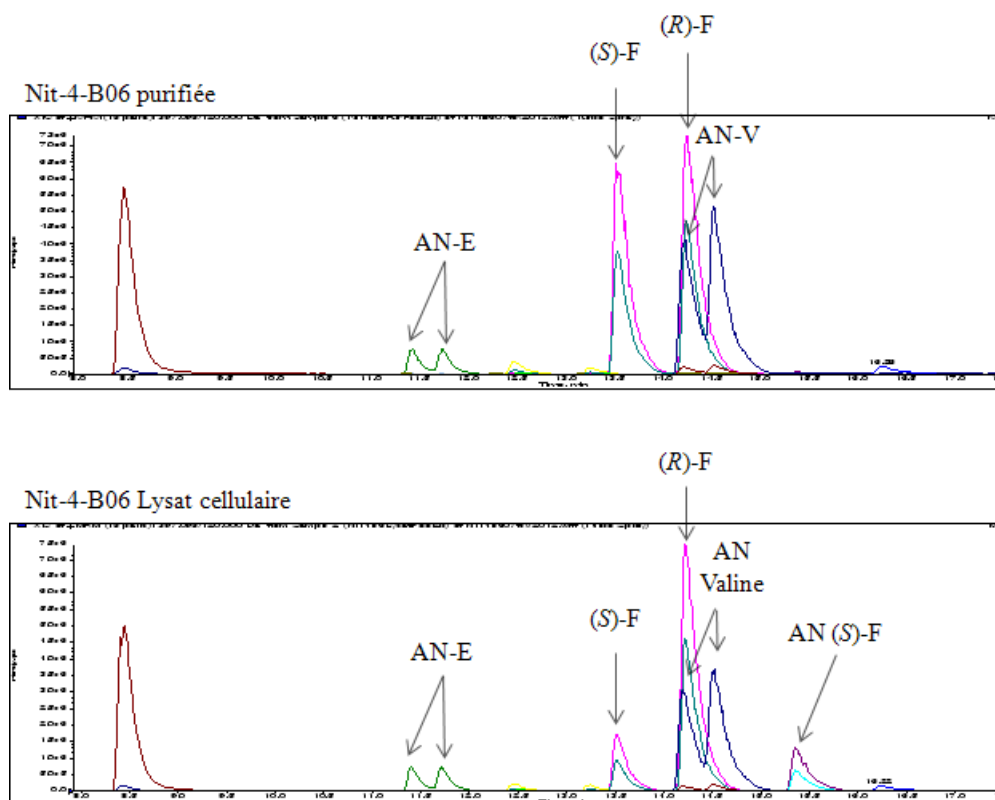


Figure 24

Comme attendu, nous observons la disparition du précurseur  $\alpha$ -aminonitrile de la phénylglycine avec le lysat cellulaire et avec la protéine purifiée. L'activité est plus importante sur enzyme purifiée qu'avec le lysat ce qui était cohérent avec les quantités d'enzymes utilisées. La réaction n'est pas énantiospécifique et avec le lysat, la conversion étant incomplète, on voit la formation prépondérante de la (S)-phénylglycine et donc la disparition du pic correspondant du (S)- $\alpha$ -aminonitrile. La NIT-4-B06 n'a pas montré d'activité sur les autres  $\alpha$ -aminonitriles de ce mélange, à savoir le précurseur  $\alpha$ -aminonitrile de l'acide glutamique et de la valine.

Le test de la NIT-4-B06 sur les substrats du mélange 1 et leur analyse nous ont servi de preuve de concept et ont permis de vérifier l'aspect qualitatif de la détection. Comme nous l'avons expliqué plus haut, un des avantages de l'analyse en LC-MS est de permettre une mesure quantitative. Pour cela nous avons réalisé des gammes étalon. Des solutions d' $\alpha$ -aminoacides et d' $\alpha$ -aminonitriles ont été mélangées pour mimer des conversions théoriques (0%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%) en respectant exactement les conditions réactionnelles, c'est-à-dire en prenant soin d'avoir une concentration finale de 10 mM pour le mélange  $\alpha$ -aminoacide/ $\alpha$ -aminonitrile. Afin de mimer les conditions du milieu enzymatique les gammes étalon ont été réalisées en présence de lysat cellulaire (PET22) (figure 25).

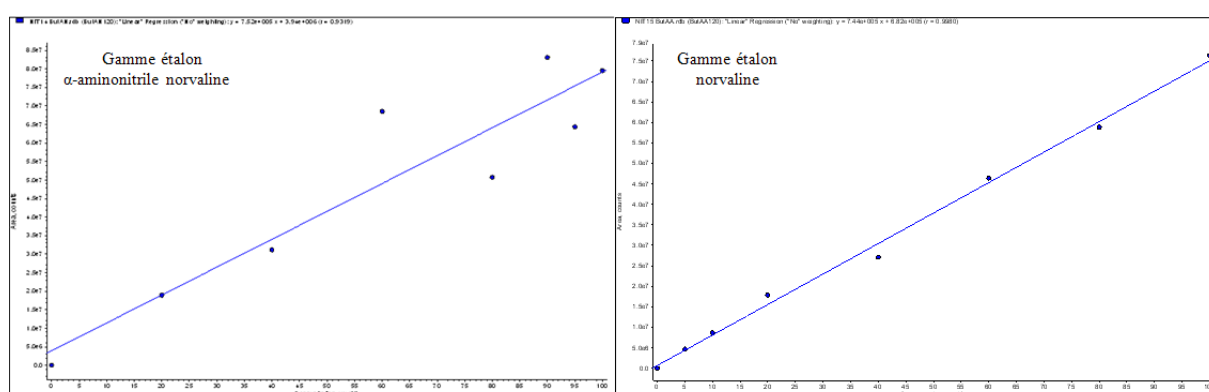


Figure 25

Dans l'ensemble, les 12 gammes étalon ont présenté de bons, voire très bons, coefficients de régression linéaire  $R^2$  (entre 0,84 et 0,99) ou régression quadratique  $R$  (entre 0,99 et 0,98). Nous avons pu constater que certaines courbes ne passaient pas par zéro ; ceci s'explique par la présence de traces de certains acides aminés dans le milieu du lysat cellulaire et d'un effet machine récurrent.

Les coefficients de régression linéaire et quadratique étant dans l'ensemble très satisfaisants, les gammes étalon ont été validées. Nous sommes donc passés au criblage à haut débit.

### ***III-2.d Mode opératoire du criblage à haut débit.***

Les 588 nitrilases sous forme de lysat ont été réparties dans sept plaques 96 puits (NIT-4, NIT-5, NIT-6, NIT-7, NIT-8, NIT-14, NIT-15). Chacun des six  $\alpha$ -aminonitriles a été testé sur l'ensemble des nitrilases pour réaliser 3528 tests enzymatiques. La procédure du criblage a été la suivante. Deux plaques (ex: NIT-4 et NIT-5) ont été criblées indépendamment sur trois  $\alpha$ -aminonitriles appartenant à un même mélange.

Pour une réaction enzymatique réalisée dans un volume total de 50  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$  d'une solution d' $\alpha$ -aminonitrile (100 mM dans le méthanol), 0,5  $\mu\text{L}$  de DTT (1M), 2,5  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate (1M, pH=7,3), 39  $\mu\text{L}$  d'eau sont ajoutés par pipette multicanaux. La réaction est déclenchée par addition de 3  $\mu\text{L}$  de lysat d'une concentration finale moyenne de 0,05 mg/mL.

Après incubation pendant quatre heures dans une étuve à 30°C, les milieux enzymatiques ont été acidifiés par ajout de 3,5  $\mu\text{L}$  d'une solution de TFA 25 % dans l'eau. Les milieux réactionnels ont été vortexés et centrifugés pour faire précipiter l'enzyme puis le surnageant (40  $\mu\text{L}$ ) a été prélevé et déposé dans deux plaques filles.

Une étape de basification a été réalisée par ajout de 3 $\mu\text{L}$  d'une solution de carbonate de potassium (2,5 M) pour rétablir le pH à 7,3.

La dérivation a été réalisée par ajout de 16  $\mu\text{L}$  de *S*-NIFE (20 ou 50 mg/mL d'acétonitrile) puis la réaction a été laissée 20 minutes à TA sous agitation.

2  $\mu\text{L}$  de chacun des puits de chacune des trois plaques ont été prélevés et disposés dans une plaque fille avec une pipette multicanaux puis 194  $\mu\text{L}$  d'une solution de TFA 0,01% dans l'eau ont été ajoutés pour réaliser une dilution au 100<sup>ème</sup>.

La plaque fille a été analysée par LC-MS.

La même opération a été réalisée avec les substrats du mélange 2 sur les mêmes plaques nitrilases (schéma 84).

L'ensemble du procédé a été réalisé pour les plaques NIT-6/ NIT-7, NIT-8/ NIT-14 et NIT-15 pour chacun des mélanges en prenant soin d'analyser les gammes étalons avant l'analyse des réactions enzymatiques.

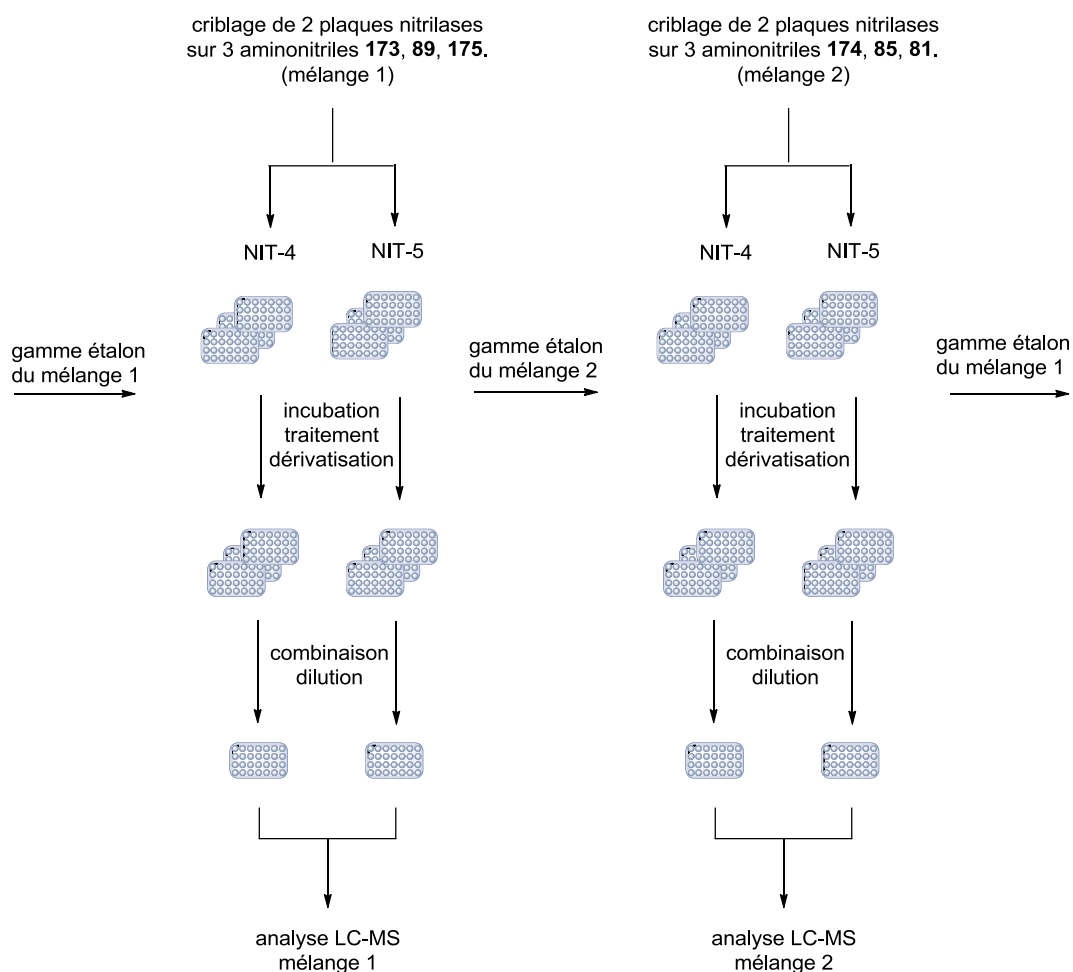


Schéma 84

L'étape finale de combinaison et de dilution pour l'analyse LC-MS a permis de diviser le temps d'analyse par trois et seulement 14 plaques ont été analysées au total au lieu de 42. Avec un temps machine de 24 heures par plaque, l'analyse complète du criblage a donc duré approximativement trois semaines en comptant le passage des gammes étalon qui ont été injectées toutes les deux plaques pour s'assurer de la stabilité des  $\alpha$ -aminonitriles et des  $\alpha$ -aminoacides. Malgré la conservation des gammes étalon à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , certaines d'entre elles ont montré des signes de dégradation. C'est notamment le cas de toutes les gammes étalon des  $\alpha$ -aminonitriles dérivatisés. En revanche, les gammes étalon des  $\alpha$ -aminoacides dérivatisés se sont avérées stables tout au long du criblage avec une légère baisse de sensibilité sur la phénylglycine et la valine dérivatisée ce qui a pu engendrer une légère surestimation des résultats. Nous avons donc pu tout de même mesurer les taux de conversion et évaluer les excès énantiomériques à partir de la gamme étalon des  $\alpha$ -aminoacides.

#### IV- Résultats et sélection des nitrilases actives.

Les résultats du criblage n'ont pas donné ce que nous espérons puisque seulement deux substrats ont été transformés et neuf activités  $\alpha$ -aminonitrilase ont été détectées. Les deux substrats sont le précurseur  $\alpha$ -aminonitrile de la phénylglycine et celui de la norvaline. Les taux de conversion sont très faibles, à la limite de détection, et les excès énantiomériques de faibles à excellents aux taux de conversion mesurés dans les conditions du criblage. Aucun amide n'a été détecté ce qui signifie qu'aucune des 588 protéines candidates ne présentent d'activité nitrile hydratase sur nos substrats.

La figure suivante illustre deux cas extrêmes, l'un de conversion avec un excellent excès énantiomérique avec obtention de la L-norvaline, le second avec un très faible excès énantiomérique pour la phénylglycine. Il faut noter que seuls les pics correspondant aux acides aminés dérivatisés sont observés, on ne voit donc pas les pics correspondant aux substrats dérivatisés (figure 26).

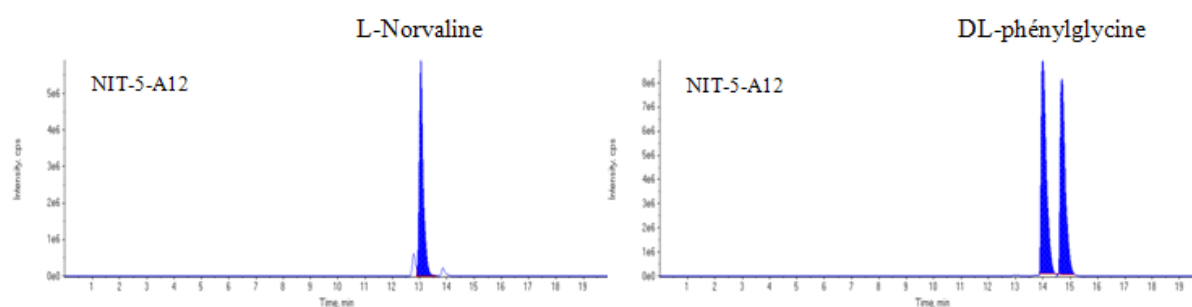


Figure 26

Les résultats sont présentés dans le tableau 12.

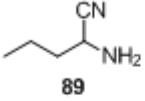
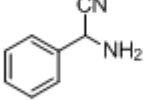
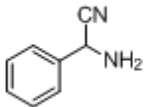
Substrats	Nitrilases	Conversion	e.e
 89	NIT-5-A12	57 %	94 % ( <i>S</i> )
	NIT-7-H10	1%	100 % ( <i>R</i> )
	NIT-8-G05	7%	100 % ( <i>S</i> )
 81	NIT-5-A12	71%	5 % ( <i>S</i> )
	NIT-4-B06	73%	5 % ( <i>R</i> )
	NIT-4-A06	31%	86 % ( <i>R</i> )
	NIT-4-H07	7 %	99 % ( <i>R</i> )
	NIT-4-A07	3 %	97 % ( <i>R</i> )
	NIT-4-B07	2 %	96 % ( <i>R</i> )

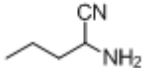
Tableau 12

La nitrilase NIT-5-A12 s'est avérée très active sur le précurseur nitrile de la norvaline : 57 % de conversion ont été obtenus avec un excès énantiomérique de 94 % en faveur de l'énantiomère (*S*). Cette même nitrilase est également fortement active sur le précurseur de la phénylglycine avec une conversion de 71 % et un e.e de 5 % en faveur de l'énantiomère (*S*). Sept autres nitrilases sont actives sur l'autre énantiomère, le (*R*), avec des e.e allant de 5 % à 99 % pour des conversions de 1 % à 73 %. Aucune activité nitrilase n'a été décelée sur les quatre autres  $\alpha$ -aminonitriles.

Plusieurs des taux de conversion sont très faibles, à la limite de détection et on peut s'interroger sur leur validité. Les résultats obtenus ont alors été vérifiés en effectuant la réaction à trois temps d'incubation (1h, 4h, 24h). Le temps court d'incubation d'une heure a été choisi pour étudier l'évolution de l'excès énantiomérique sur les fortes activités enzymatiques. Le temps long de 24 heures a été choisi pour vérifier les très faibles activités enzymatiques en postulant que l'allongement du temps de réaction entraînerait un taux de conversion supérieur. Les résultats sont présentés dans le tableau 13.



**81**



**89**

	Criblage		Verification LC-MS					
	Conv (%)	e.e (%)	Conv (%)	e.e (%)	Conv (%)	e.e (%)	Conv (%)	e.e (%)
	4h		1h		4h		24h	
Nit-4-A06	31	86 (R)	81	80 (R)	47	83 (R)	39	70 (R)
Nit-4-A07	3	97 (R)	10	>99 (R)	10	>99 (R)	7	>99 (R)
Nit-4-B06	73	5 (R)	65	0	54	12 (R)	51	24 (R)
Nit-4-B07	2	96 (R)	9	>99 (R)	7	>99 (R)	3	>99 (R)
Nit-4-H07	7	99 (R)	11	>99 (R)	9	>99 (R)	7	>99 (R)
Nit-5-A12	71	5 (S)	64	0	41	10 (S)	27	13 (S)

	Criblage		Verification LC-MS					
	Conv (%)	e.e (%)	Conv (%)	e.e (%)	Conv (%)	e.e (%)	Conv (%)	e.e (%)
	4h		1h		4h		24h	
Nit-5-A12	57	94 (S)	29	>99 (S)	69	>99 (S)	61	>99 (S)
Nit-7-H10	1	100 (R)	0		0		0	
Nit-8-G05	7	100 (S)	0		0		0	

Tableau 13

Cette vérification nous a permis d'éliminer deux résultats faux positifs obtenus avec les lysats cellulaires de NIT-7-H10 et NIT-8-G05 qui n'ont pas montré d'activité sur le précurseur  $\alpha$ -aminonitrile de la norvaline lors de la vérification. Nous avons constaté que les résultats issus du criblage et de la vérification dans les mêmes conditions de réaction étaient plutôt cohérents, ce qui établit la fiabilité de la méthode de suivi de l'activité nitrilase par LC-MS. Étrangement, les conversions et les excès énantiomériques observés au cours du temps pour certains lysats cellulaires (NIT-4-A06, NIT-4-B06, NIT-5-A12) ont montré des évolutions inversées. Des études complémentaires sont actuellement à l'étude.

Après vérification, les six autres activités  $\alpha$ -aminonitrilases ont été confirmées, NIT-4-A06, NIT-4-A07, NIT-4-B06, NIT-4-B07, NIT-4-H07 et NIT-5-A12.

On retrouve de nouveau les nitrilases NIT-4-B06 et NIT-5-A12 qui se révèlent être très intéressantes car actives sur de nombreux substrats avec parfois de fortes activités. Malgré l'élargissement de la recherche de nouvelles nitrilases à l'ensemble de la superfamille nitrilase, nous remarquons qu'aucune enzyme issue de la nouvelle sélection n'a répondu positivement au criblage, seules quelques nitrilases issues de la première sélection (Cf. chapitre II) se sont révélées actives sur les  $\alpha$ -aminonitriles testés. Parmi les trois nitrilases qui ont fortement répondu, NIT-4-B06 et NIT-5-A12 sont annotées « nitrilase » et possèdent effectivement l'activité prédite de la branche I de la superfamille nitrilase, quant à la nitrilase NIT-4-A06 annotée comme « uncharacterized protein », elle a montré une activité nitrilase vis-à-vis des substrats testés.



Sur le précurseur de la phénylglycine **81**, la nitrilase NIT-4-A06 présente une bonne stéréospécificité, après quatre heures d'incubation l'e.e est de 83 % pour une conversion de 47 %. NIT-4-B06 semble très peu sélective sur ce même substrat, avec un e.e de 12 % pour une conversion de 54 %, nous l'avions d'ailleurs déjà observé lors de la mise au point du criblage.

NIT-5-A12 a quant à elle éveillé notre intérêt car on obtient un excellent e.e et une bonne conversion pour le précurseur de la norvaline **89**. Toutefois soulignons que les valeurs de conversion et d'excès énantiomériques ne sont pas cohérentes (la conversion ne devrait pas excéder 50 %).

Nous nous sommes alors intéressés plus en détail à la conversion de l' $\alpha$ -aminonitrile précurseur de la norvaline **89** par cette enzyme. Cette étude a été réalisée sur une chaîne HPLC avec une détection UV (colonne : Atlantis T3, éluant : acétonitrile 0,1 % TFA/eau 0,1 % TFA). La transformation enzymatique a été étudiée sur enzyme purifiée à différents temps de réaction et nous avons pu vérifier que NIT-5-A12 est très stéréospécifique de l'énantiomère (*S*) et convertit **89** en (*S*)-norvaline avec une conversion globale de 52 % et un e.e supérieur à 96 % en 24h avec une concentration en enzyme de 0.1 mg/mL pour une concentration en substrat de 10 mM (figure 27).

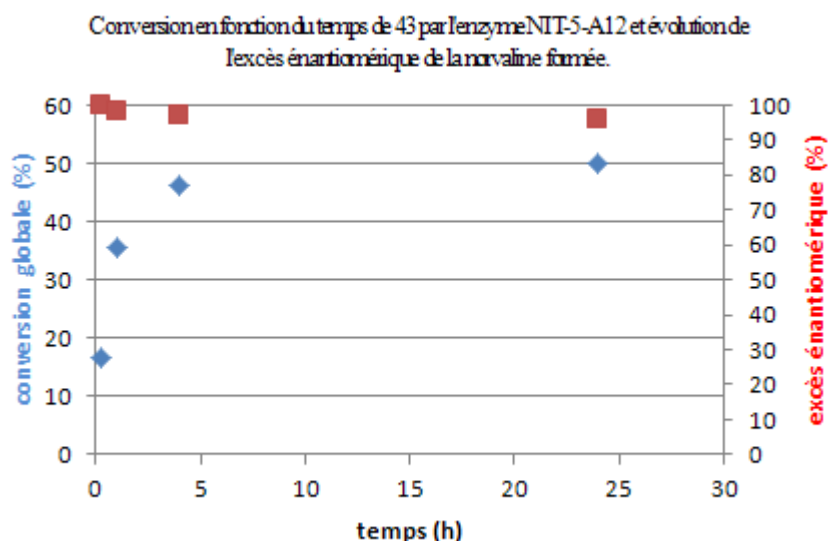


Figure 27

## V- Conclusion.

L'approche génomique utilisée pour trouver de nouvelles activités  $\alpha$ -aminonitrilase n'a malheureusement pas été concluante malgré un élargissement de la recherche à l'ensemble de la superfamille nitrilase. Pour détecter l'activité  $\alpha$ -aminonitrilase, un test colorimétrique générique des  $\alpha$ -aminoacides a été mis au point. La faible sensibilité du test, dans les conditions de notre criblage, n'a malheureusement pas permis de l'exploiter. C'est pourquoi une méthode de suivi alternative de l'activité  $\alpha$ -aminonitrilase a été mise au point par LC-MS donnant l'information sur la stéréospécificité des nitrilases candidates et leurs conversions. Sur les 425 nitrilases candidates issues de la sélection, aucune n'a montré d'activité sur les six  $\alpha$ -aminonitriles que nous avons choisis et synthétisés pour la majeure partie d'entre eux. En revanche, sur les 163 activités nitrilases candidates issues de la première sélection (chapitre II), huit activités  $\alpha$ -aminonitrilase ont été découvertes (NIT-4-A06, NIT-4-A07, NIT-4-B07, NIT-4-H07, NIT-4-B06, NIT-5-A12, NIT-7-H10, NIT-8-G05) grâce à une nouvelle méthode rapide et efficace de criblage à haut débit par LC-MS. Après vérification des résultats deux faux positifs (NIT-7-H10 et NIT-8-G05) ont été obtenus. Parmi les six activités nitrilases restantes, trois d'entre elles, NIT-4-A06, NIT-4-B06 et NIT-5-A12 ont montré une forte activité sur le précurseur nitrile de la phénylglycine **81** avec une forte stéréospécificité pour NIT-4-A06 et NIT-5-A12 tandis que NIT-4-B06 s'est montrée peu stéréospécifique. La nitrilase NIT-5-A12 a montré également une forte activité sur le précurseur nitrile de la norvaline **89** avec une très bonne stéréospécificité. Ces résultats ont été vérifiés sur enzyme purifiée montrant un bon dédoublement cinétique de ce nitrile par cette nitrilase.

Au vu des résultats obtenus à l'issue du criblage, nous avons décidé d'exploiter les nitrilases actives sur le précurseur nitrile de la phénylglycine **81**. Pour cela nous avons décidé de tester des déclinaisons de ce substrat pour la synthèse d' $\alpha$ -aminoacides d'intérêt en chimie thérapeutique.

## VI-Déclinaisons de la phénylglycine

Dans le chapitre précédent, nous avons exposé l'identification d'activités  $\alpha$ -aminonitrilases découvertes sur les  $\alpha$ -aminonitriles **81** et **89** précurseurs de la phénylglycine et de la norvaline respectivement. Il était risqué d'envisager une déclinaison sur le précurseur nitrile de la norvaline avec seulement une nitrilase active. Nous avons donc décidé de décliner le précurseur  $\alpha$ -aminonitrile **81** de la phénylglycine. Pour cela nous avons sélectionné les nitrilases NIT-4-A06, NIT-4-B06, NIT-4-H07, NIT-5-A12 qui sont les plus actives sur ce substrat.

### VI-1 Choix des substrats.

Le squelette phénylglycine se retrouve dans de nombreux composés présentant une activité biologique. Nous l'avons donc choisi pour nos déclinaisons structurales en substituant le cycle par différents groupements à différentes positions. Les quatre nouveaux substrats **228**, **229**, **230**, **231** sont précurseurs de produits d'intérêt (figure 28).

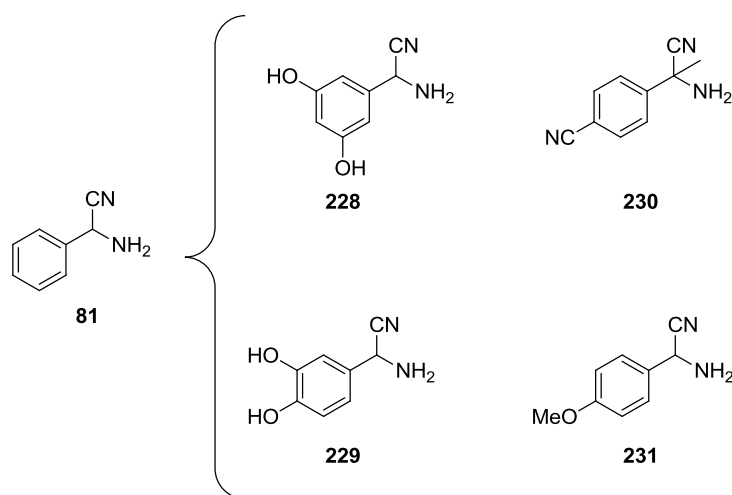


Figure 28

Les composés **228** et **230** sont les précurseurs  $\alpha$ -aminonitrile de la 3,5-DiHydroxyPhénylGlycine (3,5-DHPG) et de la 4-MethylCarboxyPhénylGlycine (4-MCPG) respectivement, deux  $\alpha$ -aminoacides présentant des activités agoniste et antagoniste respectivement sur les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR1 et mGluR5). Les énantiomères de ces  $\alpha$ -aminoacides (*S*) auraient des propriétés

pharmacologiques contre la maladie d'Alzheimer<sup>121,122</sup> puisqu'ils diminueraient la dégénérescence des neurones de l'hippocampe. Aujourd'hui ces deux produits sont vendus entre 11000 et 25000 € le gramme selon les fournisseurs. Un tel coût peut s'expliquer par une synthèse multi-étapes utilisant des réactifs onéreux.

Nous avons choisi deux autres substrats, le précurseur  $\alpha$ -aminonitrile **229** et **231** de la 3,4 - DiHydroxyPhénylGlycine (3,4-DHPG) et du 4-MéthoxyPhénylGlycine (4-MPG). Le composé **229** est le précurseur d'un  $\alpha$ -aminoacide structure de base dans des agents thérapeutiques utilisés dans le traitement des thromboses<sup>123</sup>, et dans des composés inhibiteurs sélectifs du facteur de coagulation VIIa<sup>124</sup>. L'acide carboxylique obtenu par hydrolyse de **231** est un intermédiaire dans la synthèse de composés à activités diverses.<sup>125</sup>

## **VI-2 Synthèse.**

Les activités des quatre nitrilases candidates sur les substrats choisis ont été étudiées par HPLC. Il est donc nécessaire de mettre au point une méthode de suivi analytique, pour cela la synthèse des  $\alpha$ -aminonitriles **228** à **231** des acides carboxyliques **236** à **239** est indispensable.

### **VI-2.a Synthèse des $\alpha$ -aminonitriles.**

La synthèse des  $\alpha$ -aminonitriles **228** à **231** a été réalisée par une réaction de Strecker en milieu organique à partir des aldéhydes commerciaux en présence de cyanure de triméthylsilyle et d'ammoniaque concentrée dans le méthanol. Cette méthode décrite par Wang *et al.*<sup>126</sup> pour l'obtention des précurseurs nitriles de la 3,5-DHPG a été appliquée pour obtenir l'ensemble des substrats désirés avec parfois des adaptations expérimentales (schéma 85) au niveau du temps de réaction et de température. Les rendements obtenus sont moyens dans le cas de **228** (37 %), très bons dans le cas de **229** et **230** (60 % et 87% respectivement) et excellent avec **231** (quantitatif).

---

<sup>121</sup> Wiśniewski K., Car H., *CNS Drug Rev.*, **2002**, *1*, 101-116.

<sup>122</sup> Shinoda Y., Tanaka T., Yoshino K.T., Ogura A., *Plos one*, **2010**, *5*, 1-6.

<sup>123</sup> Eisai RandD Management Co, Ltd EP1810965 A1, **2007**.

<sup>124</sup> Bristol-Myers Squibb Company US2010/227894 A1, **2010**.

<sup>125</sup> a) Exelis, Inc WO2009/55077A1, **2009**. b) Abbot Laboratories, US2010/29686 A1, **2010**.

<sup>126</sup> Wang H., Byun Y., Barinka C., Pullambhatla M., Bhang H.E.C, Fox J.J., Lubkowski J., Mease R.C., Pomper M.G., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 392–397.

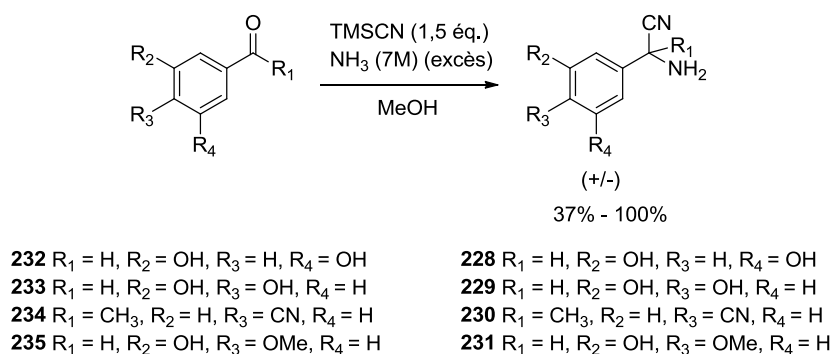


Schéma 85

### VI-2.b Synthèse des acides carboxyliques.

Les produits ont été obtenus simplement par hydrolyse en milieu acide des nitriles **228**, **229**, **231** correspondants (schéma 86).

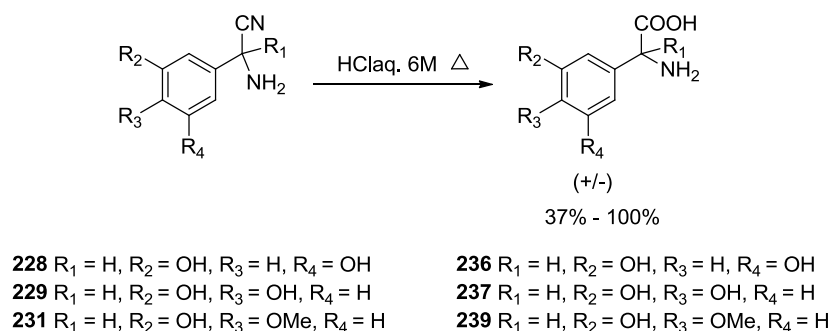


Schéma 86

Le standard acide **238** n'a volontairement pas été synthétisé. Sa synthèse à partir du précurseur  $\alpha$ -aminonitrile **230** aurait entraîné une hydrolyse de la fonction nitrile aromatique. Il aurait donc fallu établir une autre voie de synthèse pour ce composé. Nous avons d'abord décidé d'étudier l'activité des enzymes sélectionnées sur ce substrat **230** sans disposer de référence pour l'acide formé ; l'éluion et la détection des diastéréoisomères formés après dérivatisation devant être similaires à celles de **239**. La synthèse du standard ne sera réalisée que si une étude approfondie de la transformation enzymatique est choisie au laboratoire.

### VI-3 Etude qualitative des activités nitrilases.

#### VI-3.a Mise au point.

Avant de réaliser cette étude, nous avons tout d'abord étudié la séparation et la détection des diastéréoisomères formés après dérivatisation par le (*S*)-NIFE (**223**) des  $\alpha$ -aminoacides **236**, **237**, **238** (dérivatisation réalisée selon le même protocole que celui employé pour la phénylglycine). Des séparations correctes ont été obtenues avec les mêmes conditions que pour la phénylglycine (colonne Atlantis T3 5  $\mu$ m 4,6 mm  $\times$  150 mm ; éluant (A : H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA, B : MeCN + 0,1% TFA avec un gradient linéaire A/B 70/30 vers 50/50 en 20 minutes puis 5 minutes en isochratique à 50/50 ; détection UV à 210 nm) (figure 29). On peut noter que la séparation des diastéréoisomères des composés dihydroxylés **236** et **237** est très moyenne. Aucun retour à la ligne de base n'est observé dans ces conditions. Nous avons décidé de ne pas optimiser les paramètres de séparation dans un premier temps. Ces derniers ne le seront que si des enzymes se révèlent actives pour ce substrat et qu'une étude plus approfondie de la stéréospécificité est décidée.

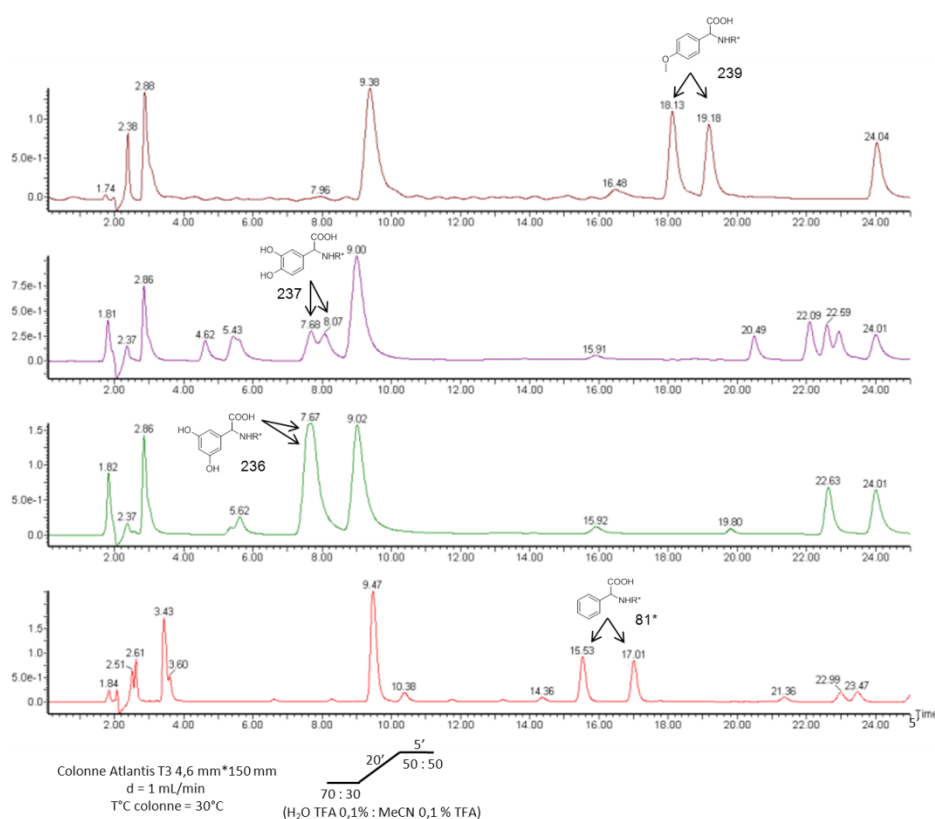
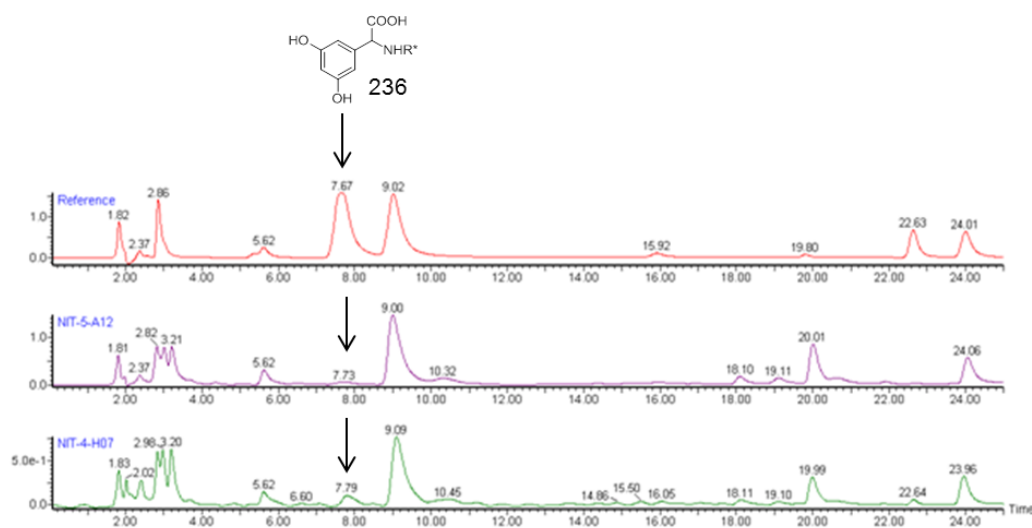


Figure 29

Les nitrilases NIT-4-A06, NIT-4-B06, NIT-4-H07 et NIT-5-A12, ont été testées sous forme de lysat à une concentration de 0,1 mg/mL dans un tampon phosphate 100 mM pH=7,3 avec un temps d'incubation de 24h à 30 °C pour une concentration en  $\alpha$ -aminonitrile de 10 mM.

#### VI-4 Résultats.

Dans les conditions de réaction enzymatique utilisées (24h, 30°C, 0,1 mg/mL de lysat cellulaire contenant la protéine candidate surexprimée), nous avons pu observer une forte conversion de **231** par le(s) enzyme(s) NIT-4-H07 et NIT-5-A12 et une faible conversion de **228** et **229** par ces mêmes enzymes. Une faible activité de NIT-5-A12 sur le composé **230** est à noter. Les nitrilases NIT-4-A06 et NIT-4-B06 n'ont pas montré d'activité sur l'ensemble des substrats proposés. Les chromatogrammes permettant de visualiser l'apparition des acides formés et les ratios de chaque diastéréoisomère sont exposés dans la figure 30.



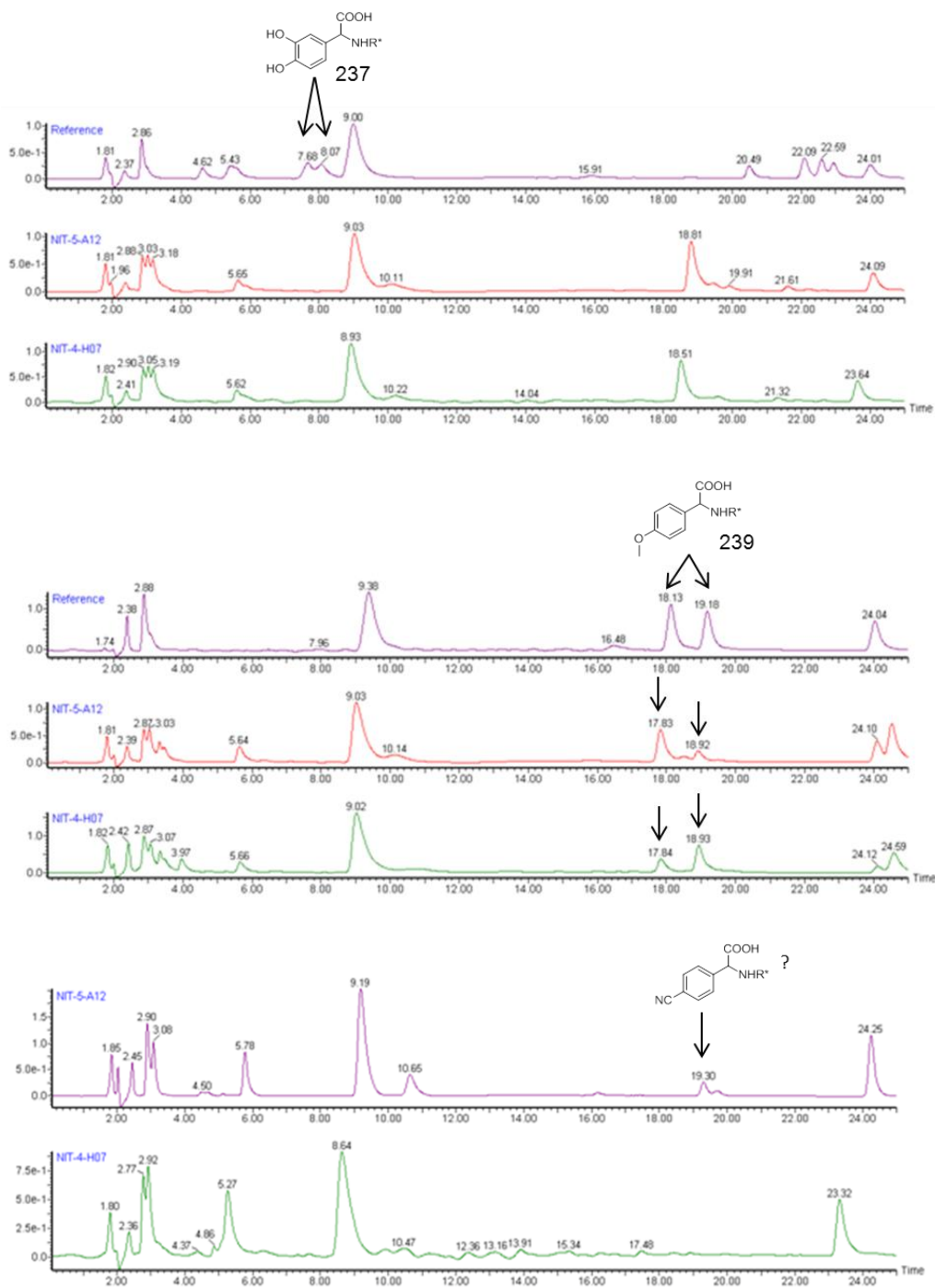


Figure 30



### ***VI-5 Conclusion.***

Cette première étude de déclinaison sur le substrat **81** nous a permis d'obtenir des enzymes actives sur les substrats **228** et **231**. Ces premiers résultats sont à confirmer puis à approfondir en utilisant les enzymes purifiées afin notamment de déterminer la variation de l'excès énantiomérique des acides obtenus en fonction de la conversion. Ce travail sera réalisé ultérieurement au laboratoire.

On peut constater que la nitrilase NIT-5-A12 active sur les deux  $\alpha$ -aminonitriles **81** et **89** (chapitre III), s'est montré aussi active sur le produit **228** décliné de **81**. La grande promiscuité de substrats de NIT-5-A12 (10/28 nitriles testés), observée lors du criblage réalisé au chapitre II, est donc de nouveau constatée. Enfin il est intéressant de constater que la nitrilase NIT-4-H07 active sur des arylacétonitriles et qui a été utilisée dans la déclinaison de dinitrile aliphatique (Chapitre II), s'est montré également affine vis-à-vis du composé **231** avec une énantiospécificité inversée par rapport à celle de NIT-5-A12.

# CONCLUSION GENERALE

## Conclusion Générale

L'objectif de mon travail de thèse était la découverte de nouvelles activités nitrilases sur des nitriles de structures variées et plus particulièrement sur des  $\alpha$ -aminonitriles, puis leur utilisation dans la synthèse d' $\alpha$ -aminoacides via un dédoublement cinétique dynamique enzymatique par combinaison avec une activité racémase.

Deux approches génomiques différentes ont été utilisées pour trouver de nouvelles activités nitrilase. La première approche, s'affranchissant totalement des annotations de gènes, nous a permis de sélectionner 163 enzymes candidates qui ont alors été criblées sous forme de lysat cellulaire sur un panel de 25 nitriles, grâce à un test enzymatique couplé de détection d'activité basé sur la libération d'ammoniaque lors de la réaction d'hydrolyse. La grande majorité des protéines testées présente bien une activité nitrilase et, de manière prépondérante, sont promiscuitaires vis-à-vis des substrats testés. Cela nous a permis de générer un nouveau catalogue d'activité nitrilase utilisable facilement par le chimiste organicien pour choisir l'enzyme la plus apte à réaliser l'hydrolyse souhaitée dans son projet de recherche. Trois exemples sur l'ester méthylique de l'acide 3-cyano-2-phénylpropanoïque (**75d**), le 3-oxocyclopentanenitrile (**169**) et l'iminodiacétonitrile (**44**) sont en cours de publication. L'activité de 38 nitrilases positives a majoritairement été vérifiée avec des enzymes purifiées sauf pour 6 enzymes. Des nitrilases promiscuitaires ressortent (NIT-4-B06, NIT-4-G05, NIT-4-H07, NIT-5-A12, NIT-5-B07 et NIT-5-F04) et pourront être valorisées dans diverses applications.

La deuxième approche génomique a permis d'étendre la sélection des enzymes candidates à toute la superfamille « nitrilase », le but étant d'augmenter la probabilité de trouver de nouvelles activités sur des  $\alpha$ -aminonitriles, substrats encore peu testés dans la littérature. Un nouveau criblage comptant 588 nitrilases (dont les 163 du premier criblage) a ainsi été réalisé sur 6  $\alpha$ -aminonitriles, précurseurs d' $\alpha$ -aminoacides naturels. Après développement des synthèses des  $\alpha$ -aminonitriles, un test colorimétrique basé sur la détection des  $\alpha$ -aminoacides formés a été mis au point mais s'est révélé pas assez adapté au projet, car peu sensible. Une nouvelle méthode de suivi de la réaction enzymatique par LC-MS a alors été mis en place et s'est montrée efficace en fournissant deux informations, la conversion et la stéréospécificité

des enzymes. Malheureusement les résultats obtenus ont été peu satisfaisants puisque seulement 8 nitrilases ont répondu positivement sur seulement 2  $\alpha$ -aminonitriles **89** et **81**, les précurseurs de la norvaline et de la phénylglycine respectivement. Après confirmation de 6 de ces activités (NIT-4-A06, NIT-4-A07, NIT-4-B07, NIT-4-H07, NIT-4-B06, NIT-5-A12), des études plus précises en terme de conversion et d'énantiospécificité pour 3 nitrilases (NIT-4-A06, NIT-4-B06 et NIT-5-A12) ont été menées. Pour le précurseur  $\alpha$ -aminonitrile de la phénylglycine **81**, les conversions sont comprises entre 40 % et 73 % après 4 heures de réaction à partir de 0,1 mg/ml de lysat cellulaire. Les excès énantiomériques observés sont compris entre 10 et 82 % avec une stéréospécificité (*R*) pour les nitrilases NIT-4-A06 et NIT-4-B06 et une stéréospécificité inversée pour la nitrilase NIT-5-A12. Cette dernière a également montré une bonne activité sur le précurseur  $\alpha$ -aminonitrile de la norvaline **89** qui a ensuite été confirmée sur enzyme purifiée montrant une conversion de 52 % et un excès énantiomérique de 96 % en faveur de la (*L*)-norvaline après 24h d'incubation à partir de 0,1 mg/ml d'enzyme. La très bonne stéréospécificité de cette enzyme pour ce substrat devrait permettre de l'inclure dans un procédé de dédoublement cinétique dynamique enzymatique. La recherche de racémases actives sur ce même substrat est en cours au laboratoire et reste prometteuse.

Nous avons montré à nouveau le potentiel de la nitrilase NIT-5-A12 pour la conversion du précurseur  $\alpha$ -aminonitrile de la 3,5-DHPG (**228**) utilisé dans le traitement de la maladie d'Alzheimer et de la 4-MPG (**231**). Des études complémentaires restent encore à réaliser pour confirmer et étudier plus précisément ces activités biocatalytiques.

La recherche de nouvelles activités nitrilases par approches génomiques a permis de compléter largement la gamme d'enzymes disponibles pour hydrolyser des nitriles variés et même si peu de nitrilases ont montré une activité sur les substrats  $\alpha$ -aminonitriles étudiés, un dédoublement cinétique dynamique enzymatique peut être envisagé pour la synthèse de la *L*-norvaline à l'aide de racémases en cours de confirmation d'activité au laboratoire. Les nitrilases NIT-4-B06 et NIT-5-A12 très promiscuitaires pourraient faire l'objet d'évolutions par mutagenèse afin de les rendre plus actives et sélectives de substrats cibles d'intérêt.

# PARTIE EXPERIMENTALE

# Matériels et méthodes

## Chromatographie

Les Chromatographies sur Couche Mince (CCM) sont effectuées sur plaques Merck (Gel de silice 60 F<sub>254</sub>). Les révélateurs utilisés sont l'UV (254 nm), la ninhydrine et le permanganate de potassium puis chauffage.

La chromatographie flash sur colonne de silice se fait par le système CombiFlash Companion de Teledyne ISCO (avec des colonnes de silice Redisep à phase inverse)

L'appareil de chromatographie liquide (HPLC) utilisé au LCOB est un Waters 2795 alliance HT séparation module associé à un détecteur UV Waters 996.

Le colonne utilisée est une Atlantis T3 5 µm 4,6 × 150 mm

L'appareil de chromatographie (UPLC) utilisé au LCAB pour le criblage à haut débit est un Dionex Ultimate 3000 associé à un détecteur UV VWD-3\*00(RS).

La colonne utilisée est une Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> 1,7 µm 2,1\*100mm.

## Données physique et spectrométriques

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN <sup>1</sup>H) et du carbone (RMN <sup>13</sup>C) sont réalisés sur un spectromètre Bruker UltraShield<sup>™</sup> Avance 300 MHz (Université d'Evry, Val d'Essonne). Les déplacements chimiques δ exprimés en ppm sont référencés sur les pics de solvants δ<sub>H</sub> = 3,31 et δ<sub>C</sub> = 49,2 pour CD<sub>3</sub>OD (MeOD-*d*<sub>4</sub>), δ<sub>H</sub> = 7,24 et δ<sub>C</sub> = 77,2 pour CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>H</sub> = 2,50 et δ<sub>C</sub> = 39,5 pour DMSO-*d*<sub>6</sub>. Les abréviations suivantes sont employées : s (singulet), d (doublet), t (triplet), dd (doublet dédoublé), m (multiplet).

Les spectres de masse sont réalisés sur les appareils suivants :

En ionisation électrospray (mode positif HESI<sup>+</sup>, haute résolution) sur un spectromètre Thermo LTQ Orbitrap.

Lors du criblage (mode positif ESI<sup>+</sup>, basse résolution) sur un Triple Quadripole AB SCIEX QTRAP 5500.

Les spectres de masse sont exprimés en unité de masse par charge élémentaire m/z.

### **Obtention des nitrilases candidates**

Les plasmides candidats sont dans un premier temps introduit dans des cellules Novablue (Novagen) chimiquement compétentes par thermochock à 42 °C pendant une minute. Les cellules sont reprises dans 100 µL de SOC incubées à 37 °C pendant 1 h puis ensémençées dans 1 mL de LB carbe (50µg/mL) à 37 °C sous agitation pendant une nuit. 30 µL servent à inoculer 1,6 mL de LB carbe à 37 °C pendant une nuit puis le milieu a été centrifugé à 4000 rpm pendant 40 minutes, le culot est ensuite récupéré. Les cellules subissent une lyse alcaline et l'ADN plasmidique est récupéré dans 30 µL de tampon Tris 10 mM : l'EDTA 0,5 mM. 1 µL de l'extrait plasmidique est transformé dans une cellule type BL<sub>21</sub> (DE3) comme précédemment décrit. 30 µL de préculture servent à inoculer 1,6 mL de milieu TB carbe en présence de sorbitol et bétaïne. Le milieu est incubé à 37°C jusqu'à obtenir une D.O entre 0,8 et 1. L'induction est déclenchée par l'ajout d'IPTG (0,5 – 1mM). La culture est alors placée à 20 °C sous agitation pendant une nuit. Après centrifugation, le culot est repris dans un tampon de lyse (300 µL), de Pefabloc et de lysonase pendant 30 minutes. Après centrifugation, le surnageant est récupéré.

Les enzymes sont purifiées sur une FPLC Akta Explorer 10 GE Healthcare. La colonne utilisée est une colonne Hist-Trap FF 1 mL (GE Healthcare) ou une mini colonne Ni-NTA spin N° 31014.

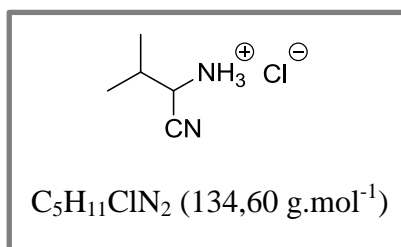
### **Remarques**

La nomenclature des molécules est la nomenclature IUPAC, déterminée à l'aide du logiciel ChembiDraw Ultra 12.0.

# Partie expérimentale

## Synthèse

### Sel de chlorure de 1-cyano-2-méthylpropan-1-amine (85)



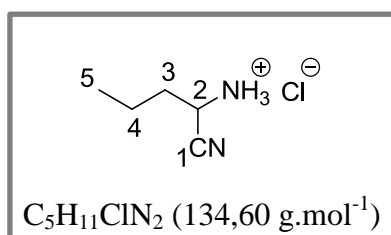
Le mode opératoire est identique à celui réalisé par López-Serrano *et al.*<sup>104</sup>.

Rf (DCM / MeOH : 95 : 5) 0,6 (révélé à la ninhydrine).

Le produit **85** est obtenu sous forme d'un solide jaune pâle (2,28 g ; 55%).

Les analyses RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) sont en accord avec celles de la littérature<sup>104</sup>.

### Sel de chlorure de 1-cyanobutan-1-amine (89)<sup>105</sup>



À une solution de butyraldéhyde (1,25 mL ; 13,9 mmol ; 1 éq.) est ajouté de l'iodure de zinc (177 mg ; 0,56 mmol ; 0,04 éq.). Le mélange est agité jusqu'à solubilisation de l'iodure de zinc puis refroidi à 0 °C avant l'ajout de cyanure de triméthylsilyle (2,18 mL ; 17,2 mmol ; 1,25 éq.). Le mélange réactionnel est agité 15 minutes à TA puis une solution d'ammoniac



dans le méthanol est ajoutée (7M, 10,5 mL). La solution est agitée 2 h à 40 °C en système fermé puis concentrée sous pression réduite. Le résidu obtenu est solubilisé dans 30 mL d'Et<sub>2</sub>O pour faire précipiter l'iodure de zinc. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée sous pression réduite. L'huile orange ainsi obtenue est reprise par une solution d'HCl dans Et<sub>2</sub>O (2M, 7,5 mL) à 0 °C. La solution est agitée 30 minutes à TA en système fermé puis concentrée sous pression réduite pour conduire au composé **89** obtenu sous forme d'un solide jaune clair (1,31 g ; 70%).

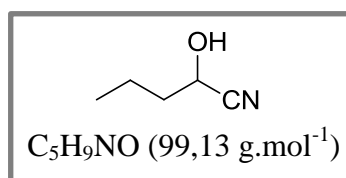
**Rf** (AcOEt : 100) 0,44 (révélé à la ninhydrine).

**RMN** <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz) : δ = 0,90 (t, *J* = 7,2Hz, 3H, H5), 1,43 (m, 2H, H4), 1,86 (m, 2H, H3), 4,54 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, H2).

**RMN** <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz) : δ = 13,2 (C5), 18,1 (C4), 32,1 (C3), 40,4 (C2), 116,8 (C1).

---

## 2-hydroxypentanenitrile (146)



Le mode opératoire est identique à celui réalisé par Chandia *et al.*<sup>127</sup>

Le produit **146** est obtenu sous forme d'une huile jaune (1,88 g ; 95%).

**Rf** (EP / AcOEt 90 : 10) 0,38 (révélé au KMnO<sub>4</sub>).

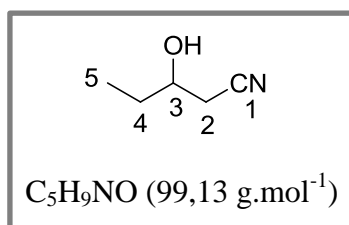
Les analyses RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) en accord avec celles de la littérature.<sup>127-</sup>

---

<sup>127</sup> Chandia N.P., Canales J.C., Azocar I., Vanlaer S., Pawar V.G., De Borggraeve W.M., Costamagna J., Dehaen W., *Synth. Comm.*, **2009**, 39, 927-939.

---

### 3-hydroxypentanenitrile (148)<sup>128</sup>



À une suspension de cyanure de potassium (6,5 g ; 100 mmol ; 5 équ.) et de chlorure d'ammonium (2,33 g ; 44 mmol ; 2,2 équ.) dans un mélange méthanol/eau à 0 °C (8 : 1) (40 mL) est lentement ajouté le 2-éthoxypropane (1,74 mL ; 20 mmol ; 1 équ.). Le mélange est agité 24 h à 70 °C puis de l'eau (30 mL) et de l'Et<sub>2</sub>O (30 mL) sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite avec de l'Et<sub>2</sub>O (3 x 10 mL) puis les phases organiques réunies sont lavées avec une solution de NaCl saturée (10 mL) avant d'être séchées sur MgSO<sub>4</sub> et évaporées sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : EP / AcOEt 90 / 10 puis gradient vers EP / AcOEt 50 / 50) pour conduire au produit **148** sous forme d'une huile jaune (1,21 g ; 60%).

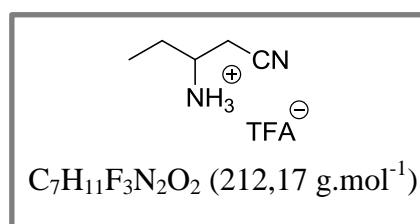
**Rf** (EP / AcOEt 70 : 30) 0,4 (révélé au KMnO<sub>4</sub>).

Les analyses RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) en accord avec celles de la littérature<sup>129</sup>.

**RMN** <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) : δ = 9,9 (C5) ; 25,8 (C2) ; 29,7 (C4) ; 69,3 (C3) ; 117,9 (C1).

---

### Sel de trifluoroacétate de 1-cyanobutan-2-amine (151)



---

<sup>128</sup> Chini M., Crotti P., Favero L., Macchia F., *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 4775-4778.

<sup>129</sup> Itoh T., Mitsukura K., Kanphai W., Takagi Y., Kihara H., Tsukube H., *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 9165-9172.

À une suspension du carbamate **155** (196 mg ; 0,99 mmol ; 1 éq.) dans le DCM anhydre (2 mL) sous N<sub>2</sub> à TA sont successivement ajoutés de l'hydrure de triéthylsilyle (393 μL ; 2,47 mmol ; 2,5 éq.) et de l'acide trifluoroacétique (951 μL ; 12,8 mmol ; 13 éq.). Le mélange est agité 15 minutes à TA puis évaporé sous pression réduite. Les cristaux blanchâtres obtenus sont filtrés sur verre fritté puis triturés avec Et<sub>2</sub>O (3 x 5 mL) avant d'être séchés à la pompe à palette.

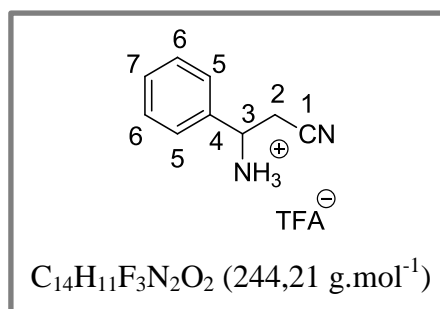
Le produit **151** est obtenu sous forme de cristaux blanc (150 mg ; 72%).

**Rf** (DCM / MeOH : 30 / 70) 0,82 (révélé à la ninhydrine).

Les analyses RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) sont en accord avec celles de la littérature<sup>131-</sup>.

---

### Sel de trifluoroacétate de 2-cyano-1-phényléthaname (**152**)



À une suspension du carbamate **160** (185 mg ; 0,723 mmol ; 1 éq.) dans le DCM anhydre (1,5 mL) sous N<sub>2</sub> sont successivement ajoutés de l'hydrure de triéthylsilyle (575 μL ; 3,61 mmol ; 5 éq.) et de l'acide trifluoroacétique (698 μL ; 9,39 mmol ; 13 éq.). Le mélange est agité 15 minutes à TA puis les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le produit **152** est obtenu sous forme d'une huile marron (162 mg ; 86%).

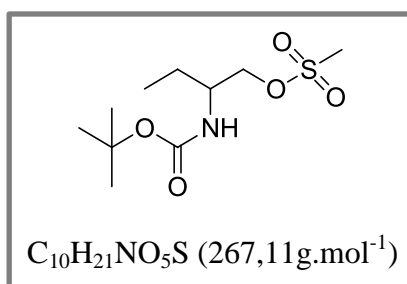
**Rf** (DCM / MeOH 90 : 10) 0,70 (révélé à ninhydrine/ U.V. 254 nm)

**RMN** <sup>1</sup>H (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 300 MHz) : δ = 3,25 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H, H2) ; 4,73 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H, H3) ; 7,48 (m, 5H, H5, H6, H7).

RMN  $^{13}\text{C}$  (MeOD- $d_4$ , 75 MHz) :  $\delta$  = 24,0 (C2) ; 52,8 (C3) ; 116,8 (C1) ; 128,3-131,3 (C5, C6, C7) ; 136,0 (C4).

---

### 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)butyl méthanesulfonate (**154**)<sup>130</sup>



À une suspension de *N*-Boc-2-amino-1-butanol (1 g, 5,3 mmol, 1 éq.) dans le DCM anhydre (16,3 mL) sous  $\text{N}_2$ , est ajoutée de la triéthylamine (1,1 mL ; 7,9 mmol ; 1,5 éq.). Le mélange est agité 15 minutes à 0 °C puis une solution de chlorure de mésyle (66  $\mu\text{L}$  ; 8,6 mmol ; 1.6 éq.) dans le DCM anhydre (6 mL) est ajoutée. La réaction est agitée 3 h à TA avant d'être stoppée par addition d'une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$  (30 mL). Après séparation des deux phases, la phase aqueuse est extraite par le DCM (3 x 10 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le composé **154** sous forme d'un solide blanc pâteux (1,47 g) directement engagé dans l'étape suivante.

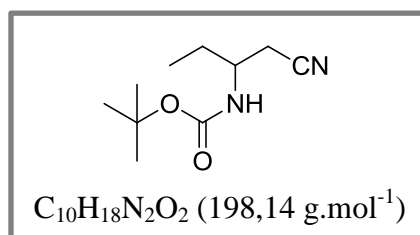
Rf (EP / AcOEt 70 : 30) 0,4 (révélé à l'anisaldéhyde).

---

### *tert*-butyl (1-cyanobutan-2-yl)carbamate (**155**)<sup>131</sup>

<sup>130</sup> Cho Y.J., Kim H.Y., Huang H., Slutsky A., Minko I.G., Wang H., Nechev L.V., Kozekov I.D., Kozekova A., Tamura P., Jacob J., Voehler M., Harris T.M., Lloyd R.S., Rizzo C.J., Stone M.P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 17686-17696.

<sup>131</sup> Williams P.G., Yoshida W.Y., Moore R.E., Paul V.J., *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 29-31.

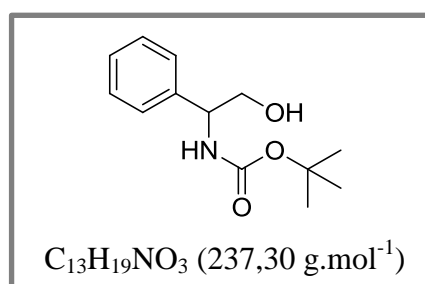


À une suspension du composé **154** (1,47 g ; 5,3 mmol ; 1 éq.) dans le DMSO (28,5 mL) est ajouté du cyanure de potassium (908 mg ; 13,9 mmol ; 2,53 éq.). Le mélange est agité vigoureusement 18 h à 40 °C puis 50 mL d'eau et 25 mL d'Et<sub>2</sub>O sont ensuite ajoutés. Après séparation des deux phases, la phase aqueuse est extraite par Et<sub>2</sub>O (3 x 30 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution saturée de NaCl (2 x 30 mL), séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : EP / AcOEt 95 / 5) puis gradient vers EP / AcOEt 70 / 30). Le produit **155** est isolé sous forme d'un solide blanc poudreux (637 mg ; 59%).

**Rf** (EP / AcOEt 70 : 30) 0,7 (révélé au KMnO<sub>4</sub>).

Les analyses RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) sont en accord avec celles de la littérature<sup>131</sup>.

### ***tert*-butyl (2-hydroxy-1-phényléthyl)carbamate (158)**



Le mode opératoire est identique à celui réalisé par Benalil *et al.*<sup>132</sup>.

<sup>132</sup> Benalil A., Carboni B., Vaultier M., *Tetrahedron*, **1991**, 47, 8177-8194.

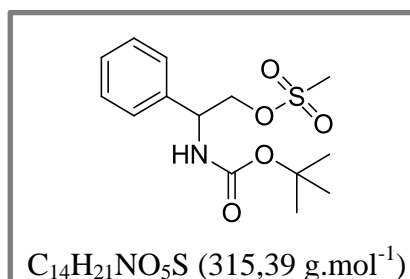
Le produit **158** est obtenu sous forme d'une poudre blanche (1,74g ; 100%).

**Rf** (EP / AcOEt : 80 / 20) 0,84 (révélé à la ninhydrine/ U.V. 254 nm).

Les analyses RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) sont en accord avec celles de la littérature<sup>132-</sup>.

---

### 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phényléthyl méthanesulfonate (**159**)<sup>130-</sup>

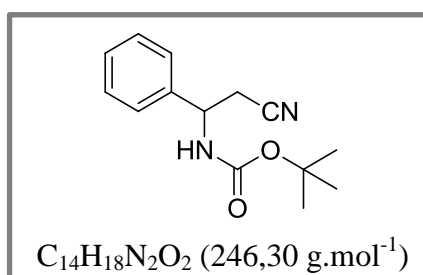


À une suspension d'alcool **158** (1,1 g ; 4,64 mmol ; 1 éq.) dans le DCM anhydre (9 mL) sous  $\text{N}_2$  à TA est ajoutée de la triéthylamine (968  $\mu\text{L}$  ; 6,96 mmol ; 1,5 éq.). Le mélange est refroidi à 0 °C puis du chlorure de mésyle (579  $\mu\text{L}$  ; 7,52 mmol ; 1,62 éq) en solution dans le DCM anhydre (9 mL) est ajouté. Le mélange est agité 1h à TA puis la réaction est stoppée par addition d'une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$  (19 mL). Après décantation, les deux phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite par le DCM (3 x 10 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur  $\text{MgSO}_4$  et filtrées. Le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le produit **159** sous forme d'une huile jaune (1,46 g) directement engagée dans l'étape suivante.

**Rf** (EP /AcOEt 70 : 30) 0,55 (révélé à l'anisaldéhyde/ U.V. 254 nm).

---

### *tert*-butyl (2-cyano-1-phényléthyl)carbamate (**160**)<sup>131-</sup>



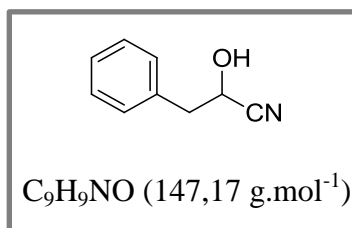
Au composé **159** (1.46 g ; 4,64 mmol ; 1 éq.) est ajouté du DMSO (26 mL) puis du cyanure de potassium (542 mg ; 8,35 mmol ; 1,8 éq.). Le mélange est agité 19 h à 40 °C puis 25 mL d'eau et 12 mL d'Et<sub>2</sub>O sont ajoutés. Les deux phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite par Et<sub>2</sub>O (4 x 10 mL). Les phases organiques réunies sont lavées par une solution de NaCl saturée (15 mL) puis séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : EP / AcOEt 100 / 0 puis gradient vers EP / AcOEt 80 / 20). Le produit **160** est isolé sous forme d'une poudre jaunâtre (400 mg ; 35%).

**Rf** (EP / AcOEt 70 : 10) 0,80 (révélé à l'anisaldehyde/ U.V. 254 nm).

Les analyses RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) sont en accord avec celles de la littérature.<sup>133</sup>

---

## 2-hydroxy-3-phénylpropanenitrile (**168**)<sup>134</sup>



À une solution de 2-phénylacétaldéhyde (0,97 mL ; 8,33 mmol ; 1 éq.) sont ajoutés successivement du cyanure de potassium (0,65 g ; 10 mmol ; 1,2 éq.) et du méthanol (17 mL). Le milieu réactionnel est refroidi à 0 °C puis de l'acide acétique (0,572 mL ; 10 mmol ; 1,2 éq.) est ajouté au goutte-à-goutte. La solution est agitée 1 h à 0 °C puis de l'eau (10 mL) est ajoutée et la solution est concentrée sous pression réduite. De l'eau (25 mL) et de l'AcOEt (80 mL) sont ajoutés, les deux phases sont séparées puis la phase organique est lavée avec une solution de NaCl saturée (25 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : Heptane / AcOEt 100 / 0 gradient vers EP / AcOEt 90 / 10 puis isocratique EP /

---

<sup>133</sup> Caputo R., Cassano E., Longboard L., Palumbo G., *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 12337.

<sup>134</sup> DeSantis G., Zhu Z., Greenberg W.A., Wong K., Chaplin J., Hanson S.R., Farwell B., Nicholson L.W., Rand C.L., Weiner D.P., Robertson D.E., Burk M.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 9024-9025.

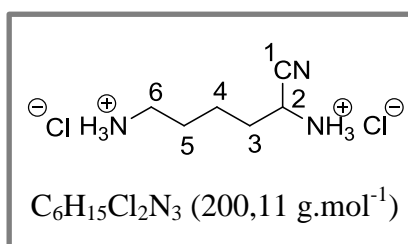
AcOEt 90 / 10 puis gradient vers EP / AcOEt 80 / 20 puis isocratique EP / AcOEt 80 / 20) pour conduire au composé **168** sous forme d'une huile incolore (843 mg ; 69%).

**Rf** (EP / AcOEt 90 : 10) 0,30 (révélé à l'anisaldéhyde).

Les analyses RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) en accord avec celles de la littérature.<sup>135</sup>

---

### Sel de dichlorure de 1-cyanopentane-1,5-diamine (**173**)<sup>136,137</sup>



À une suspension d'iodure de sodium préalablement séché au dessiccateur (1,2 g ; 8,03 mmol ; 7,5 éq.) dans le MeCN anhydre (6 mL) sous  $\text{N}_2$  est ajouté du chlorure de triméthylsilyle (680  $\mu\text{L}$  ; 5,35 mmol ; 5 éq.). Le mélange est agité 45 minutes à TA puis additionné goutte à goutte via une canule sur le composé **203** (279 mg ; 1,07 mmol ; 1 éq.). Le milieu réactionnel est agité 4 h à TA puis concentré sous pression réduite. Le résidu est repris par de l'eau (10 mL) et du DCM (10 mL). Après séparation des deux phases, la phase aqueuse est lavée au DCM (7 x 10 mL) puis neutralisée par addition d'une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$  avant d'être lyophilisée. Le produit est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : MeOH /  $\text{NH}_3$  1%) pour donner une huile jaune (112 mg). L'huile est reprise dans MeOH (10 mL) à 0 °C puis une solution d'HCl dans  $\text{Et}_2\text{O}$  (2M, 1,1 mL ; 2,5 éq) est additionnée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité 15 minutes à TA en système fermé puis les solvants sont évaporés sous pression réduite pour donner le composé **173** sous forme d'un solide jaune très hygroscopique (157 mg ; 75%).

**Rf** (MeOH :  $\text{NH}_3$  sat) 0,4 (révélé à la ninhydrine).

---

<sup>135</sup> Dickschat A., Studer A., *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 3972-3974.

<sup>136</sup> Chubb N., Logan A., Critcher D., Eshelby J., Lunn G., Rudge A., Walshe N., *U.S. Patent US WO2004/72086A2*, **2004**.

<sup>137</sup> Madar J., Djuric S.W., Michmerhuizen M.J., Li X., Kopecka H.A., Longenecker K.L., Pei Z., Pireh D., Sham H.L., Stewart K.D., Szczepankiewicz B.G., Wiedeman P.E., Yong H., *U.S. Patent 2005/0215784 A1*, **2005**.



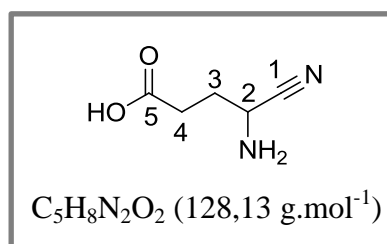
**RMN <sup>1</sup>H** (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 300 MHz) : δ = 1,72 (m, 4H, H4, H5), 2,04 (m, 2H, H3), 2,99 (m, 2H, H6), 4,57 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H, H2).

**RMN <sup>13</sup>C** (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 75 MHz) : δ = 23,4 (C4), 27,7 (C5), 31,7 (C3), 40,3 (C6), 42,6 (C2), 116,8 (C1).

**HRMS** : calculée pour C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub> [M+H<sup>+</sup>] : 128,1182, trouvée : 128.1179.

---

### Acide 4-amino-4-cyanobutanoïque (174)



À une suspension de **192'** (2,13 g ; 7,29 mmol ; 1 éq.) dans du THF (30,5 mL) est ajoutée une solution d'acide chlorhydrique (1M ; 7,7 mL). Le mélange réactionnel est agité 30 minutes à TA puis neutralisé par addition d'une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>. Après concentration sous pression réduite, le résidu obtenu est repris par de l'eau (15 mL) et du DCM (15 mL). Les deux phases sont séparées puis la phase aqueuse est lavée avec du DCM (3 x 15 mL). La phase aqueuse est acidifiée jusqu'à pH = 5 avec une solution refroidie d'acide chlorhydrique 5M puis concentrée sous pression réduite jusqu'à un volume de 5 mL. Afin de faciliter la récupération du solide très pulvérulent qui est difficile à laver par simple filtration, la solution obtenue est centrifugée 10 minutes à 4 °C à 12000 RPM puis le surnageant est éliminé. Le solide obtenu est repris par de l'éthanol (10 mL), de nouveau centrifugé 10 minutes à 4 °C à 12000 RPM et le surnageant est éliminé. La procédure est répétée trois fois. Le solide ainsi obtenu est séché sous vide poussé (pompe à palettes). Le composé **174** est obtenu sous forme d'une poudre blanche très pulvérulente (571 mg ; 61%).

**Rf** (DCM / MeOH/ NH<sub>3</sub> 95 : 5 : 1%) 0,22 (révélé à la ninhydrine).

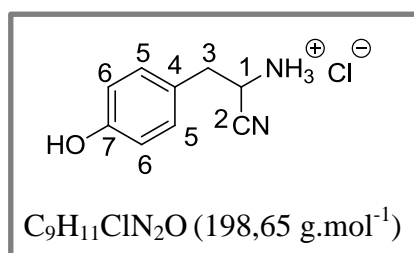
**RMN <sup>1</sup>H** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz) : δ = 1,82 (q, *J* = 7,4 Hz, 2H, H4), 2,35 (dt, *J* = 7,4 et 2,3 Hz, 2H, H3), 3,71 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H, H2), 4,51 (s, 6H, NH<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (DMSO *d*<sub>6</sub>, 75 MHz) : δ = 29,96 (C4), 30,21 (C3), 42,16 (C2), 122,9 (C1), 173,8 (C5).

**HRMS** : calculée pour C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H<sup>+</sup>] : 129,0659, trouvée : 129,0658.

---

### Sel de chlorure de 1-cyano-2-(4-hydroxyphényl)éthylamine (175)<sup>138</sup>



À une suspension de l'aminonitrile **209** (1,064 g ; 4,93 mmol ; 1 éq.) dans le DCM (90 mL) à 0 °C est ajoutée goutte à goutte une solution de tribromure de bore dans l'heptane (1M, 4,22 mL ; 4,22 mmol ; 0,85 éq.). Le milieu réactionnel est agité 2 h à TA puis concentré sous pression réduite. Le résidu est repris par de l'eau (100 mL) et de l'AcOEt (200 mL) et les deux phases sont séparées. La phase aqueuse est lavée par AcOEt (4 x 50mL), basifiée avec de la soude (2,5M ; 10 mL, pH=11) puis extraite par d'AcOEt (6 x 20 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris par AcOEt (2 mL), la solution est refroidie à 0 °C et une solution d'HCl dans Et<sub>2</sub>O (2M, 20 mL) est ajoutée. Le milieu est agité 30 minutes à TA puis les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le résidu obtenu est lavé avec AcOEt (5 x 10 mL) par trituration pour donner le composé **175** sous forme d'une poudre marron clair (400 mg ; 48%).

**Rf** (DCM / MeOH : 80 : 20) 0,76 (révélé à la ninhydrine / U.V. 254 nm).

**RMN <sup>1</sup>H** (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 300 MHz) : δ = 3,15 (m, 2H, H3), 4,65 (dd, *J* = 8,3 et 6 Hz, 2H, H1), 6,81 (m, 2H, H5), 7,19 (m, 2H, H6).

---

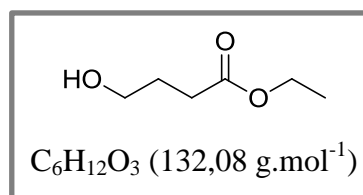
<sup>138</sup> Baell J., Bui C.T., *U.S. Patent US2010/0210622 A1*, 2010.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (MeOD- $d_4$ , 75 MHz) :  $\delta = 37,3$  (C3), 44,4 (C2), 116,7 (C1), 117,0 (C5), 124,6 (C4), 131,9 (C6), 158,9 (C7).

**HRMS**: calculée pour  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_2$  [ $\text{M}+\text{H}^+$ ] : 163,0866, trouvée : 163,0800.

---

#### 4-hydroxybutanoate d'éthyle (181)



Le mode opératoire est identique à celui réalisé par Koshland et Storm<sup>139</sup>.

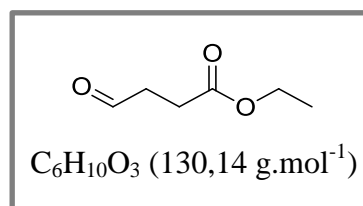
Le produit **181** est obtenu sous forme d'une huile jaune (2,58 g ; 42%).

**Rf** (EP / AcOEt 70 : 30) 0,44 (révélé au  $\text{KMnO}_4$ ).

Les analyses RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) sont en accord avec celles de la littérature<sup>139</sup>.

---

#### 4-oxobutanoate d'éthyle (182)



Le mode opératoire est identique à celui réalisé par Molander et Petrillo<sup>140</sup>.

Le produit **182** est obtenu sous forme d'une huile jaune (187 mg ; 95%).

**Rf** (EP / AcOEt 70 : 30) 0,70 (révélé au  $\text{KMnO}_4$ ).

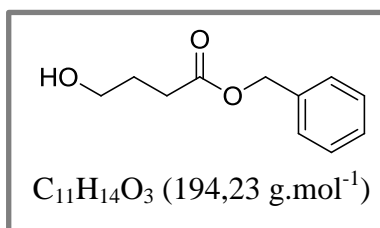
<sup>139</sup> Storm D.R., Koshland D.E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 96, 5805-5814.

<sup>140</sup> Molander G.A., Petrillo D.E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 9634-9635.

Les analyses RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) sont en accord avec celles de la littérature<sup>140</sup>.

---

### 4-hydroxybutanoate de benzyle (183)



Le mode opératoire est identique à celui réalisé par Kitagushi et *al.*<sup>141</sup>.

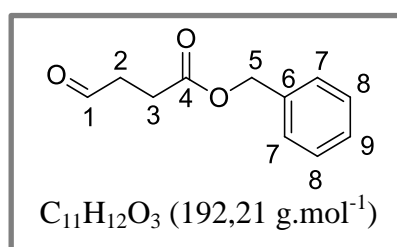
Le produit **183** est obtenu sous forme d'une huile incolore (2,08 g ; 44%).

**Rf** (EP / AcOEt 70 : 30) 0,44 (révélé au  $\text{KMnO}_4$ ).

Les analyses RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) sont en accord avec celles de la littérature<sup>141</sup>.

---

### 4-oxobutanoate de benzyle (184)<sup>140</sup>



---

<sup>141</sup> Kitaguchi H., Komazawa H., Kojima M., Mori H., Nishikawa N., Satoh H., Orikasa A., Ono M., Azuma I., Saiki I., *U.S. Patent US5436221 A1*, **1995**.

À une suspension de l'alcool **183** (1,5 g ; 7,73 mmol ; 1 éq.) dans de l'acétone (15 mL) est ajouté l'IBX (6,5g ; 23,2 mmol ; 3 éq.). Le mélange réactionnel est agité 24 h à 70 °C puis filtré sur gâteau de silice pour éliminer l'IBA. La silice est lavée à l'AcOEt (8 x 20 mL). Le filtrat est récupéré et les solvants sont évaporés sous pression réduite.

Le produit **184** est obtenu sous forme d'une huile jaune clair (1,5 g ; 100%).

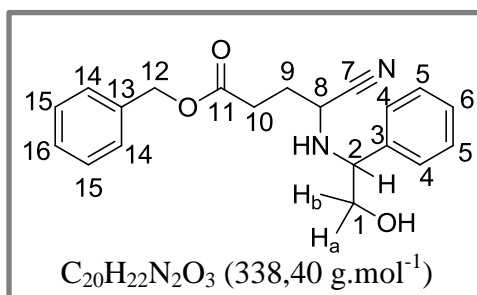
**Rf** (DCM / MeOH 60 : 40) 0,75 (révélé au KMnO<sub>4</sub> / U.V. 254 nm).

**RMN** <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz) : δ = 2,62 (m, 2H, H2), 2,74 (m, 2H, H3), 5,09 (s, 2H, H5), 7,36 (m, 5H, H7, H8, H9), 9,67 (m, 1H, H1).

**RMN** <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz) : δ = 26,3 (C3), 37,9 (C2), 65,6 (C5), 127,8-128,4 (C7-C9), 136,1 (C6), 172,0 (C4), 201,8 (C1).

---

#### 4-cyano-4-((2-hydroxy-1-phényléthyl)amino)butanoate de benzyle (**184'**)<sup>142</sup>



À une suspension de l'aldéhyde **183** (500 mg ; 2,58 mmol ; 1 éq.) dans le DCM anhydre (13 mL) sur tamis 4Å activé (1,03 g) est ajouté du phénylglycinol (353 mg ; 2,58 mmol ; 1 éq.). Le mélange est agité 24 h à TA puis du cyanure de triméthylsilyle (307 mg ; 3,09 mmol ; 1,2 éq.) est additionné. Après agitation 25 h à TA, le milieu réactionnel est filtré pour éliminer le tamis 4Å puis le filtrat est récupéré et 5 mL d'eau et 25 mL de DCM sont ajoutés. Après séparation des deux phases, la phase aqueuse est extraite par le DCM (3 x 10 mL). Les phases

---

<sup>142</sup> Pritz S., Pätzelt M., Szeimies G., Dathe M., Bienert M., *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 1789–1794.

organiques réunies sont séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : EP / AcOEt 100 / 0 puis gradient vers EP / AcOEt 40 / 60). Le produit **184'** est isolé sous forme d'une huile jaune (550 mg ; 70%) et de deux diastéréoisomères.

## Rf

Diastéréoisomère 1 (EP / AcOEt 70 : 30) 0,23 (révélé a la ninhydrine/ U.V. 254 nm).

Diastéréoisomère 2 (EP / AcOEt 70 : 30) 0,20 (révélé a la ninhydrine/ U.V. 254 nm).

### Diastereoisomère 1

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) :  $\delta$  = 2,47 (m, 2H, H9), 2,57 (m, 2H, H9), 3,35 (t,  $J^3$  = 7,9 Hz, 1H, H8), 3,53 (dd, J = 10,8 et 9,5 Hz, 1H, H1a), 3,75 (dd, J = 10,8 et 3,9 Hz, 1H, H1b), 4,09 (dd, J = 9,5 et 3,9 Hz, 1H, H2), 5,09 (s, 2H, H12), 7,34 (m, 10H, H4-H6, H14-H16).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) :  $\delta$  = 28,7 (C9), 30,5 (C10), 47,1 (C8), 63,3 (C2), 66,8 (C1), 67,3 (C12), 120,0 (C7), 127,6-139,5 (C3-C6, C13-C16), 172,3 (C11).

### Diastereoisomère 2

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) :  $\delta$  = 2,47 (m, 2H, H9'), 2,57 (m, 2H, H9'), 3,63 (dd, J = 11,2 et 7,7 Hz, 1H, H1a'), 3,73 (m, 1H, H1b'), 3,87 (t, J = 7,3 Hz, 1H, H8'), 3,97 (dd, J = 7,7 et 4,3 Hz, 1H, H2'), 5,13 (s, 2H, H12'), 7,34 (m, 10H, H4'-H6', H14'-H16').

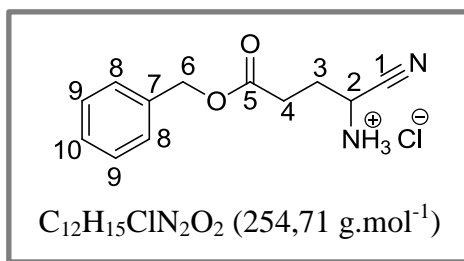
**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) :  $\delta$  = 28,9 (C9), 30,4 (C10), 48,3 (C8), 63,2 (C2), 66,4 (C1), 66,9 (C12), 119,8 (C7), 127,6-139,5 (C3-C6, C13-C16), 172,3 (C11).

---

## Sel de chlorure de 4-(benzyloxy)-1-cyano-4-oxobutan-1-amine (**185**)<sup>143</sup>

---

<sup>143</sup> Reddy R., Jaquith J.B., Neelagiri V.R., Saleh-Hanna S., Durst T., *Org. Lett.*, **2002**, 4, 695-697.



À une suspension du composé **184'** (500 mg ; 1,62 mmol ; 1 éq.) est ajouté un mélange MeOH / DCM anhydre 1/1 (16,8 mL) sous N<sub>2</sub>. Le mélange est agité 15 minutes à 0 °C puis du tétra-acétate de plomb (1,22 g ; 2,76 mmol ; 1,7 éq.) est ajouté en quatre portions. Le mélange réactionnel est agité 5 minutes à 0 °C puis du tampon phosphate (20 mL, 0,2 M ; pH = 7) est ajouté. Le mélange est agité 30 minutes à TA puis filtré sur papier Whatman. Le résidu est rincé avec du DCM (8 x 5 mL) et le filtrat biphasique est recueilli. Après séparation des deux phases, la phase aqueuse est extraite par le DCM (3 x 10 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et concentrées sous pression réduite pour obtenir l'imine intermédiaire sous forme d'huile jaune. Le résidu est repris par un mélange d'Et<sub>2</sub>O (4 mL) et d'acide chlorhydrique (3M, 10 mL). Le mélange est agité 3h à TA puis les deux phases sont séparées. La phase aqueuse est lavée avec Et<sub>2</sub>O (3 x 10 mL) puis basifiée par addition lente d'une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> jusqu'à pH = 9. La phase aqueuse est extraite par AcOEt (3 x 5 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et concentrées sous pression réduite. L'aminonitrile est obtenu sous forme d'une huile jaune (120 mg).

Cette dernière est solubilisée dans 16 mL d'Et<sub>2</sub>O puis une solution d'HCl dans Et<sub>2</sub>O (2M, 0,45 mL) est ajoutée. La solution est agitée 10 minutes à TA puis le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le produit **185** sous forme d'un solide jaune (130 mg ; 32%).

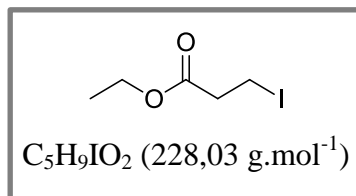
**Rf** (DCM / MeOH 90 : 10) 0,71 (révélé à la ninhydrine/ U.V. 254 nm)

**RMN <sup>1</sup>H** (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 300 MHz) : δ = 2,26 (m, 2H, H3), 2,69 (m, 2H, H4), 4,62 (dd, *J* = 8,9 et 5,8 Hz, 1H, H2), 5,17 (s, 1H, H6), 7,35 (m, 5H, H8-H10).

**RMN <sup>13</sup>C** (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 75 MHz) : δ = 27,5 (C3), 30,5 (C4), 42,1 (C2), 68,1 (C6), 116,6 (C1), 140,0-129,0 (C7-C10), 180,0 (C5).

---

### 3-iodopropanoate d'éthyle (**190**)<sup>144</sup>



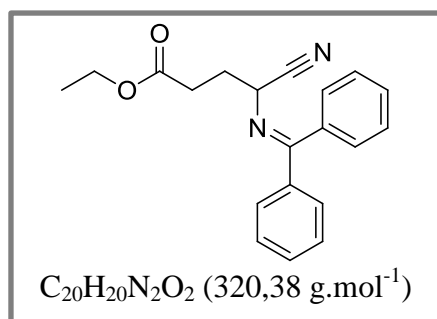
À une solution de 3-bromopropanoate (1 g ; 6,00 mmol ; 1 éq.) dans l'acétone (4 mL) est ajouté de l'iodure de sodium (1,17 g ; 7,78 mmol ; 1,3 éq.). Le mélange réactionnel est agité 2 h à TA puis 45 minutes à 50 °C. Après refroidissement à TA et filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris avec Et<sub>2</sub>O (6 mL) et de l'eau froide (4 mL). La phase organique est lavée avec de l'eau froide (4 x 2 mL) puis séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le composé **190** sous forme d'une huile marron (1,29 g ; 100%).

**Rf** (EP / AcOEt 80 : 20) 0,78 (révélé au KMnO<sub>4</sub>).

Les analyses RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) sont en accord avec celles de la littérature<sup>145</sup>.

---

### 4-cyano-4-((diphénylméthylène)amino)butanoate d'éthyle (**191**)



---

<sup>144</sup> Shoup T.S., Baker D.C., Coutts S.M., Fe R.S., Hand E.S., *U.S. Patent US5019573 A1*, **1991**.

<sup>145</sup> Iida K., Kajiwaru M., Label J., *Compd. Radiopharm.*, **2002**, *45*, 139-143.



Le mode opératoire est identique à celui réalisé par McLaughlin et *al.*<sup>108</sup>.

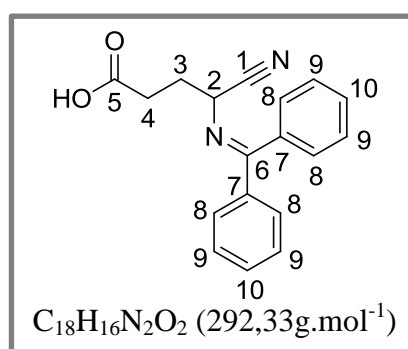
Le produit **191** est obtenu sous forme d'une huile jaune (590 mg ; 85%).

**Rf** (EP / AcOEt 80 : 20) 0,63 (révélé à la ninhydrine).

Les analyses RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) sont en accord avec celles de la littérature<sup>108</sup>.

---

### Acide 4-cyano-4-((diphénylméthylène)amino)butanoïque (**192**)



À une suspension du composé **191** (2,32 g ; 7,25 mmol ; 1 éq.) dans l'éthanol (60 mL) est ajoutée une solution de soude (1M ; 10,9 mL). Le milieu réactionnel est agité 1h30 à TA puis neutralisé par addition d'acide chlorhydrique 1M.

Le mélange est concentré sous pression réduite. Le résidu est repris dans de l'eau (50 mL) puis de l'acide chlorhydrique est ajouté (1M, 3 mL, pH=3). La phase aqueuse est extraite par AcOEt (3 x 25mL) puis les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit **192** est obtenu sous forme d'une huile jaune (2,1 g ; 100%).

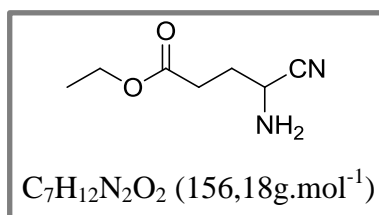
**Rf** (DCM / MeOH 95 : 5) 0,4 (révélé à la ninhydrine/ U.V. 254 nm).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) :  $\delta$  = 2,22 (q,  $J$  = 7,1 Hz, 2H, H4), 2,62 (m, 2H, H3), 4,38 (t,  $J$  = 6,2 Hz, 1H, H2), 7,51 (m, 10H, H8-H10), 9,60 (s, 1H, COOH).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) :  $\delta$  = 29,7 (C4), 29,9 (C3), 51,9 (C2), 119,1 (C1), 127,4-138,2 (C7-C10), 174,2 (C6), 178,2 (C5).

---

#### 4-amino-4-cyanobutanoate d'éthyle (192')



Le mode opératoire est identique à celui réalisé par McLaughlin et *al.*<sup>108</sup>.

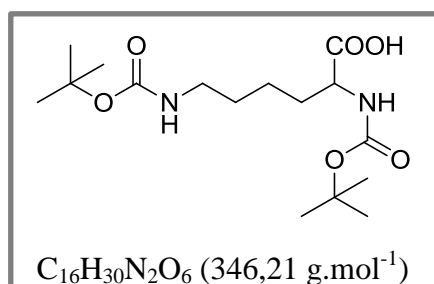
Le produit **192'** est obtenu sous forme d'une huile jaune (187 mg ; 77%).

**Rf** (EP / AcOEt 20 : 80) 0,55 (révélé à la ninhydrine)

Les analyses RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) sont en accord avec celles de la littérature<sup>108</sup>.

---

#### Acide 2,6-bis((*tert*-butoxycarbonyl)amino)hexanoïque (194)



Le mode opératoire est identique à celui réalisé par Khimich et Tennikova<sup>146</sup>.

**Rf** (DCM / MeOH : 80: 20) 0,7 (révélé à l'anisaldehyde).

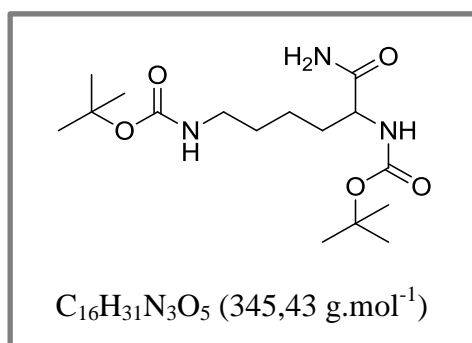
<sup>146</sup> Khimich G.N., Tennikova T.B., *Russ. J. Appl. Chem.*, **2005**, 78, 1003-1007.

Le produit **194** est obtenu sous forme d'un solide blanc (2,77 g ; 97%).

Les analyses RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) sont en accord avec celles de la littérature<sup>146</sup>.

---

### di-*tert*-butyl (6-amino-6-oxohexane-1,5-diyl)dicarbamate (**195**)<sup>109</sup>



À une suspension de l'acide **194** (1 g ; 2,89 mmol ; 1 éq.) dans le THF anhydre (15 mL) sous  $\text{N}_2$  sont ajoutés de la triéthylamine (663  $\mu\text{L}$  ; 4,77 mmol ; 1,65 éq) puis du chloroformate d'éthyle (562 mg ; 5,2 mmol ; 1,8 éq.). Le mélange réactionnel est agité 45 minutes à  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  puis une solution de THF saturée en ammoniac est additionnée. Le mélange est agité 1h à  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  puis 24h à TA avant d'être concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris par de l'AcOEt (80 mL), la solution organique est ensuite lavée avec une solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M (3 x 50 mL), avec de l'eau (3 x 50 mL) puis séchée sur  $\text{MgSO}_4$  et filtrée. Le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le produit **195** sous forme d'un solide blanc (998 mg ; 100%).

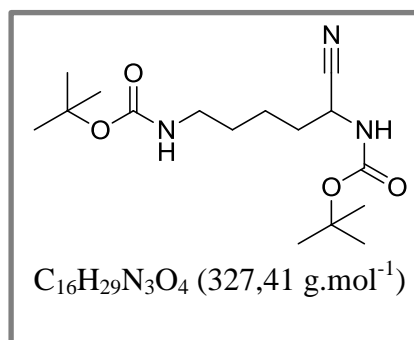
**Rf** (DCM / MeOH : 90: 10) 0,58 (révélé à la ninhydrine).

Les analyses RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) sont en accord avec celles de la littérature<sup>147</sup>.

---

<sup>147</sup> Shon I., Szirtes T., Tam & Oberhardt, Csehi A., *J. Org. Chem.*, **1985**, 48, 1916-1919.

## di-*tert*-butyl (1-cyanopentane-1,5-diyl)dicarbamate (**196**)<sup>109</sup>



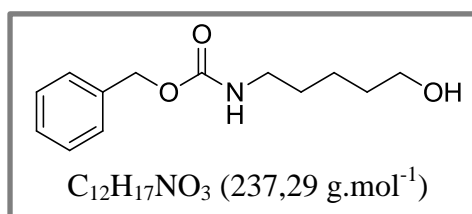
À une suspension de l'amide **195** (450 mg ; 1,30 mmol ; 1 éq.) dans le THF anhydre (6,3 mL) sous N<sub>2</sub> est ajoutée de la triéthylamine (434 µL ; 3,12 mmol ; 2,4 éq.). Le mélange est agité 15 minutes à 0 °C puis de l'anhydride trifluoroacétique (211 µL ; 1,52 mmol ; 1,2 éq.) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité 1 h à 0 °C puis 24 h à TA avant d'être concentré sous pression réduite. Le résidu est repris par Et<sub>2</sub>O (40 mL), la phase organique est lavée successivement avec une solution d'acide chlorhydrique (0,1M, 30 mL), une solution de soude (0,1M, 30 mL) et de l'eau (30 mL). La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le produit **196** sous forme d'un solide blanc (400 mg ; 94%).

**Rf** (DCM / MeOH : 90: 10) 0,9 (révélé au KMnO<sub>4</sub>).

Les analyses RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) sont en accord avec celles de la littérature<sup>148</sup>.

---

## Benzyl (4-hydroxybutyl)carbamate (**201**)



---

<sup>148</sup> Mangette J.E., Johnson M.R., Le V.D., Shenoy R.A., Roark H., Stier M., Belliotti T., Capiris T., Guzzo P.R., *Tetrahedron*, **2009**, 65, 9536-9541.

Le mode opératoire est identique à celui réalisé par Chatterjee *et al.*<sup>110</sup>

Une étape de purification par trituration a été rajoutée afin d'éliminer l'alcool benzylique :

Après traitement, le résidu obtenu est trituré dans l'hexane refroidi, après décantation, le surnageant est éliminé. L'opération est renouvelée quatre fois. Le solide obtenu est séché sous vide poussé (pompe à palettes).

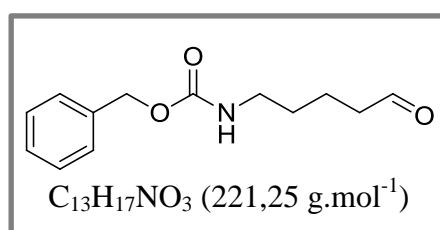
Le produit **201** est obtenu sous forme d'un solide blanc (6,86 g ; 97%).

**Rf** (DCM / MeOH : 80: 20) 0,45 (révélé au KMnO<sub>4</sub> / U.V. 254 nm).

Les analyses RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) sont en accord avec celles de la littérature<sup>110</sup>.

---

### Benzyl (5-oxopentyl)carbamate (**202**)<sup>149</sup>



À une solution de chlorure d'oxalyle (814 µL ; 9,62 mmol ; 2,3 éq.) dans le DCM anhydre (25 mL) sous N<sub>2</sub> à -70 °C est ajoutée lentement via une canule, une solution de DMSO (1,3 mL ; 1,8 mmol ; 4,3 éq.) dans le DCM anhydre (10 mL). La solution est agitée 5 minutes à -70 °C puis une suspension de benzyl (5-hydroxypentyl)carbamate **201** (1 g ; 4,22 mmol ; 1 éq.) dans du DCM anhydre (25 mL) est transférée via une canule. Le milieu réactionnel est agité 25 minutes à -70 °C puis de la triéthylamine (11,7 mL ; 8,44 mmol ; 20 éq.) est additionnée lentement. La réaction est agitée 20 minutes à -70 °C puis 15 minutes à TA. Le milieu est versé dans 600 mL d'H<sub>2</sub>O puis la phase aqueuse est extraite par Et<sub>2</sub>O (3 x 100 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> et filtrées. Les solvants sont évaporés sous pression réduite pour donner le produit **202** obtenu sous forme d'une huile jaune (1,1 g).

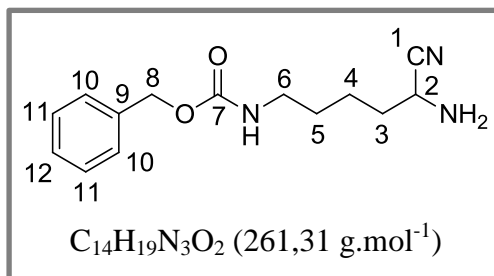
---

<sup>149</sup> Lee B.H., Miller M.J., Prody C.A., Neilandst J.B., *J. Med. Chem.*, **1985**, 24, 317-323.

Rf (DCM / MeOH : 90: 10) 0,7 (révélé au KMnO<sub>4</sub>/ U.V. 254 nm).

---

### Benzyl (5-amino-5-cyanopentyl)carbamate (**203**)<sup>150</sup>



À une suspension de cyanure de potassium (249 mg ; 3,83 mmol ; 1 équ.) dans de l'eau (527 µL) sont ajoutés du chlorure d'ammonium (203 mg ; 3,83 mmol ; 1 équ.) et de l'hydroxyde d'ammonium 33% (1,32 mL ; 20,3 mmol ; 5,3 équ.). Le milieu réactionnel est agité en système fermé 15 minutes à 0 °C puis le composé **202** (900 mg ; 3,83 mmol ; 1 équ.) en solution dans le dioxane (1,35 mL) est additionné goutte à goutte sur 20 minutes. Le mélange est agité 20 h à TA en système fermé puis de l'eau (10 mL) et Et<sub>2</sub>O (30 mL) sont ajoutés. Après séparation des deux phases, la phase aqueuse est acidifiée avec une solution d'acide chlorhydrique (1M ; 50 mL). La phase aqueuse est lavée avec Et<sub>2</sub>O (3 x 20 mL), basifiées avec de la soude (1M ; 20 mL, pH=12) puis extraite par le DCM (4 x 10 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées sous pression réduite.

Le produit **203** obtenu est une huile orange (905 mg ; 91%).

Rf (DCM / MeOH : 90: 10) 0,55 (révélé à la ninhydrine / U.V. 254 nm).

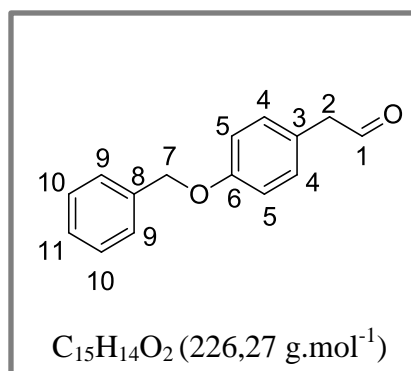
**RMN** <sup>1</sup>H (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 300 MHz) : δ = 1,52 (m, 4H, H4, H5), 1,71 (m, 2H, H3), 3,14 (t, 2H, H6), 3,71 (t, 2H, H2), 5,06 (s, 2H, H8), 7,34 (m, 5H, H10, H11, H12).

**RMN** <sup>13</sup>C (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 75 MHz) : δ = 23,9 (C4), 30,4 (C5), 35,9 (C3), 41,5 (C6), 44,2 (C2), 67,4 (C8), 123,1 (C1), 128,8-129,6 (C10-C12), 138,6 (C9), 159,0 (C7).

---

<sup>150</sup> Kitagawa O., Hashimoto A., Kobayashi Y., Taguchi T., *Chem. Lett.*, **1990**, 1307-1310.

## 2-((4-benzyloxy)phényl)acétaldéhyde (**205**)<sup>151</sup>



À une suspension d'IBX (4,92 g ; 1,75 mmol ; 2 éq.) dans le DMSO (10 mL) est ajoutée une solution de l'alcool **208** (2g ; 8,78 mmol ; 1 éq.) dans du DMSO (8 mL). Le milieu réactionnel est agité 6 h à TA puis traité par addition d'eau (40 mL). L'IBA est filtré sur gâteau de silice, la silice est lavée avec AcOEt (5 x 20 mL) et le filtrat biphasique est recueilli. La phase organique est conservée et la phase aqueuse est extraite par AcOEt (3 x 30 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées sous pression réduite.

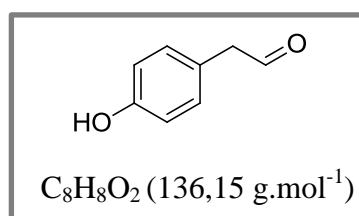
Le produit est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : EP / AcOEt 100 / 0 puis gradient vers EP / AcOEt 30 / 70) pour conduire au composé **205** sous forme d'une poudre blanche (2,13 g ; 88 %).

**Rf** (EP / AcOEt : 70 : 30) 0,82 (révélé au KMnO<sub>4</sub> / U.V. 254 nm).

Les analyses RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) sont en accord avec celles de la littérature<sup>152</sup>.

---

## 2-(4-hydroxyphényl)acétaldéhyde (**207**)



<sup>151</sup> Frigerio M., Santagostino M., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 8019-8022.

<sup>152</sup> Ermolat'ev D.S., Bariwal J.B., Steenackers H.P.L., De Keersmaecker S.C.J., Van der Eycken E.V., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 9465 -9468.

Le mode opératoire est identique à celui réalisé par Omura *et coll.*<sup>112</sup>.

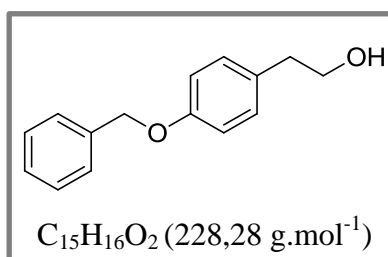
Le composé **207** est obtenu sous forme d'une huile marron (1,36 g ; 70%).

**Rf** (EP / AcOEt : 20 : 80) 0,86 (révélé au KMnO<sub>4</sub>/ U.V. 254 nm).

Les analyses RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) sont en accord avec celles de la littérature<sup>112</sup>.

---

### 2((4-benzyloxy)phényl)éthanol (**208**)



Le mode opératoire est identique à celui réalisé par Lee *et al.*<sup>153</sup>.

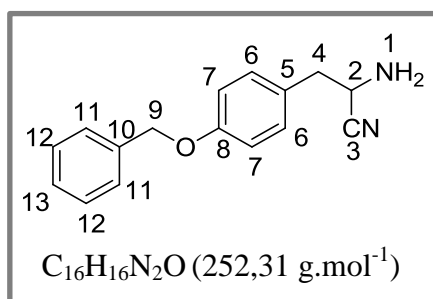
Le composé **208** est obtenu sous forme d'aiguilles blanches (3,09 g ; 94%).

**Rf** (EP / AcOEt : 10 : 90) 0,7 (révélé au KMnO<sub>4</sub>/ U.V. 254 nm).

Les analyses RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) sont en accord avec celles de la littérature<sup>153</sup>.

---

### 2-amino-3-(4-(benzyloxy)phényl)propanenitrile (**209**)<sup>154</sup>



<sup>153</sup> Jeewoo L., Ji-Hye K., Kee-Chung H., Yerim K., Su Yeon K., Hae-Suk Y., Inhee M.J., Hee K., Jee Hye Lo H., Hee Jin H., Young Ho K. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 2022-2031.

<sup>154</sup> Cordi A.A., Berque-Bestel I., Persigand T., Lacoste J.M., Newman-Tancredi A., Audinot V., Millan M.J., *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 787-805.



À une solution d'aldéhyde **205** (200 mg ; 0,885 mmol ; 1 éq.) dans le DCM (4,5 mL) sont ajoutés successivement de l'iodure de zinc (1,1 mg ; 0,035 mmol ; 0,04 éq.) et du cyanure de triméthylsilyle (122 µL ; 0,974 mmol ; 1,1 éq.). Le milieu réactionnel est agité 20 h à TA avant d'être concentré sous pression réduite. Le résidu est repris par une solution d'ammoniac dans le MeOH (7M, 9 mL) et la solution est agitée 4 h à TA avant d'être concentrée sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris par une solution d'acide chlorhydrique (1M, 5 mL) et la phase aqueuse est lavée avec Et<sub>2</sub>O (2 x 4 mL), basifiée jusqu'à pH = 12 par addition d'une solution de soude 6M puis extraite au DCM (3 x 5 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution saturée de NaCl (5 mL), séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le composé **209** sous forme d'une huile jaune (214 mg ; 96%).

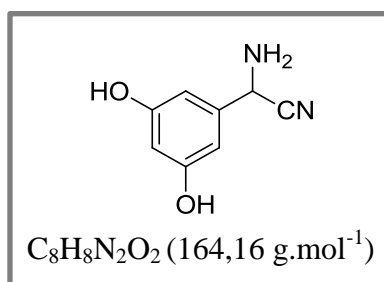
**Rf** (DCM / MeOH : 98 : 2) 0,76 (révélé à la ninhydrine / U.V. 254 nm).

**RMN <sup>1</sup>H** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz) : δ = 2,83 (m, 2H, H4), 3,88 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H, H2), 5,05 (s, 2H, H1), 5,07 (s, 2H, H9), 6,96 (d, *J*=8,6 Hz, 2H, H6), 7,20 (d, *J*=8,6 Hz, 2H, H7), 7,38 (m, 5H, H11-H13).

**RMN <sup>13</sup>C** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz) : δ = 41,2 (C4), 45,1 (C2), 69,1 (C9), 114,6 (C7), 123,1 (C3) 128,2-130,5 (C5, C6, C11-C13), 137,1 (C10), 157,3 (C8).

---

## 2-amino-2-(3,5-dihydroxyphényl) acétonitrile (228)



Le mode opératoire est identique à celui réalisé par Pomper *et coll.*<sup>155</sup>.

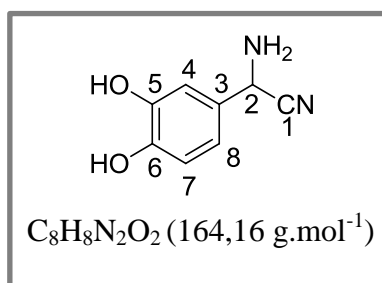
**Rf** (DCM / MeOH : 90 : 10) 0,36 (révélé à la ninhydrine / U.V. 254 nm).

L' $\alpha$ -aminonitrile **228** est obtenu sous forme d'un solide orange pâle (300 mg ; 36%).

Les analyses RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) sont en accord avec celles de la littérature<sup>155</sup>.

---

## 2-amino-2-(3,4-dihydroxyphényl) acétonitrile (**229**)



Le mode opératoire est identique à celui réalisé par Pomper *et coll.*<sup>155</sup>.

**Rf** (DCM / MeOH : 90 : 10) 0,36 (révélé à la ninhydrine / U.V. 254 nm).

L'aminonitrile **229** est obtenu sous forme d'un solide marron clair (491 mg ; 60%).

**RMN <sup>1</sup>H** (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 300 MHz) :  $\delta$  = 4,80 (s, 1H, H2), 6,80 (m, 2H, H7, H8), 6,94 (s, 1H, H4).

**RMN <sup>13</sup>C** (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 75 MHz) :  $\delta$  = 47,0 (C2), 115,2 (C7), 116,7 (C1), 119,5 (C4), 122,6 (C8), 120,0 (C3), 147,1 (C6), 147,3 (C5).

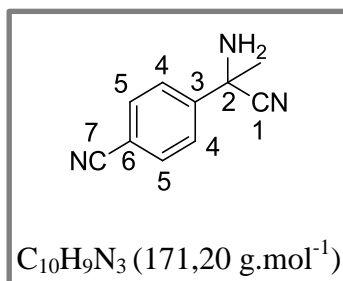
**HRMS**: calculée pour  $C_8H_9N_2O_2$  [M+H<sup>+</sup>] : 165,0658, trouvée : 163,0600.

---

<sup>155</sup> Wang H., Byun Y., Barinka C., Pullambhatla M., Bhang H.E.C, Fox J.J., Lubkowski J., Mease R.C., Pomper M.G., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20, 392–397.

---

### 4-(1-amino-1-cyanoéthyl)benzonitrile (230)



Le mode opératoire suivi est une modification du protocole établi par Pomper et coll.<sup>155</sup> Le milieu réactionnel est agité pendant 24 h à 60 °C au lieu de 5 h à 45 °C et une étape de lavage par l'éther de pétrole (10 x 10 mL) a été réalisée sur le résidu obtenu après évaporation à l'issue du traitement, pour donner l' $\alpha$ -aminonitrile **230** sous forme d'un solide verdâtre (743 mg ; 87%).

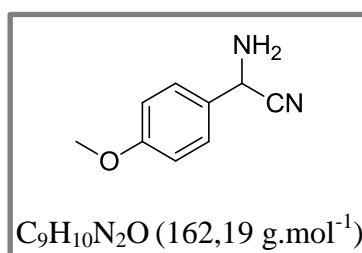
**Rf** (EP / AcOEt : 70 : 30) 0,22 (révélé au  $KMnO_4$  / U.V. 254 nm).

**RMN <sup>1</sup>H** (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 300 MHz) :  $\delta$  = 1,76 (s, 3H, H8), 7,79 (m, 2H, H4), 7,86 (m, 2H, H5)

**RMN <sup>13</sup>C** (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 75 MHz) :  $\delta$  = 31,4 (C8), 54,7 (C2), 113,5 (C6), 119,4 (C7), 124,6 (C1), 127,5 (C4), 133,9 (C5), 148,9 (C3).

---

### 2-amino-2-(4-méthoxyphényl) acétonitrile (231)



Le mode opératoire est identique à celui réalisé par Pomper et coll.<sup>155</sup>.

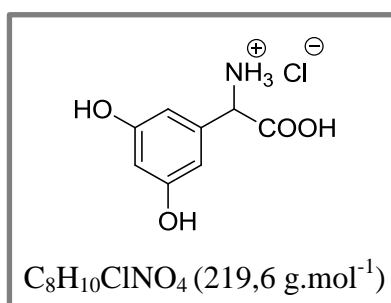
Une étape de lavage par l'éther de pétrole (6 x 20 mL) a été réalisée sur le résidu après évaporation à l'issue du traitement. L' $\alpha$ -aminonitrile **231** est obtenu sous forme d'un solide orange (810 mg ; 100%).

**Rf** (EP / AcOEt : 70 : 30) 0,22 (révélé au  $\text{KMnO}_4$  / U.V. 254 nm)

Les analyses RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) sont en accord avec celles de la littérature.<sup>156</sup>

---

### Sel de chlorure de l'acide 2-amino-2-(3,5-dihydroxyphényl)acétique (**236**)

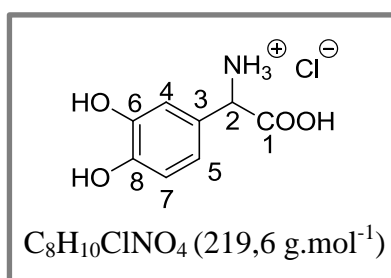


L'aminonitrile **228** (50 mg ; 0,3 mmol ; 1 éq.) est solubilisé dans de l'acide chlorhydrique (6M, 5 mL). La solution est chauffée 6h au reflux, refroidie à TA puis lyophilisée. Le produit **236** obtenu est un solide marron (67 mg ; 100%).

Les analyses RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) sont en accord avec celles de la littérature.<sup>155</sup>.

---

### Sel de chlorure de l'acide 2-amino-2-(3,4-dihydroxyphényl)acétique (**237**)



---

<sup>156</sup> Chu G.H., Gu M., Gerard B., Dolle R.E., *Synth. Comm.*, **2004**, 34, 4583-4590.

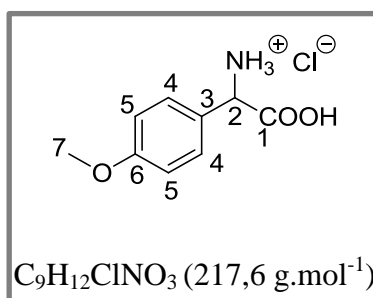
L'aminonitrile **229** (50 mg ; 0,3 mmol ; 1 éq.) est solubilisé dans de l'acide chlorhydrique (6M, 5 mL). La solution est chauffée 6h au reflux, refroidie à TA puis lyophilisée.

Le produit **237** obtenu est un solide marron (67 mg ; 100%).

**RMN <sup>1</sup>H** (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 300 MHz) :  $\delta = 4,91$  (s, 1H, H2), 6,64 (m, 2H, H5, H7), 6,94 (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H, H4).

**RMN <sup>13</sup>C** (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 75 MHz) :  $\delta = 57,5$  (C2), 116,3 (C4), 117,0 (C7), 121,1 (C5) 124,9 (C3), 147,1 (C8), 148,1 (C6), 171,3 (C1).

### Sel de chlorure de l'acide 2-amino-4-méthoxyphényl acétique (**239**)



L'aminonitrile **230** (50 mg ; 0,3 mmol ; 1 éq.) est solubilisé dans de l'acide chlorhydrique (6M, 5 mL). La solution est chauffée 6h au reflux, refroidie à TA puis lyophilisée.

Le produit **239** obtenu est un solide jaune (38,6 mg ; 60%).

**RMN <sup>1</sup>H** (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 300 MHz) :  $\delta = 3,82$  (s, 3H, H7), 5,03 (s, 1H, H1), 7,02 (m, 2H, H5), 7,42 (m, 2H, H4).

**RMN <sup>13</sup>C** (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 75 MHz) :  $\delta = 56,0$  (C7), 57,3 (C2), 115,9 (C5), 125,8 (C3), 130,7 (C4) 162,5 (C6), 171,2 (C1).

## **Mode opératoire de criblage des 163 nitrilases sur les 25 nitriles ( $\alpha$ -aminonitriles exclus) suivi par le test enzymatique couplé à la Glutamate Deshydrogénase**

Les nitrilases testées sont surexprimées au sein d'un lysat cellulaire selon la méthode décrite et réparties sur deux plaques de 96 puits. Elles sont nommées selon leur position sur les plaques : NIT-4-A01 à NIT-4-H10 pour la première plaque ; NIT-5-A01 à NIT-5-H10 pour la deuxième. Les concentrations totales en enzymes varient de 1 à 2 mg/mL d'après un dosage de type Bradford.

Les nitriles testés sont les nitriles **22, 29, 45, 74, 75, 40, 41, 62, 20**, et de **137 à 152**.

Chaque nitrile a été testé sur chaque protéine selon le mode opératoire décrit ci-après dans des plaques 96 puits de 300  $\mu$ L en respectant le positionnement des protéines prélevées au sein des plaques mères.

Dans chaque puits est introduite à l'aide d'une pipette multicanaux une solution mélange contenant 10  $\mu$ L de tampon potassium-phosphate 1M pH=7,5, 10  $\mu$ L d'une solution à 100 mM de nitrile dans le méthanol (5 % de méthode final), 0,1  $\mu$ L d'une solution 1M de DTT dans l'eau et 74,9  $\mu$ L d' $H_2O$  puis la réaction est déclenchée avec 5  $\mu$ L de lysat contenant la protéine à tester (tableau 15).

Concentration initiale	Concentration finale	Quantité par puits ( $\mu$ L)
Tampon K-phosphate pH=7,5 1 M	100 mM	10
Nitrile 100 mM	10 mM	10
DTT 1 M	1 mM	0,1
$H_2O$		74,9
Lysat	0,05/0,1 mg/mL	5
Volume total		100

Tableau 15

Les 2 plaques 96 puits sont recouvertes par des pads de la marque 3M puis placées à l'étuve à 30°C pendant 4h. Après incubation, 1  $\mu$ L de TFA pur est ajouté dans chaque puits à l'aide d'une pipette multicanaux suivi par une homogénéisation à 400 rpm puis 2,5  $\mu$ L d'une solution de  $K_2CO_3$  5 M sont ajoutés de la même manière (pH = 8,1).

Dans chaque puits 3,75  $\mu\text{L}$  de glutamate déshydrogénase (4mg/mL de tampon phosphate 50 mM pH 8,1) sont ajoutés par pipette multicanaux suivi d'une solution contenant 10  $\mu\text{L}$  de tampon potassium-phosphate (pH=8,1), 2  $\mu\text{L}$  de NADH 30 mM, 2  $\mu\text{L}$  d' $\alpha$ -cétoglutarate 1 M, 2  $\mu\text{L}$  d'ADP 10 mM, 80,25  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  (tableau 16).

Concentration initiale	Concentration finale	Quantité par puits ( $\mu\text{L}$ )
Tampon K-phosphate pH=8,1 1 M	100 mM	10
NADH 30 mM	300 $\mu\text{M}$	2
$\alpha$ -cetoglutarate 1 M	10mM	2
ADP 10 mM	100 $\mu\text{M}$	2
glutamate deshydrogenase (4 mg/mL)	0,015 mg/100 $\mu\text{L}$	3,75 0
eau		80,25
volume total		100

Tableau 16

La cinétique de disparition du NADH est mesurée au spectrophotomètre à 340 nm. La pente est calculée sur 500 secondes et soustraite à la pente d'un blanc sans substrat puis divisée par la quantité totale d'enzymes présentes dans le lysat. Une correction manuelle est effectuée en cas de problèmes expérimentaux (présences de bulles par exemple) ou de densité optique à  $t_0$  inférieure à la valeur standard reflétant un début de consommation du NADH avant la mesure effective. Ce dernier cas reflète dans la plupart des cas une forte présence de  $\text{NH}_3$ . La valeur de la pente a alors été fixée à 4000.

Ce mode opératoire a été suivi pour chaque nitrile testé.

## Détection colorimétrique d' $\alpha$ -aminoacides

Le test a été effectué selon le protocole suivant sur les  $\alpha$ -aminonitriles **81**, **85**, **89**, **173** et **174** en plaques 96 puits.

Dans chaque puits, on introduit successivement à l'aide d'une pipette multicanaux :

- 10  $\mu$ L de tampon potassium-phosphate 1 M pH=7,3,
- 10  $\mu$ L d' $\alpha$ -aminonitrile 600 mM dans le méthanol,
- 0,1  $\mu$ L de DTT 1 M dans H<sub>2</sub>O,
- 74,9  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O,

puis la réaction est déclenchée par addition de 5  $\mu$ L de lysat protéique (tableau 17).

Concentration initiale	Concentration finale	Volume par puits ( $\mu$ L)
Tampon K-phosphate pH=7,3 1 M	100mM	10
$\alpha$ -aminonitrile 600 mM	60mM	10
DTT 1 M	1mM	0,1
H <sub>2</sub> O		74,9
Lysat	0,05/0,1 mg/mL	5
volume total		100

Tableau 17

Les deux plaques sont hermétiquement fermées avec des pads de la marque 3M et placées 4h à l'étuve à 30 °C.

Après incubation, 1  $\mu$ L de TFA est ajouté dans chaque puits, le mélange est homogénéisé au vortex (400 rpm) puis 3,5  $\mu$ L d'une solution de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 M sont ajoutés (pH = 9,7).

Dans chaque puits, 200  $\mu$ L d'une solution cuivre-citrate (1 : 2) (solution à 15 mM obtenue après dissolution de CuSO<sub>4</sub> dans un tampon borax 150 mM pH=9,7) sont ajoutés. La DO est mesurée au spectrophotomètre à  $\lambda = 595$  nm puis soustraite à DO lue pour 300  $\mu$ L d'un blanc cuivre-citrate (1 : 2) en présence de DTT, de lysat cellulaire d'*E.Coli* et de tampon borax 150 mM pH=9,7. Les valeurs positives obtenues indiquent la présence de complexes Cu-acide aminé.

La couleur de chaque puits est également examinée à l'œil nu, notamment dans le cas des milieux non homogènes obtenus pour **81** et **175**, où la lecture de la DO est erronée.



## Criblage à haut débit sur les $\alpha$ -aminonitriles suivi par LC-MS

Le criblage a été réalisé sur 7 plaques 96 puits de la manière suivante pour un  $\alpha$ -aminonitrile donné.

Dans chaque puits est introduite à l'aide d'une pipette multicanaux une solution contenant 2,5  $\mu$ L de tampon potassium-phosphate 1 M pH=7,3, 0,5  $\mu$ L de DTT 100 mM dilué dans H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ L d' $\alpha$ -aminonitrile 100 mM dilué dans le méthanol et 39  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O puis la réaction est déclenchée avec 3  $\mu$ L de lysat contenant la nitrilase à tester (tableau 18).

Concentration initiale	Concentration finale	Volume par puits ( $\mu$ L)
Tampon K-phosphate pH=7,3 1 M	50mM	2,5
DTT 100 mM	1mM	0,5
$\alpha$ -aminonitrile 100 mM	10mM	5
H <sub>2</sub> O		39
Lysat	0,05/0,1 mg/mL	3
Volume total		50

Tableau 18

Les 7 plaques 96 puits sont hermétiquement fermées avec des pads de la marque 3M puis placées à l'étuve à 30°C pendant 4h. Après incubation, 3.5  $\mu$ L d'une solution de TFA 25 % dans l'eau est ajoutée dans chaque puits à l'aide d'une pipette multicanaux suivi d'une homogénéisation pendant 5 minutes à 4°C (4000 rpm) puis 40  $\mu$ L de chaque puits de la plaque mère est prélevé et transféré dans une plaque fille. Dans chaque puits de la plaque fille est ajouté 3  $\mu$ L d'une solution de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2,5 M (pH = 7,5) puis 16  $\mu$ L de S-NIFE (20 mg/ mL d'acétonitrile de qualité HPLC) est ajouté.

Les plaques sont hermétiquement fermées avec des Pads de la marque 3M et agitées sur un appareil de la marque Belco (400 rpm) pendant 20 minutes à T.A.

Ce protocole est réalisé selon le même mode opératoire pour les six  $\alpha$ -aminonitriles **81**, **85**, **89**, **173**, **174** et **175**.

2  $\mu$ L de chaque position de plaque identique pour les  $\alpha$ -aminonitriles **89**, **173** et **175** dérivatisés sont combinés sur une plaque fille (6  $\mu$ L de volume final) pour former le mélange 1 puis 194  $\mu$ L d'une solution de TFA 0,01% sont ajoutés (dilution au 100<sup>ème</sup> du milieu réactionnel) pour atteindre un pH compris entre 6,5 à 7. 10  $\mu$ L de chaque puits sont ensuite injectés en UPLC selon les conditions décrites en figure 31 et détectés par spectrométrie de masse suivant la méthode MRM.

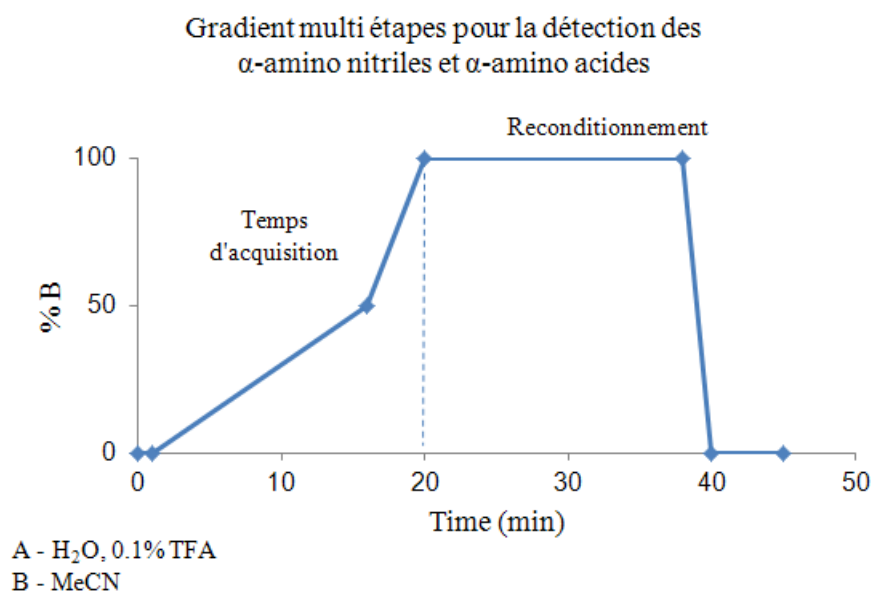


Figure 31

Colonne Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 1,7  $\mu$ m, 2.1 \*100 mm (Waters) ; d = 0,4 mL/min ;

T<sub>colonne</sub> : 50°C.

NB : Une injection a lieu toutes les 20 min car le système de chromatographie peut fonctionner avec deux colonnes en parallèle. Pendant qu'une acquisition a lieu sur une colonne, l'autre colonne est en reconditionnement.

Les ions détectés pour chaque  $\alpha$ -aminonitriles (**81**, **85**, **89**, **173**, **174**, **175**) et leurs  $\alpha$ -aminoacides correspondants (**81\***, **85\***, **89\***, **193**, **176**, **175\***) sont répertoriés dans le tableau 19. Cette opération est réalisée selon le même protocole pour les  $\alpha$ -aminonitriles **81**, **85** et **174** dérivatisés pour former le mélange 2.

Mélange 1			Mélange 2		
	m/z [M+H <sup>+</sup> ]	m/z Fragments fils		m/z [M+H <sup>+</sup> ]	m/z Fragments fils
<b>89</b>	348,00	120	<b>174</b>	377,90	120
<b>89*</b>	367,10	120	<b>167</b>	397,10	120
<b>173</b>	377,09	120	<b>81</b>	382,01	120
<b>173*</b>	396,20	120	<b>81*</b>	401,12	120
<b>175</b>	412,09	120	<b>85</b>	348,09	120
<b>175*</b>	431,02	120	<b>85*</b>	367,09	120

Tableau 19

# BIBLIOGRAPHIE

## Bibliographie

- 1- Définition donnée par EuropaBio en 2003 des biotechnologies blanches : « les biotechnologies blanches consistent à appliquer des procédés naturels à la production industrielle ».
- 2- (a) Thimann K.V., Mahadevan S., “Nitrilase I. Occurrence, preparation and general properties of the enzyme” *Arch. Biochem. Biophys.*, **1964**, 105, 133-141.  
(b) Hook R.H., Robinson W.G., “Ricinine Nitrilase I. Reaction product and substrate specificity” *J. Biol. Chem.*, **1964**, 239, 4257-4263.  
(c) Hook R.H., Robinson W.G., “Ricinine nitrilase II. Purification and properties” *J. Biol. Chem.*, **1964**, 239, 4263-4267.
- 3- (a) Arnaud A., Galzy P., Jallageas J.C.R., “Nitrilase activity in several bacteria” *Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci.* , **1976**, 571-573.  
(b) Banerjee A., Sharma R., Banerjee U., “The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2002**, 60, 33-44.  
(c) Cowan D., Cramp R., Pereira R., Graham D., Almatawah Q., “Biochemistry and biotechnology of mesophilic and thermophilic nitrile metabolizing enzymes” *Extremophiles* , **1998**, 2, 207-216.
- 4- (a) Harper D.B., “Fungal degradation of aromatic nitriles. Enzymology of C-N cleavage by *Fusarium solani*” *Biochem. J.*, **1977**, 167, 685-692.  
(b) Nolan L.M., Harnedy P.A., Turner P., Hearne A.B., O’Reilly C., “The cyanide hydratase enzyme of *Fusarium lateritium* also has nitrilase Activity” *FEMS Microbiol. Lett.*, **2003**, 221, 161-165.
- 5- Piotrowski M., “Primary or secondary? Versatile nitrilases in plant metabolism” *Phytochemistry*, **2008**, 69, 2655-2667.
- 6- Howden A.J.M., Preston G.M., “Nitrilase enzymes and their role in plant–microbe interactions” *Microbiol. Biotechnol.*, **2009**, 2, 441-451.
- 7- (a) Brenner C., “Catalysis in the nitrilase superfamily” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2002**, 12, 775-782.  
(b) Brenner C., Pace H.C., “The nitrilase superfamily: classification, structure and function” *Genome Biology*, **2001**, 2, (1): reviews 0001.1-0001.9.
- 8- <http://www.brenda-enzymes.org/>
- 9- O’Reilly C., Turner P.D., “The nitrilases family of CN hydrolyzing enzymes – a comparative study *Journal of applied microbiology: A review*”, *J. Appl. Microbiol.*, **2003**, 95, 1161-1174.
- 10- Nakai T., Hasegawa T., Yamashita E., Yamamoto M., Kumasaka T., Ueki T., Nanba H., Ikenaka Y., Takahashi S., Sato M., “Crystal structure of *N*-carbonyl-D-amino acid amidohydrolase with a novel catalytic framework common to amidohydrolases”, *Structure*, **2000**, 8, 729-739.
- 11- Raczynska E.J., Vorgias E.C., Antranikian G., Rypniewski W., “Crystallographic analysis of a thermoactive nitrilase” *J. Struct. Biol.*, **2011**, 173, 294-302.
- 12- Kobayashi M., Goda M., Shimizu S., “Nitrilase catalyzes amide hydrolysis as well as nitrile hydrolysis” *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1998**, 253, 662-666.
- 13- Banerjee A., Sharma R., Banerjee U.C., “The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2002**, 60, 33-44.
- 14- Holtz Sommer M., Sorensen J., Hansen H.C.B., Aamand J., “Transformation of the herbicide 2,6-dichlorobenzonitrile to the persistent metabolite 2,6-dichlorobenzamide (BAM) by soil bacteria known to harbour nitrile hydratase or nitrilase” *Biodegradation*, **2006**, 17, 503-510.

- 15- Nigam V.K., Khandelwan A.K., Gothwal R.K., Mohan M.K., Choudhury B., Vidyarthi A.S., Ghosh P., “Nitrilase-catalysed conversion of acrylonitrile by free and immobilized cells of *Streptomyces* sp” *J. Biosci.*, **2009**, *34*, 21-26.
- 16- (a) Yamamoto K., Fujimatsu I., Komatsu K., “Purification and characterization of the nitrilase from *Alcaligenes faecalis* ATCC8750 responsible for enantioselective hydrolysis of mandelonitrile” *J. Ferment. Bioeng.*, **1992**, *73*, 425-430.  
 (b) Banerjee A., Kaul P., Banerjee U.C., “Enhancing the catalytic potential of nitrilase from *Pseudomonas putida* for stereoselective nitrile hydrolysis” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2006**, *72*, 77-87.
- 17- Zhang Z.J., Xu J.H., He Y.C., Ouyang L.M., Liu Y.Y., “Cloning and biochemical properties of a highly thermostable and enantioselective nitrilase from *Alcaligenes* sp. ECU0401 and its potential for (*R*)-(-)-mandelic acid production” *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, **2010**, *34*, 315-322.
- 18- Yamamoto K., Ueno Y., Otsubo K., Kawakami K., Komatsu K., “Production of (*S*)-(+)-ibuprofen from a nitrile compound by *Acinetobacter* sp. Strain AK226” *Appl. Env. Microbiol.*, **1990**, *10*, 3125-3129.
- 19- (a) DeSantis G., Wong K., Farwell B., Chatman K., Zhu Z., Tomlinson G., Huang H., Tan X., Bibbs L., Chen P., Kretz K., Burk M.J., “Creation of a Productive, Highly Enantioselective Nitrilase through Gene Site Saturation Mutagenesis (GSSM)” *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 11476-11477.  
 (b) Watanabe I., “Acrylamide Production Method using Immobilized Nitrilase-Containing Microbial Cells” *Methods in enzymology*, **1987**, *136*, 523-530.
- 20- Mukherjee C., Dunming Z., Biehl E.R., Hua L., “Exploring the synthetic applicability of a cyanobacterium nitrilase as catalyst for nitrile hydrolysis” *Eur. J. Chem.*, **2006**, 5238-5242.
- 21- Mukherjee C., Dunming Z., Biehl E.R., Parmar R., “Enzymatic nitrile hydrolysis catalyzed by nitrilase ZmNIT2 from maize. An unprecedented  $\beta$ -hydroxy functionality enhanced amide formation” *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 6150-6154.
- 22- Effenberger F., Obwald S., “(E)-Selective hydrolysis of (*E,Z*)- $\alpha,\beta$ -unsaturated nitriles by the recombinant nitrilase AtNIT1 from *Arabidopsis thaliana*” *Tetrahedron Asym.*, **2001**, *12*, 2581-2587.
- 23- Kobayashi M., Yanaka N., Nagasawa T., Yamada H., “Purification and Characterization of a Novel Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* K22 That Acts on Aliphatic Nitriles” *J. Bacteriol.*, **1990**, *172*, 4807-4815.
- 24- Bauer R., Hirrlinger B., Layh N., Stolz A., Knackmuss H.J., “Enantioselective hydrolysis of racemic 2-phenylpropionitrile and other (*R,S*)-2-arylpropionitriles by a new bacterial isolate, *Agrobacterium tumefaciens* strain d3” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1994**, *42*, 1-7.
- 25- Šnajdrová R., Kristová-Mylerová V., Crestia D., Nikolaou K., Kuzma M., Lemaire M., Galienne E., Bolte J., Bezouška K., Křen V., Martínková L., “Nitrile biotransformation by *Aspergillus niger*” *J. Mol. Catal. B Enz.*, **2004**, *29*, 227-232.
- 26- Almatawah Q.A., Cramp R., Cowan D.A., “Characterization of an inducible nitrilase from a thermophilic bacillus” *Extremophiles*, **1999**, *3*, 283-291.
- 27- Kaplan O., Vejvoda V., Plíhal O., Pompach P., Kavan D., Bojarová P., Bezouška K., Macková M., Cantarella M., Jirků V., Křen V., Martínková L., “Purification and characterization of a nitrilase from *Aspergillus niger* K10” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2006**, *73*, 567-575.
- 28- Yang C., Wang X., Wei D., “A New Nitrilase-Producing Strain Named *Rhodobacter sphaeroides* LHS-305: Biocatalytic Characterization and Substrate Specificity” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2011**, *165*, 1556-1567.

- 29- Sharma N.N., Sharma M., Kumar H., Bhalla T.C., “Nocardia globerula NHB-2: bench scale production of nicotinic acid” *Process. Biochem.*, **2006**, *41*, 2078-2081.
- 30- Sharma N.N., Sharma M., Bhalla T.C., “An improved nitrilase-mediated bioprocess for synthesis of nicotinic acid from 3-cyanopyridine with hyperinduced Nocardia globerula NHB-2” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **2011**, *38*, 1235-1243.
- 31- Kobayashi M., Nagasawa T., Yamada H., “Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1” *Eur. J. Biochem.*, **1989**, *182*, 349-356.
- 32- Klempier N., Raadt A., Faber K., Grieng H., “Selective transformation of nitriles into amides and carboxylic acids by an immobilized nitrilase” *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 341-344.
- 33- Kisiak C., Conradt D., Stolz A., Mattes R., Klein J., “Nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191: cloning and heterologous expression of the gene and biochemical characterization of the recombinant enzyme” *Microbiology*, **2005**, *151*, 3639-3648.
- 34- Yamamoto K., Ueno Y., Otsubo K., Kawakami K., Komatsu K.I., “Production of S-(+)-Ibuprofen from a Nitrile Compound by *Acinetobacter* sp. Stain AK226” *Appl. Env. Microbiol.*, **1990**, *10*, 3125-3129.
- 35- Kim J.S., Tiwari M.K., Moon H.J., Jeya M., Ramu T., Oh D.K., Kim I.W., Lee J.K., “Identification and characterization of a novel nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2009**, *83*, 273-283.
- 36- Mueller P., Egorova K., Vorgias E.C., Boutou E., Trauthwein H., Verseck S., Antranikian G., “Cloning, overexpression, and characterization of a thermoactive nitrilase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*” *Prot. Express. Purif.*, **2006**, *47*, 672-681.
- 37- Zhu D., Mukherjee C., Yang Y., Rios E.B., Gallagher D.D.T., Smith N.N., Biehl E.R., Hua L., “A new nitrilase from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 Gene cloning, biochemical characterization and substrate specificity” *J. Biochem.*, **2008**, *133*, 327-333.
- 38- Rey P., Rossi J.C., Taillades J., Gros G., Nore O., “Hydrolysis of Nitriles Using an Immobilized Nitrilase: Applications to the Synthesis of Methionine Hydroxy Analogue Derivatives” *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 8155-8162.
- 39- Chauhan S., Wu S., Blumerman S., Fallon R.D., Gavagan J.E., DiCosimo R., Payne M.S., “Purification, cloning, sequencing and over-expression in *Escherichia coli* of a regioselective aliphatic nitrilase from *Acidovorax facilis* 72W” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2003**, *61*, 118-122.
- 40- Bergeron S., Chaplin D.A., Edwards J.H., Ellis B.S.W., Hill C.L., Holt-Tiffin K., Knight J.R., Mahoney T., Osborne A.P., Ruecroft G., “Nitrilase-Catalysed Desymmetrisation of 3-Hydroxyglutaronitrile: Preparation of a Statin Side-Chain Intermediate” *Org. Process. Res. Dev.*, **2006**, *10*, 661-665.
- 41- Zhu D., Mukherjee C., Biehl E.R., Hua L., “Nitrilase-Catalyzed Selective Hydrolysis of Dinitriles and Green Access to the Cyanocarboxylic Acids of Pharmaceutical Importance” *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, *349*, 1667-1670.
- 42- Xie Z., Feng J., Garcia E., Bennett M., Yazbeck D., Tao J., “Cloning and optimization of a nitrilase for the synthesis of (3S)-3-cyano-5-methyl hexanoic acid” *J. Mol. Catal. B Enz.*, **2006**, *41*, 75-80.
- 43- Brady D., Beeton A., Zeevaart J., Kgaje C., Rantwijk V.F., Sheldon R.A., “Characterisation of nitrilase and nitrile hydratase Biocatalytic systems” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2004**, *64*, 76-85.
- 44- Vejvoda V., Šveda O., Kaplan O., Přikrylová V., Elišáková V., Himl M., Kubáč D., Pelantová H., Kuzma M., Křen V., Martínková L., “Biotransformation of heterocyclic dinitriles by *Rhodococcus erythropolis* and fungal nitrilases” *Biotechnol. Lett.*, **2007**, *29*, 1119-1124.
- 45- Wu S., Fogiel A.J., Petrillo K.L., Jackson R.E., Parker K.N., DiCosimo R., Ben-Bassat A., O’Keefe D.P., Payne M.S., “Protein Engineering of Nitrilase for Chemoenzymatic Production of Glycolic Acid” *Biotechnol. Bioeng.*, **2008**, *99*, 717-720.

- 46- Zhanga Z.J., Pana J., Liua J.F., Xua J.H., Heb Y.C., Liu Y.Y., "Significant enhancement of (R)-mandelic acid production by relieving substrate inhibition of recombinant nitrilase in toluene–water biphasic system" *J. Biotechnol.*, **2011**, *152*, 24-29.
- 47- Kaul P., Banerjee A., Mayilraj S., Banerjee U.C., "Screening for enantioselective nitrilases: kinetic resolution of racemic mandelonitrile to (R)-(-)-mandelic acid by new bacterial isolates" *Tetrahedron Asym.*, **2004**, *15*, 207-221.
- 48- Ewert C., Lutz-Wahl S., Fischer L., "Enantioselective conversion of  $\alpha$ -arylnitriles by *Klebsiella oxytoca*" *Tetrahedron Asym.*, **2008**, *19*, 2573-2578.
- 49- DeSantis G., Zhu Z., Greenberg W.A., Wong K., Chaplin J., Hanson S.R., Farwell B., Nicholson L.W., Rand C.L., Weiner D.P., Robertson D.E., Burk M.J., "An Enzyme Library Approach to Biocatalysis : Development of Nitrilases for Enantioselective Production of Carboxylic Acid Derivatives" *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 9024-9025.
- 50- Piotrowski M., Schönfelder S., Weiler E.W., "The Arabidopsis thaliana Isogene NIT4 and Its Orthologs in Tobacco Encode b-Cyano-L-alanine Hydratase/Nitrilase" *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 2616–2621.
- 51- Ma D.Y., Wang D.X., Pan J., Huang Z.T., Wang M.X., "Nitrile Biotransformations for the Synthesis of Highly Enantioenriched  $\beta$ -Hydroxy and  $\beta$ -Amino Acid and Amide Derivatives: A General and Simple but Powerful and Efficient Benzyl Protection Strategy To Increase Enantioselectivity of the Amidase" *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 4087-4091.
- 52- Winkler M., Meischler D., Klempier N., "Nitrilase-Catalyzed Enantioselective Synthesis of Pyrrolidine-and Piperidinecarboxylic Acids" *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, *349*, 1475-1480.
- 53- Winkler M., Kaplan O., Vejvoda V., Klempier N., Martínková L., "Biocatalytic application of nitrilases from *Fusarium solani* O1 and *Aspergillus niger* K10" *J. Mol. Catal. B Enz.*, **2009**, *59*, 243-247.
- 54- Winkler M., Knall A.C., Kulterer M.R., Klempier N., "Nitrilases Catalyze Key Step to Conformationally Constrained GABA Analogous  $\gamma$ -Amino Acids in High Optical Purity" *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 7423-7426.
- 55- Kielbasinski P., Rachwalski M., Mikołajczyk M., Rutjes F.P.J.T., "Nitrilase-catalysed hydrolysis of cyanomethyl *p*-tolyl sulfoxide: stereochemistry and mechanism" *Tetrahedron Asym.*, **2008**, *19*, 562-567.
- 56- Benz P., Muntwyler R., Wohlgemuth R., "Chemoenzymatic synthesis of chiral carboxylic acids via nitriles" *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2007**, *82*, 1087-1098.
- 57- Wang M.X., Feng G.Q., "Enantioselective synthesis of chiral cyclopropane compounds through microbial transformation of trans-2-arylcyclopropanecarbonitriles" *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 6501-6505.
- 58- Wang M.X., Feng G.Q., "Nitrile Biotransformation for Highly Enantioselective Synthesis of 3-Substituted 2,2-Dimethylcyclopropanecarboxylic Acids and Amides" *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 621-624.
- 59- Wang M.X., Feng G.Q., "Synthesis of high enantiomeric purity gem-dihalocyclopropane derivatives from biotransformation of nitriles and amides" *Tetrahedron Asym.*, **2004**, *15*, 374-354.
- 60- Choi S.Y., Goo Y.M., "Hydrolysis of the Nitrile group in  $\alpha$ -Aminophenylacetonitrile by Nitrilase ; Development of a New Biotechnology for Stereospecific Production of S- $\alpha$ -Phenylglycine" *Arch. Pharm. Res.*, **1986**, *1*, 45-47.
- 61- Alonso O.M.A., Antunes O.A.C., Oestreicher E.G., "Enantiomerically Pure D-phenylglycine Production using Immobilized *Pseudomonas aeruginosa* 10145 in Calcium Alginate Beads" *J. Braz. Chem. Soc.*, **2007**, *18*, 566-571.
- 62- Wang, M.X., Lin S.J., "Practical and Convenient Enzymatic Synthesis of Enantiopure  $\alpha$ -Amino Acids and Amides" *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 6542-6545.

- 63- Bhalla T.C., Miura A., Wakamoto A., Ohba Y., Furuhashi K., "Asymmetric hydrolysis of  $\alpha$ -aminonitriles to optically active amino acids by a nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* PA-34" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1992**, *37*, 184-190.
- 64- Leng D.H., Wang D.X., Pan J., Huang Z.T., Wang M.X., "Highly Efficient and Enantioselective Biotransformation of Racemic Azetidene-2-carbonitriles and Their Synthetic Applications" *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 6077-6082.
- 65- Koder L.R., Anderson J.L.R., Solomon L.A., Reddy K.S., Moser C.C. & Dutton P.L., "Design and engineering of O<sub>2</sub> transport protein", *Nature*, **2009**, *458*, 305-309.
- 66- Hajos Z.G., Parrish D.R., "Asymmetric synthesis of bicyclic intermediates of natural product chemistry", *J. Org. Chem.*, **1974**, *39*, 1615-1621.
- 67- Schriock E., Monroe S.E., Henzl M., Jaffe R.B., "Treatment of endometriosis with a potent agonist of gonadotropin-releasing hormone (nafarelin)" *Fertil. Steril.* **1985**, *44*, 583-588.
- 68- Grunfeld J.P., Landais P., Ferran C., "Treatment of arterial-hypertension with enalapril in patients with renal impairment" *Presse medicinale*, **1985**, *14*, 2213-2214.
- 69- Smith L.S., Nelson M., Naik S., Woten J., "Telaprevir: An NS3/4A Protease Inhibitor for the Treatment of Chronic Hepatitis C" *Annals of pharmacotherapy*, **2011**, *45*, 639-648.
- 70- Singh S., Sieburth S.M.N., "Serine Protease Inhibition by a Silanediol Peptidomimetic" *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 4422-4425.
- 71- Hosseini M., Jiang L., Sorensen H.P., Jensen J.K., Christensen A., Fogh S., Yuan C., Andersen L.M., Huang M.D., Andreasen P.A., Jensen K.J., "Elucidation of the Contribution of Active Site and Exosite Interactions to Affinity and Specificity of Peptidyl Serine Protease Inhibitors Using Non-Natural Arginine Analogs" *Mol. Pharm.*, **2011**, *80*, 585-59.
- 72- Strecker A., "Ueber die künstliche Bildung der Milchsäure und einen neuen, dem Glycocoll homologen Körper" *Annalen der Chemie und Pharmazie*, **1850**, *75*, 27-45.
- 73- Gabriel S., "Ueber eine Darstellung primärer Amine aus den entsprechenden Halogenverbindungen" *Berichte*, **1887**, *20*, 2224.
- 74- (a) Hell C., "Ueber eine neue Bromirungsmethode organischer Säuren" *Berichte*, **1881**, *14*, 891-893.  
 (b) Volhard J., "Ueber Darstellung  $\alpha$ -bromirter Säuren" *Annalen der Chemie*, **1887**, *242*, 141-163.  
 (c) Zelinsky N., "Ueber eine bequeme Darstellungsweise von  $\alpha$ -Brompropionsäureester", *Berichte*, **1887**, *20*, 2026.
- 75- Groth U., Schmeck C., Schöllkopf U., "Asymmetric synthesis of  $\alpha$ -amino acid benzyl esters via bisbenzyl bislactim ether of cyclo(-L-Val-Gly-)" *Liebigs Ann. Chem.*, **1993**, 321-323.
- 76- Oppolzer W., Moretti R., Zhou C., "Asymmetric Alkylations of a Sultam-Derived Glycine Equivalent: Practical preparation of enantiomerically pure  $\alpha$ -amino acids" *Helv. Chim. Acta*, **1994**, *77*, 2363-2380.
- 77- Xu P-F., Chen Y-S., Lin S-I., Lu T-J., "Chiral Tricyclic Iminolactone Derived from (1R)-(+)-Camphor as a Glycine Equivalent for the Asymmetric Synthesis of  $\alpha$ -Amino Acids" *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 2309-2314.
- 78- Nájera C., Sansano J.M., "Catalytic Asymmetric Synthesis of  $\alpha$ -Amino Acids" *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 4584-4671.
- 79- Vineyard B.D., Knowles W.S., Sabacky M.J., Bachman G.L., Weinkauff D.J., "Asymmetric Hydrogenation. Rhodium Chiral Bisphosphine Catalyst" *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 5946-5952.
- 80- [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2001/advanced\\_chemistryprize2001.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2001/advanced_chemistryprize2001.pdf)
- 81- Iyer M.S., Gigstad K.M., Namdev N.D., Lipton M., "Asymmetric Catalysis of the Strecker Amino Acid Synthesis by a Cyclic Dipeptide" *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 4910-4911.



- 82- Kubo A., Kubota H., Takahashi M., Nunami K.I., "Dynamic kinetic resolution utilizing 2-oxoimidazolidine-4-carboxylate as a chiral auxiliary: Stereoselective synthesis of  $\alpha$ -amino acids by Gabriel reaction" *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 4957-4960.
- 83- Arosio D., Caligiuri A., D'Arrigo P., Pedrocchi-Fantoni G., Rossi C., Saraceno C., Servi S., Tessarola D., "Chemo-Enzymatic Dynamic Kinetic Resolution of Amino Acid Thioesters" *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, *349*, 1345-1348.
- 84- Schichl D.A., Enthaler S., Holla W., Riermeier T., Kragl U., Beller M., "Dynamic Kinetic Resolution of  $\alpha$ -Amino Acid Esters in the Presence of Aldehydes" *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 3506-3512.
- 85- Olivieri R., Fascetti F., Angelini L., Degen L., "Microbial transformation of racemic hydantoins to D-amino acids" *Biotechnol. Bioeng.*, **1981**, *23*, 2173-2183.
- 86- Pietzsch M., Syltatk C., Drauz K., Waldmann H., "Hydrolysis and Formation of Hydantoins", *Enz. Catal. Org. Synth.*, **2002**, *2*, 761.
- 87- Ogawa J., Soong C.L., Kishino S., Li Q.S., Horinouchi N., Shimizu S., "Screening and industrial application of unique microbial reactions involved in nucleic acid and lipid metabolisms" *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2004**, *70*, 574-582.
- 88- Bommarius A.S., Drauz K., Klenk H., Wandrey C., "Operational stability of enzymes" *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1992**, *672*, 126-136.
- 89- Yasukawa K., Hasemi R., Asano Y., "Dynamic Kinetic Resolution of  $\alpha$ -Aminonitriles to form Chiral  $\alpha$ -Amino Acids" *Adv. Synth. Catal.*, **2011**, *353*, 2328-2332.
- 90- Alexandre F.R., Pantaleone D.P., Taylor P.P., Fotheringham I.G., Ager D.J., Turner N.J., "Amine-boranes: effective reducing agents for the deracemisation of DL-amino acids using L-amino acid oxidase from *Proteus myxofaciens*" *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 707-710.
- 91- Enright A., Alexandre F.R., Roff G., Fotheringham I.G., Dawson M.J., Turner N.J., "Stereoinversion of  $\beta$ - and  $\gamma$ -substituted  $\alpha$ -amino acids using a chemo-enzymatic oxidation-reduction procedure" *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **2003**, 2636-2637.
- 92- Fotheringham I.G., Taylor P.P., Ton J.L., "preparation of D-amino acids by direct fermentative means" *US Patent 5,728,555*, **1998**.
- 93- (a) Behrens G.A., Hummel A., Padhi S.K., Schätzle S., Bornscheuer U.T., "Discovery and Protein Engineering of biocatalysts for organic synthesis" *Adv Synth Catal.*, **2011**, *353*, 2191-2215.  
 (b) Aslanidis C., de Jong P.J., "Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR)" *Nucleic Acids Res.*, **1990**, *20*, 6069-6074.
- 94- Chandia N.P., Canales J.C., Azocar I., Vanlaer S., Pawar V.G., De Borggraeve W.M., Costamagna J., Dehaen W., "Synthesis of 5,5-Dialkyl-6,6'-dichloro-2,2'-bipyridines" *Synth. Comm.*, **2009**, *39*, 9024-9025.
- 95- Kamila S., Zhu D., Biehl E.R., Hua L., "Unexpected Stereorecognition in Nitrilase-Catalyzed Hydrolysis of  $\beta$ -Hydroxy Nitriles" *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 4429-4431.
- 96- DeSantis G., Zhu Z., Greenberg W.A., Wong K., Chaplin J., Hanson S.R., Farwell B., Nicholson L.W., Rand C.L., Weiner D.P., Robertson D.E., Burk M.J., "An Enzyme Library Approach to Biocatalysis : Development of Nitrilases for Enantioselective Production of Carboxylic Acid Derivatives" *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 9024-9025.
- 97- Chini M., Crotti P., Favero L., Macchia F., "Easy direct stereo- and regioselective formation of  $\beta$ -hydroxy nitriles by reaction of 1,2-epoxides with potassium cyanide in the presence of metal salts" *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 4775-4778.
- 98- Matamá T., Carneiro F., Caparrós C., Gübitz G. M., Paulo A.C., "Using a nitrilase for the surface modification of acrylic fibres" *Biotechnol. J.*, **2007**, *2*, 353-360.
- 99- Ilisz I., Berkecz R., Péter A., "Application of chiral derivatizing agent in the high-performance liquid chromatographic separation of amino acid enantiomers: A review" *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2008**, *47*, 1-15.

- 100- Banerjee A., Kaul P., Sharma R., Banerjee U.C., "A high-throughput amenable colorimetric assay for énantiosélective screening of nitrilase-producing microorganisms using pH sensitive indicators" *J. Biomol. Screen.*, **2003**, 8, 559-565.
- 101- a) Zhu D., Mukherjee C., Biehl E.R., Hua L., "Nitrilase-Catalyzed Selective Hydrolysis of Dinitriles and Green Access to the Cyanocarboxylic Acids of Pharmaceutical Importance" *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, 349, 1667-1670.  
 b) Mukherjee C., Zhu D., Biehl E.R., Hua L., "Exploring the Synthetic Applicability of a Cyanobacterium Nitrilase as Catalyst for Nitrile Hydrolysis" *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 5238-5242.  
 c) Rey P., Rossi J.C, Taillades J., Gros G., Nore O., "Hydrolysis of nitriles using an immobilized nitrilase: applications to the synthesis of methionine hydroxyl analogue derivatives" *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 8155-8162.
- 102- Shekhter O.V., Kuklenkova O.B., Sergovskaya N.L., Tsizin Y.S., "A new synthesis 2-acyl-1,2,3,6,7,11 b -hexahydropyrazino[2,1- a ]isoquinolin-4-ones based on N-cyanomethyl derivatives of 2-phenyl-ethylamides of acylglycines" *Chem. Heterocycl. Compds.*, **1993**, 29, 170-173.
- 103- Berk H.C., Franczyk II T.S., Weisenfeld R.B., Morgenstern D.A., Arhancet J.P., Moench J.R.W.L., Peterson J.C. *Patent US2002/19565 A1*, **2002**.
- 104- López-Serrano J., Jongejan J.A., Rantwijk V.F., Sheldon R.A. "Enantioselective acylation of  $\alpha$ -aminonitriles catalysed by *Candida antarctica* lipase. An unexpected turnover-related racemization" *Tetrahedron Asymm.*, **2001**, 12, 219-228.
- 105- Khuong M., Ghanshyam P. "Facile Synthesis of  $\alpha$ -aminonitriles" *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 4583-4586.
- 106- Ressler C., Nagarajan G.R., Kirisawa M., Kashelkar D.V., "Synthesis and Properties of  $\alpha$ -Cyanoamino Acids.  $\alpha$ -Cyanoglycine, L- $\beta$ -Cyano- $\beta$ -alanine, and L- $\gamma$ -Cyano- $\gamma$ -aminobutyric Acid" *J. Org. Chem.*, **1971**, 36, 3960-3966.
- 107- Shoup T.S., Baker D.C., Coutts S.M., Fe R.S., Hand E.S., "Substituted dibenzofurans and methods of using same" *U.S. Patent US5019573 A1*, **1991**.
- 108- McLaughlin M., Mohareb R.M., Rapoport H., "An Efficient Procedure for the Preparation of 4-Substituted 5-Aminoimidazoles" *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 50-54.
- 109- Routier S., Bernier J.L., Waring M.J., Colson P., Houssier C., Bailly C. "Synthesis of a Functionalized Salen-Copper Complex and its Interaction with DNA" *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 2326-2331.
- 110- Chatterjee M.N., Kay E.R., Leigh D.A., "Beyond Switches: Ratcheting a Particle Energetically Uphill with a Compartmentalized Molecular Machine" *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 4058-4073.
- 111- Pinder R.M., Burger A., Ariëns E.J., "m- and p-Hydroxy-1 cyanophenethylamines" *Arzneimittel Forschung*, **1970**, 20, 245-246.
- 112- Hirose T., Sunazuka T., Zhi-Ming T., Handa M., Uchida R., Shiomi K., Harigaya Y., Omura S., "Total Syntheses of Kurasoins A and B, Novel Protein Farnesyltransferase Inhibitors, and Absolute Structures of Kurasoins A and B" *Heterocycles*, **2010**, 53, 777-784.
- 113- Moore S., Stein W., "A Modified Ninhydrin Reagent For The Photometric Determination of Amino acids and related compounds" *J. Biol. Chem.*, **1954**, 211, 907-913.
- 114- Lee. S.W., Lim J.M., Bhoo S.H., Paik Y.S., Hahn T.R., "Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*" *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 480, 267-274.
- 115- Dean K.E.S., Klein G., Renaudet O., Reymond J.L., "A Green Fluorescent Chemosensor for Amino Acids Provides a Versatile High-Throughput Screening (HTS) Assay for Proteases" *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 1653-1656.
- 116- Li Z., Qin J., Zhang L., Lou X., "Colorimetric sensing of  $\alpha$ -amino acids and its application for the "label free" detection of protease" *Langmuir lett.*, **2010**, 26, 1566-1569.

- 117- Duchateau A.L.L., Hillemans-Crombach M.G., Dujnhoven A.V., Reiss R., Sonke T., "A colorimetric method for determination of amino amidase activity" *Anal. Biochem.*, **2004**, *330*, 362-364.
- 118- Péter A., Berkecz R., Ilisz I., "Application of chiral derivating agents in the high-performance liquid chromatographic separation of amino acid enantiomers: A review" *J. Phar. Biomed. Anal.*, **2008**, *47*, 1-15.
- 119- Péter A., Vékes E., Török G., "Application of (S)-N-(4-Nitrophenoxycarbonyl) phenylalanine methoxyethyl ester as a new chiral derivatizing agent for proteinogenic amino acid analysis by high-performance liquid chromatography" *Chromatographia*, **2000**, *52*, 821-826.
- 120- Péter A., Vékes E., Tóth G., Tourwé D., Borremans F.I., "Application of a new chiral derivatizing agent to the enantioseparation of secondary amino acids" *J. Chrom. A*, **2002**, *948*, 283-294.
- 121- Wiśniewski K., Car H., "(S)- 3,5-DHPG: a review" *CNS Drug Rev.*, **2002**, *1*, 101-116.
- 122- Shinoda Y., Tanaka T., Yoshino K.T., Ogura A., "Persistent synapse loss induced repetitive LTD in developing rat hippocampal neurons" *Plos one*, **2010**, *5*, 1-6.
- 123- Eisai RandD Management Co, "hydrazide derivatives" Ltd EP1810965 A1, **2007**.
- 124- Bristol-Myers Squibb Company US2010/227894 A1, **2010**.
- 125- a) Exelis, Inc WO2009/55077A1, **2009**. b) Abbot Laboratories, US2010/29686 A1, **2010**.
- 126- Wang H., Byun Y., Barinka C., Pullambhatla M., Bhang H.E.C, Fox J.J., Lubkowski J., Mease R.C., Pomper M.G., "Bioisosterism of urea-based GCPII inhibitors: Synthesis and structure-activity relationship studies" *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 392-397.
- 127- Khuong M., Ghanshyam P., "Facile Synthesis of  $\alpha$ -aminonitriles" *Tetrahedron Lett.*, **1984**, *25*, 4583-4586.
- 128- Chandia N.P., Canales J.C., Azocar I., Vanlaer S., Pawar V.G., De Borggraeve W.M., Costamagna J., Dehaen W., "Synthesis of 5,5-Dialkyl-6,6'-dicholoro-2,2'-bipyridines" *Synth. Comm.*, **2009**, *39*, 927-939.
- 129- Chini M., Crotti P., Favero L., Macchia F., "Easy direct stereo- and regioselective formation of  $\beta$ -hydroxy nitriles by reaction of 1,2-epoxides with potassium cyanide in the presence of metal salts" *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 4775-4778.
- 130- Itoh T., Mitsukura K., Kanphai W., Takagi Y., Kihara H., Tsukube H., "Thiacrown Ether Technology in Lipase-Catalyzed Reaction: Scope and Limitation for Preparing Optically Active 3-Hydroxyalkanenitriles and Application to Insect Pheromone Synthesis" *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 9165-9172.
- 131- Cho Y.J., Kim H.Y., Huang H., Slutsky A., Minko I.G., Wang H., Nechev L.V., Kozekov I.D., Kozekova A., Tamura P., Jacob J., Voehler M., Harris T.M., Lloyd R.S., Rizzo C.J., Stone M.P., "Spectroscopic characterization of interstrand carbinolamine cross-links formed in the 5'-CpG-3' sequence by the acrolein-derived  $\gamma$ -OH-1,N<sup>2</sup>-propano-2'-deoxyguanosine DNA adduct." *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 17686-17696.
- 132- Williams P.G., Yoshida W.Y., Moore R.E., Paul V.J., "Isolation and Structure Determination of Obyanamide, a Novel Cytotoxic Cyclic Depsipeptide from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya confervoides*" *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 29-31.
- 133- Benalil A., Carboni B., Vaultier M., "Synthesis of 1,2-aminoazides. Conversion to unsymmetrical vicinal diamines by catalytic hydrogenation or reductive alkylation with dichloroboranes" *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 8177-8194.
- 134- Caputo R., Cassano E., Longboard L., Palumbo G., "Synthesis of Enantiopure N- and C-Protected Homo- $\beta$ -Amino Acids by Direct Homologation of  $\alpha$ -Amino Acids" *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 12337.
- 135- DeSantis G., Zhu Z., Greenberg W.A., Wong K., Chaplin J., Hanson S.R., Farwell B., Nicholson L.W., Rand C.L., Weiner D.P., Robertson D.E., Burk M.J. "An Enzyme Library

- Approach to Biocatalysis: Development of Nitrilases for Enantioselective Production of Carboxylic Acid Derivatives” *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 9024-9025.
- 136- Dickschat A., Studer A., “Radical Addition of Arylboronic Acids to Various Olefins under Oxidative Conditions” *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 3972-3974.
- 137- Chubb N., Logan A., Critcher D., Eshelby J., Lunn G., Rudge A., Walshe N., “Antiparasitic terpene alkaloids” *U.S. Patent US WO2004/72086A2*, **2004**.
- 138- Madar J., Djuric S.W., Michmerhuizen M.J., Li X., Kopecka H.A., Longenecker K.L., Pei Z., Pireh D., Sham H.L., Stewart K.D., Szczepankiewicz B.G., Wiedeman P.E., Yong H., “Pharmaceutical compositions as inhibitors of dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV)” *U.S. Patent 2005/0215784 A1*, **2005**.
- 139- Baell J., Bui C.T., “Heterocyclic compounds and methods of use” *U.S. Patent US2010/0210622 A1*, **2010**.
- 140- Storm D.R., Koshland D.E., “An Indication of the Magnitude of Orientation Factors in Esterification” *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *96*, 5805-5814.
- 141- Molander G.A., Petrillo D.E., “Oxidation of Hydroxyl-Substituted Organotrifluoroborates” *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 9634-9635.
- 142- Kitaguchi H., Komazawa H., Kojima M., Mori H., Nishikawa N., Satoh H., Orikasa A., Ono M., Azuma I., Saiki I., “Tumor metastasis inhibiting compounds and methods” *U.S. Patent US5436221 A1*, **1995**.
- 143- Pritz S., Pätzel M., Szeimies G., Dathe M., Bienert M., “Synthesis of a chiral amino acid with bicyclo [1.1.1] pentane moiety and its incorporation into linear and cyclic antimicrobial peptides” *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 1789-1794.
- 144- Reddy R., Jaquith J.B., Neelagiri V.R., Saleh-Hanna S., Durst T., “Asymmetric Synthesis of the Highly Methylated Tryptophan Portion of the Hemiasterlin Tripeptides” *Org. Lett.*, **2002**, *4*, 695-697.
- 145- Shoup T.S., Baker D.C., Coutts S.M., Fe R.S., Hand E.S., “Substituted dibenzofurans and methods of using same” *U.S. Patent US5019573 A1*, **1991**.
- 146- Iida K., Kajiwara M., Label J., “Synthesis of <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N multilabeled 5-aminolevulinic acid” *Compd. Radiopharm.*, **2002**, *45*, 139-143.
- 147- Khimich G.N., Tennikova T.B., “Synthesis of a Methacrylic Monomer Containing an L-Lysine-Based Dendron” *Russ. J. Appl. Chem.*, **2005**, *78*, 1003-1007.
- 148- Shon I., Szirtes T., Tam & Oberhardt, Csehi A. “Sodium-liquid ammonia reduction of carboxamides to alcohols” *J. Org. Chem.*, **1985**, *48*, 1916-1919.
- 149- Mangette J.E., Johnson M.R., Le V.D., Shenoy R.A., Roark H., Stier M., Belliotti T., Capiris T., Guzzo P.R., “The preparation of optically active α-amino 4H-[1,2,4]oxadiazol-5-ones from optically active α-amino acids” *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 9536-9541.
- 150- Lee B.H., Miller M.J., Prody C.A., Neilandst J.B., “Artificial Siderophores. 1. Synthesis and Microbial Iron Transport Capabilities” *J. Med. Chem.*, **1985**, *24*, 317-323.
- 151- Kitagawa O., Hashimoto A., Kobayashi Y., Taguchi T., “Michael addition of 2,2 difluoroketene silyl acetal. Preparation of 4,4 difluoroglutamic acid and 5,5 difluorolysine” *Chem. Lett.*, **1990**, 1307-1310.
- 152- Frigerio M., Santagostino M., “A mild oxidizing reagent for alcohols and 1,2-diols : o-iodoxybenzoic acid (IBX) in DMSO” *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 8019-8022.
- 153- Ermolat’ev D.S., Bariwal J.B., Steenackers H.P.L., De Keersmaecker S.C.J., Van der Eycken E.V., “Concise and Diversity-Oriented Route toward Polysubstituted 2-Aminoimidazole Alkaloids and Their Analogues” *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 9465 -9468.
- 154- Jeewoo L., Ji-Hye K., Kee-Chung H., Yerim K., Su Yeon K., Hae-Suk Y., Inhee M.J., Hee K., Jee Hye Lo H., Hee Jin H., Young Ho K. *et al.*, “Pharmacophore-based virtual screening: The discovery of novel methionyl-tRNA synthetase inhibitors” *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 2022-2031.

- 155- Cordi A.A., Berque-Bestel I., Persigand T., Lacoste J.M., Newman-Tancredi A., Audinot V., Millan M.J., "Potential Antidepressants Displayed Combined  $\alpha_2$  Adrenoceptor Antagonist and Monoamine Uptake Inhibitor Properties" *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 787-805.
- 156- Wang H., Byun Y., Barinka C., Pullambhatla M., Bhang H.E.C, Fox J.J., Lubkowski J., Mease R.C., Pomper M.G., "Bioisosterism of urea-based GCPII inhibitors: Synthesis and structure–activity relationship studies" *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 392-397.
- 157- Chu G.H., Gu M., Gerard B., Dolle R.E. "Development of a New  $\alpha$ -Aminonitrile Synthesis" *Synth. Comm.*, **2004**, *34*, 4583-4590.

# ANNEXES

# ANNEXES

**Annexe 1 : tableau récapitulatif : nitrilases/organismes/annotations**

Nitrilases	Organisme	Annotation
NIT_4_A01	Thermoplasma_volcanium	
NIT_4_A02	Burkholderia_ambifaria	
NIT_4_A03	Ralstonia_pickettii	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_4_A04	Pelobacter_carbinolicus	Putative amidohydrolase
NIT_4_A05	Bacillus_clausii	Methylthioribose recycling protein
NIT_4_A06	Lactobacillus_helveticus	Putative uncharacterized protein
NIT_4_A07	Leuconostoc_citreum	Putative amidohydrolase
NIT_4_A08	Acinetobacter_baumannii	
NIT_4_A09	Wolinella_succinogenes	Putative Hydrolase/amidohydrolase
NIT_4_A10	Plesiocystis_pacifica	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_4_A11	Geobacter_sulfurreducens	
NIT_4_A12	Lactobacillus_reuteri	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_4_B01	Parvibaculum_lavamentivorans	
NIT_4_B02	Shewanella_sediminis	Nitrilase
NIT_4_B03	Burkholderia_xenovorans	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_4_B04	Photorhabdus_luminescens	Putative nitrilase
NIT_4_B05	Acidiphilium_cryptum	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_4_B06	Sphingomonas_wittichii	Nitrilase
NIT_4_B07	Zymomonas_mobilis	
NIT_4_B08	Natronomonas_pharaonis	Putative amidase (Aliphatic amidase) 2
NIT_4_B09	Thermobifida_fusca	Putative hydrolase
NIT_4_B10	Bacteroides_thetaiotaomicron	Beta-ureidopropionase
NIT_4_B11	Marinobacter_algicola	Putative amidohydrolase
NIT_4_B12	Dokdonia_donghaensis	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_4_C01	Geobacillus_kaustophilus	
NIT_4_C02	Sphingopyxis_alaskensis	



NIT_4_C03	Rhodobacter_sphaeroides	
NIT_4_C04	Thermus_thermophilus	Putative uncharacterized protein
NIT_4_C05	Bacillus_cereus	
NIT_4_C06	Methylobacillus_flagellatus	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_4_C07	Rhizobium_etli	
NIT_4_C08	Ruegeria_pomeroyi	
NIT_4_C09	Parabacteroides_distasonis	
NIT_4_C10	Parvibaculum_lavamentivorans	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_4_C11	Hyperthermus_butylicus	Putative amidohydrolase
NIT_4_C12	Syntrophomonas_wolfei	N-carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase
NIT_4_D01	Lactobacillus_fermentum	Putative uncharacterized protein
NIT_4_D02	Listeria_innocua	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_4_D03	Zymomonas_mobilis	Nitrilase
NIT_4_D04	Lactobacillus_rhamnosus	Putative uncharacterized protein
NIT_4_D05	Mycobacterium_vanbaalenii	Nitrile hydratase
NIT_4_D06	Novosphingobium_aromaticivorans	
NIT_4_D07	Streptococcus_mutans	
NIT_4_D08	Aeropyrum_ Pernix	
NIT_4_D09	Ralstonia_eutropha	
NIT_4_D10	Desulfotalea_psychrophila	Putative uncharacterized protein
NIT_4_D11	Alcanivorax_borkumensis	
NIT_4_D12	Campylobacter_jejuni	
NIT_4_E01	Bordetella_petrii	Putative hydrolase
NIT_4_E02	Cytophaga_hutchinsonii	
NIT_4_E03	Hyperthermus_butylicus	Putative amidohydrolase
NIT_4_E04	Acinetobacter_sp.	Putative uncharacterized protein
NIT_4_E05	Pelobacter_carbinolicus	Putative amidohydrolase
NIT_4_E06	Mycobacterium_gilvum	Nitrile hydratase
NIT_4_E07	Pelobacter_propionicus	
NIT_4_E08	Archaeoglobus_fulgidus	Putative uncharacterized protein

NIT_4_E09	<i>Lysinibacillus_sphaericus</i>	Putative amidohydrolase
NIT_4_E10	<i>Rhodospirillum_rubrum</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_4_E11	<i>Chromohalobacter_salexigens</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_4_E12	<i>Chromohalobacter_salexigens</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_4_F01	<i>Hyphomonas_neptunium</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_4_F02	<i>Methanospirillum_hungatei</i>	Porphyromonas-type peptidyl-arginine deiminase
NIT_4_F03	<i>Acidithiobacillus_ferrooxidans</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_4_F04	<i>Acinetobacter_sp.</i>	Nitrile hydratase subunit beta (Nitrilase) (NHase)
NIT_4_F05	<i>Gluconobacter_oxydans</i>	Putative hydrolase
NIT_4_F06	<i>Legionella_pneumophila</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_4_F07	<i>Hyphomonas_neptunium</i>	
NIT_4_F08	<i>Halorhodospira_halophila</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_4_F09	<i>Chromobacterium_violaceum</i>	Putative nitrilase
NIT_4_F10	<i>Sphingopyxis_alaskensis</i>	
NIT_4_F11	<i>Salinibacter_ruber</i>	
NIT_4_F12	<i>Syntrophobacter_fumaroxidans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_4_G01	<i>Ruegeria_pomeroyi</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_4_G02	<i>Nocardia_farcinica</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_4_G03	<i>Sulfolobus_tokodaii</i>	Beta-ureidopropionase
NIT_4_G04	<i>Lactobacillus_plantarum</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_4_G05	<i>Aeromonas_hydrophila</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_4_G06	<i>Bdellovibrio_bacteriovorus</i>	Putative amidohydrolase
NIT_4_G07	<i>Herpetosiphon_aurantiacus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_4_G08	<i>Photorhabdus_luminescens</i>	Putative carbon-nitrogen hydrolase
NIT_4_G09	<i>Salinibacter_ruber</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_4_G10	<i>Streptomyces_avermitilis</i>	Putative hydrolase
NIT_4_G11	<i>Methanocorpusculum_labreanum</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_4_G12	<i>Bradyrhizobium_sp</i>	Formamidase
NIT_4_H01	<i>Pelobacter_propionicus</i>	
NIT_4_H02	<i>Methanosarcina_acetivorans</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein

NIT_4_H03	<i>Pyrococcus_horikoshii</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_4_H04	<i>Neisseria_meningitidis</i>	Nitrilase
NIT_4_H05	<i>Pyrobaculum_islandicum</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_4_H06	<i>Alcanivorax_borkumensis</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_4_H07	<i>Sphingomonas_wittichii</i>	Nitrilase
NIT_4_H08	<i>Ralstonia_eutropha</i>	Nitrilase
NIT_4_H10	Cloaca sc2v2170008	Metagenome-Nitrilase
NIT_5_A01	<i>Streptomyces_avermitilis</i>	Putative hydrolase
NIT_5_A02	<i>Bacillus_licheniformis</i>	Methylthioribose recycling protein
NIT_5_A03	<i>Roseobacter_denitrificans</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_5_A04	<i>Roseobacter_denitrificans</i>	Putative hydrolase
NIT_5_A05	<i>Pelobacter_carbinolicus</i>	Putative amidase
NIT_5_A06	<i>Saccharophagus_degradans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_A07	<i>Bacillus_pumilus</i>	Cyanide hydratase
NIT_5_A08	<i>Chlorobium_tepidum</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_5_A09	<i>Shewanella_baltica</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_A10	<i>Streptomyces_avermitilis</i>	Putative hydrolase
NIT_5_A11	<i>Burkholderia_phymatum</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_A12	<i>Burkholderia_xenovorans</i>	Nitrilase (NitA)
NIT_5_B01	<i>Methanoculleus_marisnigri</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_B02	<i>Roseobacter_denitrificans</i>	Nitrile hydratase subunit beta (Nitrilase) (NHase)
NIT_5_B03	<i>Pelodictyon_luteolum</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_5_B04	<i>Saccharophagus_degradans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_B05	<i>Shewanella_sediminis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_B06	<i>Mycobacterium_abscessus</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_5_B07	<i>Burkholderia_phymatum</i>	Nitrilase
NIT_5_B08	<i>Streptococcus_thermophilus</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_5_B09	digesteur	Putative uncharacterized protein
NIT_5_B10	<i>Clostridium_beijerinckii</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_B11	<i>Burkholderia_phymatum</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase

NIT_5_B12	<i>Pyrobaculum_aerophilum</i>	Putative nitrilase
NIT_5_C01	<i>Prosthecochloris_vibrioformis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_C02	<i>Rhodopirellula_baltica</i>	Beta-alanine synthetase
NIT_5_C03	<i>Methanococcoides_burtonii</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_C04	<i>Sphingomonas_wittichii</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_C05	<i>Pseudomonas_putida</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_5_C06	<i>Bacillus_halodurans</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_5_C07	<i>Rhizobium_etli</i>	Putative amidohydrolase protein
NIT_5_C08	<i>Bradyrhizobium_sp</i>	Putative nitrilase
NIT_5_C09	<i>Sulfolobus_tokodaii</i>	Beta-ureidopropionase
NIT_5_C10	<i>Oceanobacillus_ihayensis</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_5_C11	<i>Flavobacterium_johnsoniae</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_C12	<i>Sodalis_glossinidius</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_5_D01	<i>Pseudoalteromonas_haloplanktis</i>	Beta-ureidopropionase
NIT_5_D02	<i>Rhodoferrax_ferrireducens</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_D03	<i>Corynebacterium_efficiens</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_5_D04	<i>Acinetobacter_sp.</i>	Nitrile hydratase subunit alpha (Nitrilase) (NHase)
NIT_5_D05	<i>Natronomonas_pharaonis</i>	Putative amidase (Aliphatic amidase) 3
NIT_5_D06	<i>Frankia_alni</i>	Putative nitrilase
NIT_5_D07	<i>Natronomonas_pharaonis</i>	Amidase (Aliphatic amidase) 1
NIT_5_D08	<i>Chlorobium_tepidum</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_5_D09	<i>Geobacter_sulfurreducens</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_5_D10	<i>Shewanella_loihica</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_D11	<i>Marinobacter_algicola</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_5_D12	<i>Listeria_monocytogenes</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_5_E01	<i>Roseiflexus_castenholzii</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_E02	<i>Leuconostoc_mesenteroides</i>	Putative amidohydrolase
NIT_5_E03	<i>Bordetella_petrii</i>	Nitrile hydratase subunit beta (Nitrilase) (NHase)
NIT_5_E04	<i>Novosphingobium_aromaticivorans</i>	
NIT_5_E05	<i>Mycobacterium_abscessus</i>	Putative hydrolase

NIT_5_E06	<i>Shewanella denitrificans</i>	
NIT_5_E07	<i>Pyrobaculum arsenaticum</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_E08	<i>Legionella pneumophila</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_5_E09	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	Putative nitrilase
NIT_5_E10	<i>Salinispora tropica</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_E11	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Putative hydrolase
NIT_5_E12	<i>Pseudomonas putida</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_F01	<i>Clostridium kluyveri</i>	Putative nitrilase
NIT_5_F02	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Putative nitrilase/cyanide hydratase
NIT_5_F03	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Amidohydrolase
NIT_5_F04	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_F05	<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_F06	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Putative amidohydrolase
NIT_5_F07	<i>Coprothermobacter proteolyticus</i>	Beta-ureidopropionase
NIT_5_F08	<i>Mycobacterium abscessus</i>	Hypothetical nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_5_F09	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Putative nitrile hydratase beta subunit
NIT_5_F10	<i>Shewanella sediminis</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_5_H10	<i>Cloaca sc2v2170008</i>	Metagenome-Nitrilase
NIT_6_A01	<i>cloaca</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_6_A02	<i>Dokdonia donghaensis</i>	Carbon-nitrogen hydrolase
NIT_6_A03	<i>Clostridium thermocellum</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_A04	<i>Staphylothermus marinus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_A05	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_A06	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_A07	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_A08	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Possible amidohydrolase
NIT_6_A09	<i>Thermosipho melanesiensis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_A10	<i>Thermosipho melanesiensis</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_A11	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_A12	<i>Fervidobacterium nodosum</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase

NIT_6_B01	<i>Thermotoga lettingae</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_B02	<i>Alkaliphilus oremlandii</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_B03	<i>Petrotoga mobilis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_B04	<i>Petrotoga mobilis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_B05	<i>Petrotoga mobilis</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_B06	<i>Clostridium phytofermentans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_B07	<i>Cloacamonas acidaminovorans</i>	Putative beta-ureidopropionase (Beta-alanine synthase) (N-carbamoyl-beta-alanine amidohydrolase) (PycC)
NIT_6_B08	<i>Natranaerobius thermophilus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_B09	<i>Aciduliprofundum boonei</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_6_B10	<i>Clostridium hiranonis</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_6_B11	<i>Eubacterium bifforme</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_6_B12	<i>Carboxydibrachium pacificum</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_6_C01	<i>Halothermothrix orenii</i>	Nitrilase/cyanide hydratase
NIT_6_C02	<i>Halothermothrix orenii</i>	Nitrilase/cyanide hydratase
NIT_6_C03	<i>Halothermothrix orenii</i>	Nitrilase/cyanide hydratase
NIT_6_C04	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_C05	<i>Nautilia profundicola</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_6_C06	<i>Eubacterium hallii</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_6_C07	<i>Persephonella marina</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_C08	<i>Sulfurospirillum deleyianum</i>	Carbon-nitrogen family hydrolase
NIT_6_C09	<i>Sulfurospirillum deleyianum</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_C10	<i>Acidaminococcus fermentans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_C11	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	N-carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase AguB
NIT_6_C12	<i>Deferribacter desulfuricans</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_6_D01	<i>Deferribacter desulfuricans</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_6_D02	<i>Deferribacter desulfuricans</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_6_D03	<i>Aciduliprofundum boonei</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_D04	<i>Denitrovibrio acetiphilus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_D05	<i>Butyrivibrio crossotus</i>	Methylthioribose recycling protein

NIT_6_D06	<i>Butyrivibrio crossotus</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_6_D07	<i>Zunongwangia profunda</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_6_D08	<i>Zunongwangia profunda</i>	Carbon-nitrogen hydrolase
NIT_6_D09	<i>Zunongwangia profunda</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_6_D10	<i>Bacillus megaterium</i>	Carbon nitrogen hydrolase family protein
NIT_6_D11	<i>Bacillus megaterium</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_6_D12	<i>Bacillus megaterium</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_6_E01	<i>Bacillus megaterium</i>	Carbon-nitrogen hydrolase
NIT_6_E02	<i>Bacillus megaterium</i>	N-carbamoylputrescine amidase
NIT_6_E03	<i>Aminobacterium colombiense</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_E04	<i>Brachyspira murdochii</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_E05	<i>Arcobacter nitrofigilis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_E06	<i>Arcobacter nitrofigilis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_E07	<i>Clostridium ljungdahlii</i>	Predicted hydrolase
NIT_6_E08	<i>Clostridium ljungdahlii</i>	Predicted hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_6_E09	<i>Acetohalobium arabaticum</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_E10	<i>Sulfurimonas autotrophica</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_E11	<i>Sulfurimonas autotrophica</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_E12	<i>Bacteriovorax marinus</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_6_F01	<i>Bacteriovorax marinus</i>	Putative carbon-nitrogen hydrolase
NIT_6_F02	<i>Ilyobacter polytropus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_F03	<i>Paludibacter propionigenes</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_F04	<i>Riemerella anatipestifer</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_F05	<i>Calditerrivibrio nitroreducens</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_F06	<i>Calditerrivibrio nitroreducens</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_F07	<i>Calditerrivibrio nitroreducens</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_F08	<i>Marivirga tractuosa</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_F09	<i>Arcobacter butzleri</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_F10	<i>Bacillus cellulosilyticus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_F11	<i>Cellulophaga algicola</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase

NIT_6_F12	<i>Psychroflexus torquis</i>	Putative amidohydrolase
NIT_6_G01	<i>Sulfurimonas denitrificans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_G02	<i>Sulfurimonas denitrificans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_6_G03	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Conserved protein
NIT_6_G04	<i>Borrelia garinii</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase, putative
NIT_6_G05	<i>Picrophilus torridus</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family
NIT_6_G06	<i>Treponema denticola</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_6_G07	<i>Treponema denticola</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_6_G08	<i>Treponema denticola</i>	Glutamine-dependent NAD <sup>+</sup> synthetase, putative
NIT_6_G09	<i>Leptospira interrogans</i>	Predicted amidohydrolase
NIT_6_G10	<i>Thermoplasma volcanium</i>	Putative uncharacterized protein TVG1026247
NIT_6_G11	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Predicted amidohydrolase
NIT_6_G12	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Amidohydrolase, putative
NIT_6_H01	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_6_H02	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_6_H03	cloaca	Putative uncharacterized protein
NIT_6_H04	cloaca	Putative uncharacterized protein
NIT_6_H05	cloaca	Putative uncharacterized protein
NIT_6_H06	cloaca	Putative uncharacterized protein
NIT_6_H07	cloaca	Putative uncharacterized protein
NIT_6_H08	cloaca	Putative uncharacterized protein
NIT_6_H09	cloaca	Putative uncharacterized protein
NIT_7_A01	<i>Methanosaeta thermophila</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_A02	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_A03	<i>Labrenzia aggregata</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_A04	<i>Thermosinus carboxydivorans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_A05	<i>Thermosinus carboxydivorans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_A06	<i>Thermosinus carboxydivorans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_A07	<i>Pyrobaculum islandicum</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_A08	<i>Microscilla marina</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family



NIT_7_A09	<i>Hyperthermus butylicus</i>	Predicted amidohydrolase
NIT_7_A10	<i>Blastopirellula marina</i>	Putative nitrilase
NIT_7_A11	<i>Congregibacter litoralis</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_7_A12	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	Putative nitrilase
NIT_7_B01	<i>Metallosphaera sedula</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_B02	<i>Synechococcus</i> sp.	Nitrilase-related protein
NIT_7_B03	<i>Thermotoga petrophila</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_B04	<i>Planctomyces maris</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_B05	<i>Planctomyces maris</i>	Predicted amidohydrolase
NIT_7_B06	<i>Planctomyces maris</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_B07	<i>Planctomyces maris</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_B08	<i>Bacteroides vulgatus</i>	Putative amidohydrolase
NIT_7_B09	<i>Parabacteroides distasonis</i>	Putative hydrolase
NIT_7_B10	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_B12	<i>Roseiflexus castenholzii</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_C01	<i>Caldivirga maquilingensis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_C02	<i>Caldivirga maquilingensis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_C03	<i>Alkaliphilus oremlandii</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_C04	<i>Clostridium bolteae</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_C05	<i>Clostridium bolteae</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_C06	<i>Desulfococcus oleovorans</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_C07	<i>Anaerostipes caccae</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_C08	<i>Alistipes putredinis</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_C09	<i>Bacteroides stercoris</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_C10	<i>Anaerotruncus colihominis</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_C11	<i>Finegoldia magna</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_C12	<i>Heliobacterium modesticaldum</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_7_D01	<i>Nostoc punctiforme</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_D02	<i>Nostoc punctiforme</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_D03	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Putative amidohydrolase

NIT_7_D04	<i>Erwinia tasmaniensis</i>	Putative hydrolase
NIT_7_D05	<i>Erwinia tasmaniensis</i>	Putative hydrolase
NIT_7_D06	<i>Chlorobium limicola</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_D07	<i>Bacteroides coprocola</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_D08	<i>Rhizobium etli</i>	Putative hydrolase protein
NIT_7_D09	<i>Chloroherpeton thalassium</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_D10	<i>Chloroherpeton thalassium</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_D11	<i>Coprothermobacter proteolyticus</i>	Nitrilase 2, putative
NIT_7_D12	<i>Coprothermobacter proteolyticus</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_7_E01	<i>Providencia alcalifaciens</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_E02	<i>Bacteroides eggerthii</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_E03	<i>Parabacteroides johnsonii</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_E04	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	Predicted amidohydrolase
NIT_7_E05	<i>Halothermothrix orenii</i>	Nitrilase/cyanide hydratase
NIT_7_E06	<i>Desulfurococcus kamchatkensis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_E07	<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_E08	<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_E09	<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_E10	<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_E11	<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_E12	<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_F01	<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_F02	<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_F03	<i>Cyanothece</i> sp.	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_F04	<i>Cyanothece</i> sp.	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_F05	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Beta-ureidopropionase
NIT_7_F06	<i>Agrobacterium vitis</i>	D-N-carbamoylase
NIT_7_F07	<i>Holdemania filiformis</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_F08	<i>Holdemania filiformis</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_F09	<i>Clostridium hylemonae</i>	Putative uncharacterized protein

NIT_7_F10	<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_F11	<i>Clostridium asparagiforme</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_F12	<i>Clostridium methylpentosum</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_G01	<i>Roseburia inulinivorans</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_G02	<i>Dethiobacter alkaliphilus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_G03	<i>Dethiobacter alkaliphilus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_G04	<i>Dethiobacter alkaliphilus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_G05	<i>Dethiobacter alkaliphilus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_G06	<i>Dethiobacter alkaliphilus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_G07	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase family protein
NIT_7_G08	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	Putative aminohydrolase
NIT_7_G09	<i>Actinomyces coleocanis</i>	Apolipoprotein-N-acyltransferase
NIT_7_G10	<i>Bacillus coagulans</i>	Amidase
NIT_7_G11	<i>Lactobacillus brevis</i>	Possible cyanide hydratase
NIT_7_G12	<i>Lactobacillus brevis</i>	Possible N-carbamoylputrescine amidase
NIT_7_H01	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_7_H02	<i>Thermococcus gammatolerans</i>	Carbon-nitrogen hydrolase
NIT_7_H03	<i>Teredinibacter turnerae</i>	Predicted amidohydrolase
NIT_7_H04	<i>Teredinibacter turnerae</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_7_H05	<i>Teredinibacter turnerae</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_7_H06	<i>Kosmotoga olearia</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_H07	<i>Kosmotoga olearia</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_7_H08	<i>Marvinbryantia formatexigens</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_7_H09	<i>Dyadobacter fermentans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_A01	<i>Dyadobacter fermentans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_A02	<i>Dyadobacter fermentans</i>	Amidohydrolase-like protein
NIT_8_A03	<i>Pedobacter heparinus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_A04	<i>Methylobacterium extorquens</i>	Putative nitrilase/amidohydrolase
NIT_8_A05	<i>Chitinophaga pinensis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_A06	<i>Chitinophaga pinensis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase

NIT_8_A07	<i>Chitinophaga pinensis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_A08	<i>Chitinophaga pinensis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_A09	<i>Kangiella koreensis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_A10	<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_A11	<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_A12	<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_B01	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_B02	<i>Mitsuokella multacida</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_8_B03	<i>Dialister invisus</i>	Putative carbon-nitrogen hydrolase
NIT_8_B04	<i>Dialister invisus</i>	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_8_B05	<i>Dialister invisus</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_8_B06	<i>Halothiobacillus neapolitanus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_B07	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_8_B08	<i>Veillonella parvula</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_B09	<i>Serratia odorifera</i>	Putative amidohydrolase
NIT_8_B10	<i>Methanocella paludicola</i>	Putative carbon-nitrogen hydrolase
NIT_8_B11	<i>Thermotoga naphthophila</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_B12	<i>Spirosoma linguale</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_C01	<i>Spirosoma linguale</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_C02	<i>Spirosoma linguale</i>	Nitrilase
NIT_8_C03	<i>Pirellula staleyi</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_C04	<i>Pirellula staleyi</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_C05	<i>Archaeoglobus profundus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_C06	<i>Acidaminococcus fermentans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_C07	<i>Acidaminococcus fermentans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_C08	<i>Dethiosulfovibrio peptidovorans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_C09	<i>Dethiosulfovibrio peptidovorans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_C10	<i>Thermocrinis albus</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_C11	<i>Thermocrinis albus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_C12	<i>Providencia rettgeri</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family

NIT_8_D01	<i>Providencia rettgeri</i>	Putative carbon-nitrogen hydrolase
NIT_8_D02	<i>Denitrovibrio acetiphilus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_D03	<i>Denitrovibrio acetiphilus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_D04	<i>Aminobacterium colombiense</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_D05	<i>Aminobacterium colombiense</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_D06	<i>Coraliomargarita akajimensis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_D07	<i>Planctomyces limnophilus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_D08	<i>Ktedonobacter racemifer</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_D09	<i>Ktedonobacter racemifer</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_D10	<i>Bacillus selenitireducens</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_D11	<i>Bacillus selenitireducens</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_D12	<i>Mobiluncus curtisii</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_E01	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_E02	delta proteobacterium	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_8_E03	delta proteobacterium	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_8_E04	<i>Acidilobus saccharovorans</i>	Predicted amidohydrolase
NIT_8_E05	<i>Thermosediminibacter oceani</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_E06	<i>Corynebacterium matruchotii</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_8_E07	Thermotogales bacterium	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_E08	Thermotogales bacterium	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_E09	Thermotogales bacterium	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_E10	<i>Prevotella marshii</i>	Carbon-nitrogen hydrolase
NIT_8_E11	<i>Vulcanisaeta distributa</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_E12	<i>Spirochaeta smaragdinae</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_F01	<i>Spirochaeta smaragdinae</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_F02	<i>Methanoplanus petrolearius</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_F03	<i>Pseudomonas putida</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_8_F04	<i>Leadbetterella byssophila</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_F05	<i>Leadbetterella byssophila</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_F06	<i>Paludibacter propionicigenes</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase

NIT_8_F07	<i>Sulfuricurvum kujiense</i>	N-carbamoylputrescine amidase
NIT_8_F08	<i>Sulfuricurvum kujiense</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_F09	<i>Sulfuricurvum kujiense</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_F10	<i>Enterococcus italicus</i>	Carbon-nitrogen family hydrolase
NIT_8_F11	<i>Ethanoligenens harbinense</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_F12	<i>Nitratifractor salsuginis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_G01	<i>Nitratifractor salsuginis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_G02	<i>Escherichia coli</i>	conserved hypothetical protein
NIT_8_G03	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_8_G04	<i>Roseobacter denitrificans</i>	Hydrolase, putative
NIT_8_G05	<i>Bermanella marisrubri</i>	Predicted amidohydrolase
NIT_8_G06	<i>Methanospirillum hungatei</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_8_G07	<i>Sodalis glossinidius</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_8_G08	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Putative C-N hydrolase; superfamily UPF0012
NIT_8_G09	<i>Escherichia coli</i>	UPF0012 hydrolase yafV
NIT_8_G10	<i>Colwellia psychrerythraea</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_8_G11	<i>Psychrobacter arcticus</i>	Possible carbon-nitrogen hydrolase
NIT_8_G12	<i>Comamonas testosteroni</i>	Aliphatic nitrilase
NIT_8_H01	<i>Idiomarina loihiensis</i>	Predicted amidohydrolase, nitrilase family
NIT_8_H02	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Putative uncharacterized protein GSB07
NIT_8_H03	<i>Wolinella succinogenes</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_8_H04	<i>Wolinella succinogenes</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_8_H05	<i>Rhodopirellula baltica</i>	Predicted amidohydrolase
NIT_8_H06	<i>Rhodopirellula baltica</i>	Beta-alanine synthetase
NIT_8_H07	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Putative carbon-nitrogen hydrolase
NIT_8_H08	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Putative amidohydrolase
NIT_8_H09	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	Carbon-nitrogen hydrolase
NIT_14_A01	<i>Aeropyrum pernix</i>	Putative carbon-nitrogen hydrolase
NIT_14_A02	<i>Aeropyrum pernix</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_14_A03	cloaca	Putative uncharacterized protein

NIT_14_A04	cloaca	Putative uncharacterized protein
NIT_14_A05	cloaca	Putative uncharacterized protein
NIT_14_A06	Labrenzia aggregata	Putative uncharacterized protein
NIT_14_A07	Mycobacterium smegmatis	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_A08	Pelobacter propionicus	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_A09	Paracoccus denitrificans	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_A10	Paracoccus denitrificans	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_A11	Paracoccus denitrificans	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_A12	Mycobacterium vanbaalenii	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_B01	Verminephrobacter eiseniae	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_B02	Roseovarius nubinhibens	N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase
NIT_14_B03	Roseovarius nubinhibens	Hydrolase, carbon-nitrogen family protein
NIT_14_B04	Roseovarius nubinhibens	Putative uncharacterized protein
NIT_14_B05	Roseovarius nubinhibens	Possible nitrilase
NIT_14_B06	Roseovarius nubinhibens	Putative hydrolase
NIT_14_B07	Oceanicola batsensis	Hydrolase, carbon-nitrogen family protein
NIT_14_B08	Salinispora tropica	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_B09	Salinispora tropica	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_B10	Kineococcus radiotolerans	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_B11	Roseiflexus castenholzii	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_B12	Desulfococcus oleovorans	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_C01	Desulfococcus oleovorans	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_C02	Desulfococcus oleovorans	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_C03	Oceanibulbus indolifex	Putative uncharacterized protein
NIT_14_C04	Xanthomonas campestris	Carbon-nitrogen hydrolase family protein
NIT_14_C05	Burkholderia graminis	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_C06	Kocuria rhizophila	Putative hydrolase
NIT_14_C07	Mycobacterium marinum	Apolipoprotein n-acyltransferase, Lnt
NIT_14_C08	Burkholderia phymatum	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_C09	Burkholderia phytofirmans	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase

NIT_14_C10	<i>Geobacter bemidjiensis</i>	Nitrilase/amidohydrolase superfamily protein, class 8
NIT_14_C11	<i>Oligotropha carboxidovorans</i>	Aliphatic nitrilase
NIT_14_C12	<i>Thermomicrobium roseum</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family protein
NIT_14_D01	<i>Thermomicrobium roseum</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_D02	<i>Lutiella nitroferrum</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_D03	<i>Clostridium methylpentosum</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_14_D04	<i>Corynebacterium lipophiloflavum</i>	Nitrilase/cyanide hydratase
NIT_14_D05	<i>Deinococcus deserti</i>	Putative nitrilase
NIT_14_D06	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_D07	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Hydrolase in PqqF 5' region
NIT_14_D08	<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_14_D09	<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_14_D10	<i>Micrococcus luteus</i>	Predicted amidohydrolase
NIT_14_D11	<i>Ralstonia pickettii</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_D12	<i>Desulfomicrobium baculatum</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_E01	<i>Brachybacterium faecium</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_E02	<i>Brachybacterium faecium</i>	Predicted amidohydrolase
NIT_14_E03	<i>Saccharomonospora viridis</i>	Predicted amidohydrolase
NIT_14_E04	<i>Slackia heliotrinireducens</i>	Predicted amidohydrolase
NIT_14_E05	<i>Kytococcus sedentarius</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_E06	<i>Kytococcus sedentarius</i>	Predicted amidohydrolase
NIT_14_E07	<i>Catenulispora acidiphila</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_E08	<i>Catenulispora acidiphila</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_E09	<i>Jonesia denitrificans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_E10	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	Carbon-nitrogen hydrolase
NIT_14_E11	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	Apolipoprotein n-acyltransferase Lnt/dolichol-phosphate-mannosyl transferase Dpm1
NIT_14_E12	<i>Desulfohalobium retbaense</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_F01	<i>Mitsuokella multacida</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_14_F02	<i>Ammonifex degensii</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_F03	<i>Gordonia bronchialis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase



NIT_14_F04	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_F05	<i>Conexibacter woesei</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_F06	<i>Meiothermus ruber</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_F07	<i>Natrialba magadii</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_F08	<i>Tsukamurella paurometabola</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_F09	<i>Bacillus tusciae</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_F10	<i>Bacillus tusciae</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_F11	<i>Bacillus tusciae</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_F12	<i>Desulfurivibrio alkaliphilus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_G01	<i>Starkeya novella</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_G02	<i>Starkeya novella</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_G03	<i>Starkeya novella</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_G04	<i>Meiothermus silvanus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_14_G05	<i>Meiothermus silvanus</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_14_G06	<i>Meiothermus silvanus</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_A01	<i>Desulfarculus baarsii</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_A02	<i>Ferrimonas balearica</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_A03	<i>Halomonas elongata</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_A04	<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	Putative carbon-nitrogen hydrolase
NIT_15_A05	<i>Rhodomicrobium vannielii</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_A06	<i>Propionibacterium acnes</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_A07	<i>Halogeometricum borinquense</i>	Predicted amidohydrolase
NIT_15_A08	<i>Intrasporangium calvum</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_A09	<i>Pseudomonas entomophila</i>	putative carbon-nitrogen hydrolase
NIT_15_A10	<i>Hyphomonas neptunium</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_15_A11	<i>Roseobacter denitrificans</i>	Hydrolase, putative
NIT_15_A12	<i>Deinococcus geothermalis</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_B01	<i>Deinococcus geothermalis</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_B02	<i>Ralstonia metallidurans</i>	Nitrilase/N-carbamoyl-D-aminoacid amidohydrolase
NIT_15_B03	<i>Chromohalobacter salexigens</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase

NIT_15_B04	<i>Chromohalobacter salexigens</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_B05	<i>Chromohalobacter salexigens</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_B06	Manganese-oxidizing bacterium	Nitrilase
NIT_15_B07	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_B08	<i>Sodalis glossinidius</i>	Putative amidohydrolase
NIT_15_B09	<i>Moorella thermoacetica</i>	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_B10	<i>Pelobacter carbinolicus</i>	Predicted amidohydrolase family protein
NIT_15_B11	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Predicted amidohydrolase
NIT_15_B12	<i>Pseudomonas syringae</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_15_C01	<i>Synechococcus</i> sp.	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_C02	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Probable hydrolase/nitrilase
NIT_15_C03	<i>Caulobacter crescentus</i>	Hydrolase, carbon-nitrogen family
NIT_15_C04	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase
NIT_15_C05	<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase
NIT_15_C06	<i>Persephonella marina</i>	Glutamine-dependent NAD+ synthetase
NIT_15_C07	<i>Clostridium ljungdahlii</i>	Glutamine-dependent NAD(+) synthetase
NIT_15_C08	<i>Legionella pneumophila</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_15_C09	<i>Leptospira interrogans</i>	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase
NIT_15_C10	<i>Microscilla marina</i>	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase
NIT_15_C11	<i>Planctomyces maris</i>	NAD+ synthetase
NIT_15_C12	<i>Akkermansia muciniphila</i>	NAD+ synthetase
NIT_15_D01	<i>Bacteroides eggerthii</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_15_D02	<i>Cyanothece</i> sp.	NAD+ synthetase
NIT_15_D03	<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_15_D04	<i>Actinomyces coleocanis</i>	NAD(+) synthase (Glutamine-hydrolyzing)
NIT_15_D05	<i>Chitinophaga pinensis</i>	NAD+ synthetase
NIT_15_D06	<i>Syntrophothermus lipocalidus</i>	NAD+ synthetase
NIT_15_D07	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Glutamine-dependent NAD(+) synthetase (NAD(+) synthase[glutamine-hydrolyzing])
NIT_15_D08	<i>Oceanibulbus indolifex</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_15_D09	<i>Oligotropha carboxidovorans</i>	Glutamine-dependent NAD(+) synthetase

NIT_15_D10	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_15_D11	<i>Mitsuokella multacida</i>	NAD synthase family protein
NIT_15_D12	<i>Desulfurivibrio alkaliphilus</i>	NAD+ synthetase
NIT_15_E01	<i>Roseobacter denitrificans</i>	Glutamine-dependent NAD(+) synthetase
NIT_15_E02	<i>Chromohalobacter salexigens</i>	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase
NIT_15_E03	<i>Rhodoferax ferrireducens</i>	NAD+ synthetase
NIT_15_E04	<i>Rhizobium etli</i>	NAD(+) synthase (Glutamine-hydrolysing) protein
NIT_15_E05	<i>Cloacamonas acidaminovorans</i>	Putative Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_E06	<i>Legionella pneumophila</i>	Putative uncharacterized protein
NIT_15_E07	<i>Leptospira interrogans</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase 1
NIT_15_E08	<i>Planctomyces maris</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_E09	<i>Desulfococcus oleovorans</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_E10	<i>Chlorobium limicola</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_E11	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_E12	<i>Chitinophaga pinensis</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_F01	<i>Coralimargarita akajimensis</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_F02	<i>Shewanella denitrificans</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_F03	<i>Nitrosococcus oceani</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_F04	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_F05	<i>Oceanibulbus indolifex</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_F06	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase
NIT_15_F07	<i>Geobacter bemidjiensis</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase



## **Annexe 2 : seuils des activités nitrilase par substrat**

