

Amine déshydrogénases pour la synthèse biocatalysée d'amines chirales : recherche, application et évolution

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée au laboratoire Génomique Métabolique du Genoscope,
Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives

École doctorale n°571 Sciences chimiques : molécules, matériaux,
instrumentation et biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse présentée et soutenue à Evry, le 27 Septembre 2018, par

Ombeline Mayol

Composition du Jury :

Erwan Poupon Professeur, Université Paris Sud	Président du jury
Véronique Alphand Directrice de recherche CNRS, ISM2	Rapporteur
Mélanie Hall Chargée de recherche, Université de Graz	Rapporteur
Caroline Emilie Paul Chargée de recherche, Université de Wageningen	Examinateuse
Anne Zaparucha Professeur, Université d'Evry Val d'Essonne	Directrice de thèse
Carine Vergne-Vaxelaire Ingénieur-Chercheur, CEA	Co-Encadrante de thèse

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent à Patrick Wincker et Jean Weissenbach, directeurs du Genoscope qui m'ont permis de réaliser ces trois années de thèse au sein de leur établissement.

Je remercie également Marcel Salanoubat, directeur de l'unité mixte de recherche 8030, pour avoir autorisé les différentes collaborations, séjours, école thématique et congrès. Merci pour les divers financements accordés et la future cafetière dans le bureau des thésards.

Je témoigne toute ma gratitude aux membres de mon jury, Véronique Alphand, Mélanie Hall, Caroline Emilie Paul et Erwan Poupon pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et d'avoir accepté de le juger.

Un grand merci à Anne Zaparucha, ma directrice de thèse, pour la confiance qu'elle a accordée à « une petite creusoise », dès son premier entretien. Je la remercie vivement pour sa bienveillance mais aussi de son soutien et ses conseils à la fois pour le projet et pour l'enseignement.

Mes plus vifs remerciements vont à mon encadrante de thèse Carine Vergne-Vaxelaire. Je la remercie pour la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de ce projet, son écoute, ses conseils et les discussions scientifiques toujours très enrichissants. Je lui exprime ma plus grande admiration pour son remarquable dynamisme, qui a permis l'élaboration de multiples collaborations grâce auxquelles j'ai eu le plaisir d'aborder des domaines variés. Merci pour sa continuelle disponibilité, sa gentillesse et mon approvisionnement en anti-stress.

Merci aux deux derniers membres de la « team CACAO » ; Aurélie Jouënne, pour sa patience et son exceptionnelle créativité pour les synthèses à grande échelle mais surtout pour le soutien sans faille qu'elle m'a apporté tout au long de ces trois années. Chloé Lelièvre, pour son entrain quotidien au cours de cette troisième année mais aussi pour m'avoir encouragée, aidée et supportée dans ces derniers mois difficiles. Un immense merci à toutes pour ces années passées parmi vous !

Je tiens à remercier vivement mes collaborateurs, Pr Gideon Grogan de l'université de York, et Dr Caroline E. Paul de l'université de Wageningen, pour leur accueil chaleureux et le temps qu'ils m'ont consacré lors de mes séjours. Merci pour l'enthousiasme dont ils ont fait preuve à l'égard du projet et les apports aussi bien personnels que professionnels que m'ont procuré ces collaborations. Je remercie également Lilian Beloti (York) pour ses travaux de cristallisation, Han Zuilhof, Willem van Berkel et Adrie Westphal (Wageningen) pour leur accueil et leur aide lors de mon séjour à Wageningen.

Toute ma reconnaissance va à l'ensemble de L'équipe de Criblage des Activités de Bioconversion (LCAB) sans qui ce projet n'aurait pas été possible : Véronique de Berardinis, Jean-Louis Petit, Aline Mariage, Adrien Debard et Virginie Pellouin. Merci à eux pour leur contribution et leur partage de connaissances sur la recherche, la production et le criblage des enzymes. J'ai appris énormément à leur contact. Une mention particulière à Jean-Louis pour son aide inconditionnelle, m'accueillant toujours aussi chaleureusement après mes multiples demandes, par un « Ah non pas encore ! » (« Bienvenue » pour les novices).

Un immense merci à Karine Bastard du Laboratoire d'Analyses Bio-informatiques pour la Génomique Et le Métabolisme (LABGeM) pour notre collaboration concernant les analyses bio-informatiques. Je la remercie vivement pour son extrême gentillesse, sa patience et le temps qu'elle m'a accordé pour nos discussions scientifiques très riches et instructives. Merci à David Vallenet, pour son expertise quant à l'utilisation de MAGE.

Mes remerciements vont également à Alain Perret, Christine Pellé et Peggy Sirvain pour la production en grande quantité des enzymes mais aussi pour leur affabilité. Merci à Alain pour sa disponibilité et ses conseils précieux sur les caractérisations biochimiques.

Je tiens également à remercier L'équipe des Applications (LA) : Madeleine Bouzon, Volker Döring, Anne Berger, Ivan Dubois, Valérie Delmas, pour leur implication dans le projet d'évolution dirigée des enzymes, et qui ont pris le temps de me montrer et m'expliquer les expériences, toujours avec autant de bonté. Je leur témoigne ici ma plus grande sympathie.

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué à rendre la vie au laboratoire aussi agréable et qui m'ont apporté aides et conseils tout au long de ma thèse : Agnès Barbance et Sébastien Chaussonerie, pour les conditions anaérobies et l'utilisation de la boite à gants, Catherine Contrepois pour son aide précieuse dans toutes les démarches administratives, Christophe Lechapelaïs et Laurence Cattolico pour nos discussions musiques et films, Delphine Muselet et Pierre Loïc Saaidi pour l'utilisation de la GC-FID, Franck Anière pour son soutien informatique mais surtout pour toutes ses attentions, Nadia Perchat, pour les caractérisations biochimiques, Pascal Bazire, pour les caractérisations enzymatiques mais aussi co-équipier central dans nos tournois sportifs.

Pour leur bonne humeur, leur soutien et pour tous les moments exceptionnels partagés avec eux, je remercie grandement mes compagnons de route sur le chemin de la thèse : Chloé, Marion C., Marion T., Oriane, Sophia, Dr Tiffany, Thomas, Dr Tristan, Dr William. Je leur souhaite toute la réussite qu'ils méritent dans leur entreprise respective et espère de tout cœur que l'achèvement de ces travaux ne signifie pas celui de notre amitié. Un merci tout particulier à Sophia, pour son infini altruisme, sa sollicitude et tous les petits moments de folie communs ; à Tristan pour sa continue présence. Une

pensée plus spéciale pour Marion T. et Thomas, parce que nous avons traversé, ensemble, ces trois années et les épreuves de ces derniers mois.

Merci aux stagiaires qui ont rythmé la vie du laboratoire : Diane, Grégoire, Hugo, Jérémy, Tiphanie et Yassine, pour leur bonne humeur quotidienne.

Ces trois années ont également été riches de rencontres qui ont participé à les rendre inoubliables :

Mes partenaires badistes, Gaëlle, Martin, mais aussi Adeline, Alexandre, Alexis M., Clémence, François, Gautier, Jean-Baptiste, Kévin, Laëtitia, Marco, Régis, Simon, Sophie.

Mylène, qui au-delà de la musique, et grâce à sa jovialité, son énergie et une inventivité à toute épreuve, m'a emmené dans mes retranchements les plus profonds, fait atteindre voire dépasser mes limites, et m'a donné une confiance que j'ignorais avoir. Merci à tous ceux qui ont contribué à rendre ces instants aussi agréables. Pensées particulières pour Luc, pour tous ces moments musicaux partagés ensemble.

L'Afreubo, avec qui j'ai passé des week-ends ineffables, et où j'ai rencontré des personnes exceptionnelles, Camille, Clémence, Emile, Olivier, Sophie, Victor. Les mots me manquent pour vous dire à quel point vous allez me manquer. Mention spéciale au pupitre de 4^{ème} clarinette-cuillère qui j'espère ne s'arrêtera pas, parce qu'il est le meilleur tout simplement ! Merci à tous ceux qui ont rendu ces lundis soir si spéciaux, Annie, Audrey, Cécile, Claire, Emmanuel et Emmanuel, Eric, Fabienne et Fabienne, Florent, Jean-François, Julien, Maëlle, Pierre C., Rebecka, Tifanie, Xavier et Xavier.

Enfin mes derniers remerciements vont aux personnes à qui je dois ce que je suis aujourd'hui, ma famille. Maman, Papa, Flo et Oph', merci d'être chaque jour à mes côtés, pour votre soutien et votre compréhension. Maman je te dédie ce manuscrit, qui n'aurait jamais existé sans toi.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	3
ABBREVIATIONS.....	15
LISTE DES FIGURES	19
LISTE DES TABLEAUX.....	25
INTRODUCTION	27
CHAPITRE I : ETAT DE L'ART SUR LA SYNTHESE D'AMINES CHIRALES ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE.....	33
1. Synthèses chimiques des amines chirales primaires	35
1.1. Résolution cinétique par cristallisation de sels diastéréoisomériques.....	35
1.2. Obtention d'amines chirales par réduction d'imines.....	37
1.2.1. Hydrogénéation catalytique énantiосélective.....	38
1.2.2. Réduction énantiосélective par organocatalyse.....	39
1.2.3. Réduction par les hydrures	40
1.3. Obtention d'amines chirales par amination réductrice stéréosélective directe	41
1.4. Hydroamination et insertion dans une liaison C-H	42
1.4.1. Hydroamination	43
1.4.2. Insertion C-H	43
1.5. Conclusion	44
2. Synthèses biocatalytiques d'amines chirales	45
2.1. Biocatalyseurs et amines chirales.....	45
2.1.1. Recherche et développement de nouveaux biocatalyseurs	45
2.1.2. Enzymes pour la synthèse d'amines chirales	48
2.2. Lipases	49
2.3. Transaminases	51
2.3.1. Présentation générale	51
2.3.2. Mécanisme réactionnel	52
2.3.3. Synthèse asymétrique et déplacement de l'équilibre thermodynamique	53
2.3.4. Résolution cinétique.....	54
2.3.1. Stéréosélectivité et spectres de substrats.....	55
2.3.2. Conclusion	56
2.4. Aminomutases.....	57
2.4.1. Les aminomutases adénosylcobalamine dépendantes	57
2.4.2. Les aminomutases S-adénosyle méthionine dépendantes	58
2.4.3. Les aminomutases 4-méthylidène imidazole-5-one dépendantes	58
2.5. Ammonia Lyases.....	59
2.6. Oxydo-réductases.....	61
2.6.1. Monoamine Oxidases.....	61
2.6.2. Acide aminé déshydrogénases.....	63
2.6.3. Imine Réductases	64
2.6.3.1. Structure, mécanisme et site actif	65

2.6.3.2. Exemple de réductions catalysées par les IREDs.....	65
2.6.3.3. Amination réductrice catalysée par les réductives aminases	67
2.6.3.4. Conclusion.....	69
2.7. Amine Déshydrogénases	70
2.7.1. Amine Déshydrogénases naturelles	71
2.7.2. Obtention d'AmDHs par ingénierie protéique des AADHs	71
2.7.2.1. Mutation des leucine déshydrogénases (LeuDHs)	72
2.7.2.2. Mutation des PheDHs	74
2.7.2.3. Protéine chimère	76
2.7.3. Cascades enzymatiques	77
2.7.3.1. Couplage ADH/AmDH : réaction redox neutre	77
2.7.3.2. Couplage ADH/AmDH : recyclage orthogonal	78
2.7.3.3. Couplage P450/ADH/AmDH.....	79
2.7.4. Résolution cinétique.....	81
2.7.5. Conclusion.....	82
3. Conclusion et objectifs du projet	82
CHAPITRE II : DECOUVERTE, CARACTERISATION ET UTILISATION DE L'AMINE DESHYDROGENASE DE <i>PETROTOGA MOBILIS</i>	
85	
1. Recherche dans la biodiversité	87
1.1. Approche génomique	87
1.1.1. Sélection des enzymes candidates	87
1.1.2. Production des enzymes et criblage	89
1.1.2.1. Production des enzymes.....	89
1.1.2.2. Criblage	90
1.2. Set de référence et enzymes candidates.....	91
1.3. Criblage et analyse des résultats	92
1.3.1. Test de criblage.....	92
1.3.2. Choix des substrats	93
1.3.3. Résultat du criblage	93
2. Etudes préliminaires des enzymes sélectionnées	95
2.1. Méthodes analytiques	95
2.1.1. Activité spécifique	95
2.1.2. Suivi de la conversion	96
2.1.3. Excès énantiomérique	96
2.2. Choix de l'enzyme d'étude	97
3. Caractérisations biochimiques de DH2B1.....	98
3.1. Souche et contexte génomique.....	98
3.2. Spectre de substrats	99
3.3. Thermoactivité	100
3.4. Thermostabilité	100
3.5. Paramètres cinétiques	101
4. Synthèse biocatalysée de l'acide (4S)-4-aminopentanoïque.....	103
4.1. Optimisation des conditions de synthèse	103
4.1.1. Cofacteur	103
4.1.2. Température.....	104
4.1.3. Système de recyclage	104
4.1.4. Tampon et pH.....	106
4.1.4.1. Nature du tampon et pH.....	106

4.1.4.2. Concentration en tampon	108
4.1.5. Concentration en substrat.....	108
4.1.6. Concentration en enzymes	109
4.1.7. Conclusion de l'optimisation.....	111
4.2. Synthèse à l'échelle semi-préparative	111
5. Activité en présence de cosolvants	112
5.1. Solvants miscibles à l'eau.....	113
5.2. Solvants non miscibles à l'eau	113
6. Analyse structurale	114
6.1. Structure globale	115
6.2. Site actif et mécanisme réactionnel.....	116
6.3. Travaux préliminaires d'ingénierie protéique.....	120
6.4. Modélisation	121
7. Evolution dirigée <i>in vivo</i>.....	123
7.1. Principe d'évolution dirigée <i>in vivo</i> dans le GM3	124
7.1.1. Régime chemostat.....	125
7.1.2. Régime turbidostat.....	125
7.1.3. Régime medium swap.....	126
7.2. Mise en place de l'évolution.....	127
7.2.1. Synthèse des substrats.....	128
7.2.1.1. Synthèse du (4S)-4-aminopentanoate	128
7.2.1.2. Synthèse du (2R,4S)-2,4-diaminopentanoate	128
7.2.2. Tests microbiologiques et mise en culture GM3	129
8. Conclusion	131
CHAPITRE III : EXPLORATIONS ADDITIONNELLES DE LA BIODIVERSITE	133
1. Développements analytiques.....	135
1.1. Suivi des réactions par UHPLC-UV	135
1.1.1. Suivi de la conversion.....	135
1.1.2. Suivi de l'excès énantiomérique.....	136
1.1.2.1. UHPLC-UV.....	136
1.1.2.2. GC-FID chirale.....	136
1.2. Test de criblage	137
1.2.1. Suivi du NADH par fluorimétrie	137
1.2.2. Détection de l'amine formée par fluorimétrie	137
2. Approche par analyse structurale	138
2.1. Définition et recherche du motif 3D	138
2.2. Criblage et résultats	140
3. Approche par comparaison de séquences	141
3.1. Activité Opine Déshydrogénase.....	141
3.1.1. Recherche des gènes des AmDHs naturelles brevetées	141
3.1.2. Criblage des Opine Déshydrogénases.....	143
3.2. Criblage actualisé des 2,4-Diaminopentanoate Déshydrogénases	144
3.3. Homologues aux AmDHs découvertes	146

CHAPITRE IV : CARACTERISATION ET UTILISATION EN SYNTHESE DES AMINE DESHYDROGENASES DECOUVERTES.....149

1.	Caractérisations biochimiques.....	151
1.1.	Spectre de substrats	151
1.1.1.	Substrats carbonylés.....	152
1.1.2.	Source d'amines	154
1.2.	Catalyse de la formation de l'imine ?.....	155
1.3.	Paramètres cinétiques	156
2.	Structures et mécanisme	158
2.1.	Structure générale.....	158
2.2.	Sites actifs	159
2.3.	Mécanisme réactionnel	161
3.	Exemples de trois synthèses d'amines chirales	162
3.1.	Optimisation des conditions de synthèse.....	163
3.1.1.	Choix du cofacteur.....	163
3.1.2.	Tampon réactionnel	164
3.1.2.1.	Nature du tampon	164
3.1.2.2.	Concentration en tampon	165
3.1.3.	Concentration en substrat.....	165
3.1.4.	Concentration en enzymes	166
3.1.4.1.	Réactions avec DH13B5 : 2-/3-méthylcyclohexanone	167
3.1.4.2.	DH13F8.....	170
3.1.5.	Conclusion des optimisations	170
3.2.	Synthèses à l'échelle semi-préparative.....	170
4.	Cascade enzymatique couplant Amine Déshydrogénases et Ene-Reductases.....	171
4.1.	Présentation des Ene-Réductases	172
4.2.	Mise en place de la cascade	172
5.	Conclusion	174

CHAPITRE V : MIMICS DE COFACTEURS NICOTINAMIDES : ALTERNATIVE BIOCATALYTIQUE175

1.	Activité AmDH en présence de cofacteurs synthétiques.....	177
1.1.	Réaction de déamination oxidative	178
1.2.	Réaction d'amination réductrice	179
1.2.1.	Etude des cosolvants	179
1.2.2.	Réactions	180
1.2.3.	Inhibition des AmDHs pas les NCBs	181
2.	Stabilité des cofacteurs.....	182
2.1.	Stabilité des cofacteurs synthétiques	182
2.1.1.	Nature du tampon et pH	182
2.1.2.	Concentration en tampon	184
2.2.	Stabilité des cofacteurs naturels	184
3.	Conclusion	185
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		187

PARTIE EXPERIMENTALE 193

1. Generals.....	195
1.1. Chemicals	195
1.2. Equipments	195
2. Enzyme production	196
2.1. General procedure – LIC method.....	196
2.2. 96 microwell plate generation.....	197
2.3. Small scale purification of enzymes.....	197
2.4. Large scale production	197
2.4.1. General procedure.....	197
2.4.1. Purification of DH2B1 by heat treatment	198
2.5. Production of DH2B1 mutants.....	198
3. Enzymatic activities by spectrophotometric analyses.....	199
3.1. Enzymatic screening assay	199
3.1.1. Screening of DH2 plate (II.1.3.3)	199
3.1.2. Screening of plate generated by 3D-guided structure approach (III.2)	200
3.1.3. Screening of DH12 and DH13 plates (III.3.2)	200
3.1.4. Screening of DH14 plate (III.3.1.2).....	200
3.2. Hits validation.....	200
3.2.1. Hits from screening of plate generated by 3D-guided structure approach (III.2.2)	201
3.2.2. Hits from screening of DH12 and DH13 plates (III.3.2)	201
3.2.3. Hits from screening of DH14 plate (III.3.1.2).....	201
3.2.4. Candidates enzymes for reported natural AmDH activity (III.3.1.1)	202
3.3. Specific activity determination	202
3.3.1. Biochemical characterization of DH2B1 (II.3)	202
3.3.1.1. Substrate scope of DH2B1 (II.3.2)	202
3.3.1.2. Activity vs temperature (II.3.3)	203
3.3.1.3. Thermostability (II.3.4).....	203
3.3.2. DH2B1 mutants and homologs (II.6.2.4).....	203
3.3.3. Biochemical characterization of DH13B5/F8, C3UMY1 and E3CZE3	204
3.3.3.1. Carbonyl substrate scope of DH13B5/F8, C3UMY1 and E3CZE3 (IV.1.1.1).....	204
3.3.3.2. Amine substrate scope of DH13B5/F8, C3UMY1 and E3CZE3 (IV.1.1.2).....	204
3.3.3.4. Effect of pH and number of amine equivalents one activity with C3UMY1 (IV.1.2)	204
3.4. Kinetic parameter determination (II.3.5, II.6.2, IV.1.3).....	204
3.5. Determination of ammonia concentration (II.4.2)	205
3.6. Cosolvant study – (V.1.2.1 – Wageningen).....	205
3.7. Cofactor stability – (V.2.1.1 – Wageningen).....	205
3.8. Reaction with NCBs – (V.1 – Wageningen).....	206
3.9. Study of AmDH inhibition by NCBs (V.1.2.3 - Wageningen).....	206
4. Analytical methods.....	207
4.1. UHPLC-MS (QTrap) confirmation analyses of DH2 screening.....	207
4.2. Spectrofluorimetry	207
4.2.1. Spectrofluorimetric screening without derivatization step (III.1.2.1)	207
4.2.2. Spectrofluorimetric screening with NDA derivatization (III.1.2.2)	207
4.3. Derivatization procedures and UHPLC analyses.....	208
4.3.1. Procedure for derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (DNFB).....	208
4.3.2. Procedure for derivatization with (S)-2-(5-fluoro-2,4-dinitrophenylamino)propanamide (FDAA)	208
4.3.3. Procedure for derivatization with benzoyl chloride (BzCl)	209
4.3.4. UHPLC analysis of 2,4-DAP-containing reaction mixture.....	209

4.4. GC-FID Analyses.....	209
4.4.1. Procedure for acetic anhydride derivatization (for pentan-2-amine 99).....	209
4.4.2. Procedure for trifluoroacetic anhydride derivatisation (2- and 3-methylcyclohexylamine 154 and 66)	
210	
5. Analytical biocatalytic reactions.....	210
5.1. hit validation and ee (ed) determination	210
5.2. Reaction of pentan-2-one with DH2B1 variant N135V/N163V/R161M/H264L.....	211
5.3. Optimization for semi-preparative scale enzymatic reactions	212
5.3.1. Optimization for (4S)-4-aminopentanoate ((4S)-97) biocatalytic synthesis (II.4.1).....	212
5.3.1.1. Cofactor selection	212
5.3.1.2. Temperature without recycling system.....	212
5.3.1.3. Temperature and recycling system	212
5.3.1.4. pH and buffer selection.....	212
5.3.1.5. Buffer concentration	213
5.3.1.6. Substrate concentration.....	213
5.3.1.7. Enzyme concentrations	213
5.3.1.8. 1-mL scale up	214
5.3.2. Optimization for 2- and 3-methylcyclohexylamine (154 and 66) biocatalytic synthesis (IV.3.1) ..	214
5.3.2.1. Cofactor selection	214
5.3.2.2. Buffer selection	214
5.3.2.3. Buffer concentration	215
5.3.2.4. Substrate concentration.....	215
5.3.2.5. Enzyme concentrations	215
5.3.2.6. 1 mL-scale up and kinetic monitoring	215
5.3.3. Optimization for (2S)-pentan-2-amine ((2S)-99) biocatalytic synthesis (IV.3.1)	215
5.3.3.1. Cofactor selection	216
5.3.3.2. Buffer selection	216
5.3.3.3. Buffer concentration	216
5.3.3.4. Substrate concentration.....	216
5.3.3.5. Recycling system optimization	216
5.3.3.6. DH13F8 concentration.....	217
5.3.3.7. Small scale up.....	217
5.3.4. Biocatalytic synthesis of (2R, 4S)-2,4-diaminopentanoate ((2R,4S)-91) (II.7.2.1.2).....	217
5.3.4.1. Substrate concentration.....	217
5.3.4.2. Temperature	217
5.3.4.3. Anaerobic condition.....	217
5.3.4.4. 10-mL scale up	218
5.4. Cascade reaction – (IV.4 – Wageningen).....	218
6. Semi-preparative scale biocatalytic synthesis	218
6.1. Biocatalytic synthesis of (4S)-4-aminopentanoic acid ((4S)-97).....	218
6.2. Biocatalytic synthesis of (2R,4S)-2,4-diaminopentanoate ((2R, 4S)-91)	219
6.3. Biocatalytic synthesis of <i>cis</i> -(1S, 2R)-2-methylcyclohexylamine hydrochloride (154)	219
6.4. Biocatalytic synthesis of <i>cis</i> -(1S, 3R)-3-methylcyclohexylamine hydrochloride ((1S, 3R)-66).....	220
6.5. Biocatalytic synthesis of (2S)-pentan-2-amine hydrochloride (S)-99	221
7. In vivo directed evolution.....	221
7.1. Toxicity and growth assay (II.7.2.2)	221
7.2. Evolution assay (II.7.2.2)	222
8. Bio-informatic analyses.....	222
9. Chromatograms and spectra	224
9.1. Kinetic parameters.....	224
9.1.1. DH2B1	224
9.1.2. Mutants.....	225

9.1.3. DH13B5	226
9.1.4. DH13F8.....	227
9.1.5. C3UMY1.....	228
9.2. UHPLC-UV	229
9.2.1. DNFB – 4-aminopentanoate (97)	229
9.2.2. FDAA condition F – 4-aminopentanoate (97)	229
9.2.3. FDAA - condition G	230
9.2.4. D-ornithine (113) and 91.....	230
9.2.5. BzCl - Condition H	231
9.2.6. BzCl (Condition I) – 99, 154 and 66	233
9.3. Chiral GC-FID	234
9.3.1. <i>cis</i> -(<i>1S</i> , <i>2R</i>)-2-methylcyclohexylamine hydrochloride ((<i>1S</i> , <i>2R</i>)-154).....	234
9.3.2. <i>cis</i> -(<i>1S</i> , <i>3R</i>)-3-methylcyclohexylamine hydrochloride ((<i>1S</i> , <i>3R</i>)-66).....	235
9.3.3. (<i>2S</i>)-Pantan-2-amine hydrochloride ((<i>2S</i>)-99).....	235
9.4. NMR	236
9.4.1. (<i>4S</i>)-4-aminopentanoic acid ((<i>4S</i>)-97)	236
9.4.2. (<i>2R</i> , <i>4S</i>)-2,4-diaminopentanoate ((<i>2R</i> , <i>4S</i>)-91).....	236
9.4.3. <i>cis</i> -(<i>1S</i> , <i>2R</i>)-2-methylcyclohexylamine hydrochloride ((<i>1S</i> , <i>2R</i>)-154).....	237
9.4.4. <i>cis</i> -(<i>1S</i> , <i>3R</i>)-3-methylcyclohexylamine hydrochloride ((<i>1S</i> , <i>3R</i>)-66).....	238
9.4.5. (<i>2S</i>)-Pantan-2-amine hydrochloride ((<i>2S</i>)-99).....	238
ANNEXES	241
Annexe 1 : Liste des molécules	243
Annexe 2 : Structure des différents cofacteurs/coenzymes	245
Annexe 3 : Résultats du criblage de la plaque DH2	246
Annexe 4 : Enzymes michaeliennes.....	247
Annexe 5 : Enzymes allostériques	248
Annexe 6 : Etapes de la résolution structurale d'une enzyme par cristallisation	249
Annexe 7 : Contexte génomique des enzymes hits de la plaque DH2.....	250
Annexe 8 : Système de double chambre de l'automate GM3.....	251
Annexe 9 : Suivi spectrophotométrique de la dégradation des cofacteurs.....	252
Annexe 10 : Liste de l'ensemble des enzymes ciblées par la plateforme du LCAB	254
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	261
PUBLICATIONS	275

Abréviations

ABS	Absorbance
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
B12	Coenzyme B12
BINOL	1,1'-Bi-2-naphtol
BLAST	Basic Local Alignement Search Tool
Bn	Benzyle
BzCl	Chlorure de benzoyle
CAST	Mutagenèse combinatoire par saturation de site
CIP	Cahn, Ingold et Prelog
CSA	Catalytic Site Atlas
C-Ter	Extrémité C-terminale
dCTP	Désoxycytidine phosphate
DHD	(S)-2,3-dihydropyridine-2,6-dicarboxylate
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNFB	2,4-dinitrofluorobenzène
DRX	Diffraction des rayons X
DTT	Dithiolthréitol
<i>ed</i>	excès diastéréoisomérique
<i>ee</i>	excès énantiomérique
ELSD	Evaporative light scattering detector
EMI	Emission de fluorescence
Eq	Equivalent
Et	Ethyle
EtOH	Ethanol
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FDAA	1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide
FID	Détecteur à ionisation de flamme
FMN	Flavine mononucléotide
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyle
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GM	Génomique Métabolique
HE	Ester de Hantzch
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HMM	Hidden Markov Model
IMAC	Chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés
IPR	Interpro
<i>i</i> -PrOH	Isopropanol
IPTG	Isopropyl b-D-thiogalactopyranoside
<i>k</i> _{cat}	Constante catalytique = turn over number
<i>K</i> _M	Constante de Mickaëlis
LA	L'équipe des Applications
LABGeM	Laboratoire d'Analyses Bio-informatiques pour la Génomique Et le Métabolisme
LBMS	L'équipe de Biocatalyse et Métabolisme Synthétique
LCAB	L'équipe de Criblage des Activités de Bioconversion
LCOB	L'équipe de Chimie Organique et Biocatalyse

LGBM	Laboratoire de Génomique et Biochimie du Métabolisme
LIC	Ligation Independent Cloning
Me	Méthyle
MIO	4-méthylidène imidazole-5-one
MOPS	Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Masse
MTQ	1-méthyl-tétrahydroisoquinolidine
NAD+	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydé)
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NADP+	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydé)
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
NCB	Nicotinamide cofactor biomimetic
NDA	Naphtalène-2,3-dicarboxaldéhyde
NEADB	New Enzyme Activity Data Base
NEADB-KCBS	New Enzyme Activity Data Base – Known Catalytic and Binding Sites
N-ter	Extrémité N-terminale
oTAED	ω -Transaminase Engineering Database
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
PEI	Polyéthylènimine
Ph	Phényle
PLP	Pyridoxal 5'-phosphate
PMP	Polyméthylpentane
R	Rendement
RCD	Résolution cinétique dynamique
rd	ratio diastéréoisomérique
rmsd	Root-Mean-Square Deviation
rpm	rotation par minute
S_{50}	Constante de demi saturation pour une enzyme allostérique
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
STY	Space time yield = gramme de produit obtenu par litre de solution et par jour
T	Température
<i>t</i> -Bu	<i>ter</i> -Butyle
TcesNH ₂	2,2,2-trichloroéthoxysulfonamide
TFAA	Anhydride trifluoroacétique
TFE	Trifluoroéthanol
THDP	(<i>S</i>)-2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate
THF	Tétrahydrofurane
TLC	Thin layer chromatography = Chromatographie sur couche mince
<i>t</i> _r	Temps de rétention
TRIS	Trishydroxyméthylaminométhane
Ts	Tosyle
TTN	Total turn over number = quantité de produit formé sur la quantité de catalyseur
UHPLC	Chromatographie liquide ultra haute performance
UV	Ultraviolet-visible
v/v	volume / volume
<i>V</i> _{max}	Vitesse maximale
δ	Déplacement chimique
ϵ	Coefficient d'extinction molaire
λ	Longueur d'onde

Abréviations des enzymes

2,4-DAPDH	2,4-diaminopentanoate déshydrogénase
AADH	Acide aminé déshydrogénase
ADH	Alcool déshydrogénase
AL	Ammonia lyase
AlaDH	Alanine déshydrogénase
AM	Aminomutase
AmDH	Amine déshydrogénase
<i>AoIRED</i>	Imine réductase issue d' <i>Amycolatopsis orientalis</i>
AspRedAm	Réductive aminase d' <i>Aspergillus oryzae</i>
<i>BbF-AmDH</i>	Amine déshydrogénase obtenue à partir de la phénylalanine déshydrogénase de <i>Bacillus badius</i>
<i>BsL-AmDH</i>	Amine déshydrogénase obtenue à partir de la leucine déshydrogénase de <i>Bacillus stereothermophilus</i>
<i>Bs-LeuDH</i>	Leucine déshydrogénase de <i>Bacillus stereothermophilus</i>
<i>BspL-AmDH</i>	Amine déshydrogénase obtenue à partir de la leucine déshydrogénase de <i>Bacillus sphaericus</i>
chFL-AmDH	Amine déshydrogénase chimère obtenue à partir de <i>BbF</i> - et <i>BcL-AmDH</i>
<i>CtF-AmDH</i>	Amine déshydrogénase obtenue à partir de la phénylalanine déshydrogénase de <i>Caldalkalibacillus thermarum</i>
DHDPR	Dihydrodipicolinate réductase
DPDH	Diaminopimelate déshydrogénase
ER	ène-réductase
<i>EsL-AmDH</i>	Amine déshydrogénase obtenue à partir de la leucine déshydrogénase d' <i>Exiguobacterium sibiricum</i>
<i>EsLeuDH</i>	Leucine déshydrogénase d' <i>Exiguobacterium sibiricum</i>
FDH	Formate déshydrogénase
G6PDH	Glucose 6-phosphate déshydrogénase
GDH	Glucose déshydrogénase
HAL	Histidine ammonia lyase
IRED	Imine réductase
Kdd	L-érythro-diaminohexanoate déshydrogénase
L-AmDH	Amine déshydrogénase obtenue à partir d'une leucine déshydrogénase
LDH	Lactate déshydrogénase
<i>LfL-AmDH</i>	Amine déshydrogénase obtenue à partir de la leucine déshydrogénase de <i>Lysinibacillus fusiformis</i>
MAO	Monoamine oxidase
MAO-N	Monoamine oxidase d' <i>Aspergillus niger</i>
NOX	NAD(P)H oxydase
OpDH	Opine déshydrogénase
OpST	Opine synthase
OYE	Old yellow enzyme
PAL	Phénylalanine ammonia lyase
PAM	Phénylalanine aminomutase
PheDH	Phénylalanine déshydrogénase
<i>Pk-AmDH</i>	Amine déshydrogénase de <i>Pseudomonas kilonensis</i>
PTDH	Phosphite déshydrogénase
RedAm	Réductive aminase
<i>RsF-AmDH</i>	Amine déshydrogénase obtenue à partir de la phénylalanine déshydrogénase de <i>Rhodococcus sp.</i>
SAM	Aminomutase S-adénosyle méthionine
<i>Sv-AmDH</i>	Amine déshydrogénase issue de <i>Streptomyces virginiae</i>
T4pol	T4 polymérase
TA	Transaminase
TAL	Tyrosine ammonia lyase

<i>TeS-ADH</i>	Alcool déshydrogénase issue de <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>
<i>TsOYE</i>	ène réductase issue de <i>Thermus scotoductus</i>
α -KAO	Dioxygénases à α -céto glutarate

Liste des figures

Figure 1 : Enantiomères d'une amine chirale, $R^1 \neq R^2 \neq H \neq NH_2$	29
Figure 2 : Exemple de principes actifs pharmaceutiques comportant une amine chirale. Adaptée de Bornscheuer and Höhne, 2009 ; Nugent et El-Shazly, 2010.	29
Figure 3 : Imines activées.....	37
Figure 4 : Vue d'ensemble des procédés utilisés pour identifier ou développer de nouvelles enzymes possédant les propriétés désirées. © Davids <i>et al.</i> , 2013.....	46
Figure 5 : Ensemble des enzymes permettant la formation d'amines chirales. A. Lipase ; B. Ammonia lyase (AL) ; C. Transaminase (TA) ; D. Aminomutase (AM) ; E. Monoamine oxydase (MAO) ; F. Imine réductase (IRED) ; G. Réductive aminase (RedAm). H. Amine déshydrogénase (AmDH). Vert : hydrolase ; Bleu : transférase ; Orange : lyase ; Jaune : isomérase ; Rouge : oxydoréductases.	48
Figure 6 : Structure des substrats des transaminases. Adaptée de Fuchs <i>et al.</i> , 2015.	55
Figure 7 : A) Boîte à outils de différentes MAOs développées par ingénierie protéique. Adaptée de Ghislieri <i>et al.</i> , 2013. B) Structure de la lévocétrizine.....	62
Figure 8 : Structure des IREDS. A) Structure dimérique de l'IRED d' <i>Amycolatopsis orientalis</i> (AoIRED). B) Site actif en présence du NADPH et du substrat (<i>R</i>)-1-méthyl-tétrahydroisoquinolidine ((<i>R</i>)-MTQ). © Sharma <i>et al.</i> , 2017.....	65
Figure 9 : A) Repliement dimérique d' <i>AspRedAm</i> . B) Site actif d' <i>AspRedAm</i> . © Aleku <i>et al.</i> , 2017.	68
Figure 10 : Activités spécifiques de la <i>EsL-AmDH</i> sur différents substrats.	73
Figure 11 : A) Poche catalytique de la <i>LfL-AmDH</i> . B) Poche catalytique du mutant A113G/T134G de la <i>LfL-AmDH</i> . 2-Hept = 2-heptanone. © Chen <i>et al.</i> , 2018.	73
Figure 12 : Structure de la 1-adamantyle méthyle cétone (76) et de la 3-méthyl-1-phényl-2-butanone (77).....	74
Figure 13 : Approche génomique pour la recherche de nouvelles activités enzymatiques mis en place par la plateforme.....	88
Figure 14 : Mesure de l'activité spécifique des enzymes par spectrophotométrie. Cas du suivi de la réaction d'amination réductrice. Vert : déclenchement de la réaction par l'ajout de l'enzyme ou du substrat. Activité spécifique ($\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ d'enzyme ou $\text{U}.\text{mg}^{-1}$ d'enzyme), pente = pente de la courbe obtenue au spectrophotomètre (min^{-1}), ϵ = coefficient d'extinction molaire du NAD(P)H = 6220 $\text{L}.\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, l = trajet optique (cm), $[e]$ = concentration de l'enzyme dans le milieu ($\text{mg}.\text{mL}^{-1}$).	95
Figure 15 : Comparaison du contexte génomique entre DH2B8* du set de référence et DH2B1. or-1 à 5, oraS et oraE = gènes impliqués dans la voie de fermentation de l'ornithine. or-1 = gène codant pour les 2,4-DAPDHs impliquées dans cette voie. Adaptée de Fonknechten <i>et al.</i> , 2009.	99
Figure 16 : Cétones testées pour l'établissement du spectre de substrats de DH2B1.	99
Figure 17 : Activité spécifique de DH2B1 en fonction de la température.....	100
Figure 18 : Profil de thermostabilité de DH2B1.....	101
Figure 19 : A. Cinétique allostérique de DH2B1 avec le 4-oxopentanoate (95). B. Représentation d'Eadie-Hofstee en forme de virgule, caractéristique d'une allosterie. (Courbes rouges : modélisation SigmaPlot des données expérimentales (noires)).	102
Figure 20 : Conversion (24 h) en fonction de la température pour la réaction d'amination réductrice sur 95 biocatalysée par DH2B1.....	104
Figure 21 : Conversion (24 h) en fonction de la température pour la réaction d'amination réductrice sur 95 biocatalysée par DH2B1 couplée à diverses enzymes de recyclage.....	106
Figure 22 : A) Conversion (48 h) en fonction de la nature du tampon et du pH pour la réaction d'amination réductrice sur 95 biocatalysée par le système couplé A. DH2B1/FDH. B) DH2B1/GDH.....	107

Figure 23 : Conversion (24h) en fonction de la concentration en tampon pour la réaction d'amination réductrice sur 95 biocatalysée par le système couplé A) DH2B1/FDH. B) DH2B1/GDH.....	108
Figure 24 : Conversion (48h) et concentration en amine dans le milieu en fonction de la concentration initiale en cétone dans la réaction d'amination réductrice sur 95 biocatalysée par DH2B1.....	109
Figure 25 : Conversion (24h) en fonction A) de la concentration en DH2B1, B) de la concentration en FDH, pour la réaction d'amination réductrice sur 95 biocatalysée par DH2B1.....	110
Figure 26 : Suivi de la conversion de la réaction catalysée par DH2B1 dans les conditions optimisées.....	110
Figure 27 : Evolution de la conversion au cours des différentes étapes d'optimisation de la réaction d'amination réductrice sur 95 biocatalysée par DH2B1.....	111
Figure 28 : Conversion relative en 97 en fonction du % (v/v) de cosolvant dans la réaction en présence A) d'ACN, B) d'EtOH, C) de DMF, avec ou sans système de recyclage.....	113
Figure 29 : Conversion relative en 97 en fonction du cosolvant dans la réaction avec ou sans système de recyclage.....	114
Figure 30 : Structure dimérique de DH2B1.....	115
Figure 31 : A) Superposition de la dihydrodipicolinate réductase 5kt0 (violet) et de DH2B1 (sable). B) Superposition du monomère ouvert (cyan) et du monomère fermé (sable) de DH2B1 co-cristallisée avec le NAD (gris) et l'acide 4-oxopentanoïque (orange) ; rmsd = 2,63 Å.....	116
Figure 32 : A) Site actif de DH2B1 contenant l'acide 4-oxopentanoïque (95). B) Site actif de DH2B1 contenant le substrat naturel 93 (docking). C) Site actif des diaminopimelate déshydrogénases (3WBF) contenant l'acide 2,6-diaminoheptanedioïque.....	117
Figure 33 : Site actif du mutant N135V/N163V/R161M/H264L après mutation <i>in silico</i> et docking.....	121
Figure 34 : Automate de culture, GM3.....	124
Figure 35 : Principe du régime de culture chemostat dans le GM3. P = poubelle. Adaptée de Souterre 2017, Soutenance de doctorat.....	125
Figure 36 : Principe du régime de culture turbidostat dans le GM3. P = poubelle. Adaptée de Souterre 2017, Soutenance de doctorat.....	125
Figure 37 : Principe de culture en régime medium swap dans le GM3. R = milieu relaxant. S = milieu stressant. P = poubelle. Adaptée de Souterre 2017, Soutenance de doctorat.....	126
Figure 38 : Evolution de la souche G4488 en culture continue dans le GM3.....	131
Figure 39 : Structures des substrats cibles pour les nouvelles recherches d'activité AmDH.....	135
Figure 40 : Suivi spectrofluorimétrique de l'amination réductrice biocatalysée de 95 par DH2C11.....	137
Figure 41 : Extraction du motif 3D de la LeuDH (1LEH) <i>via</i> le serveur Fit3D. Les lignes en pointillée représentent les distances entre les résidus en Å.....	139
Figure 42 : Substrats criblés sur la plaque générée <i>via</i> une recherche par sous structure 3D.....	140
Figure 43 : Substrats choisis pour le criblage des OpDHs.....	144
Figure 44 : Substrats choisis pour le criblage des 2,4-DAPDHs.....	145
Figure 45 : Substrats testés sur DH13B5 et DH13F8 pour une étude rapide du spectre de substrats de ces enzymes.....	146
Figure 46 : Matrice d'identités de séquences comprenant les enzymes issues du premier criblage, celles du criblage des 2,4-DAPDHs (DH13) et leurs homologues, deux AADHs et deux IREDs.....	151
Figure 47 : Substrats testés pour la réaction d'amination réductrice biocatalysée par DH13B5, DH13F8, C3UMY1 ou E3CZE3.....	153
Figure 48 : Activité spécifique relative de C3UMY1 en fonction du pH. Activités spécifiques normalisées par rapport à l'activité la plus forte obtenue. Vert : 2 eq. de MeNH ₂ . Bleu : 50 eq. de MeNH ₂	155
Figure 49 : Inhibition de DH13B5 provoquée par un excès d'isobutyraldéhyde ou de cyclohexanone lors de la réaction d'amination réductrice avec NADPH et NH ₃	157

Figure 50 : A) Structure dimérique de DH13B5. B) Superposition d'un monomère de DH2B1 (bleu) et un monomère de DH13B5 (rouge). Vert : NADP.....	158
Figure 51 : A) Structure du site actif de DH13B5, vert = NADP, jaune = 2-méthylcyclohexanone (124). B) Structure du site actif de DH13F8, vert = NADP, orange = cyclohexanone (61).....	159
Figure 52 : Fixation du NADP dans DH13F8.....	160
Figure 53 : Modèles des complexes NAD^+ , NH_4^+ , cyclohexanone (61) dans les structures cristallographiques de A) DH13F8. B) DH13B5.....	162
Figure 54 : Conversion (24h) en fonction du cofacteur et de l'enzyme.	164
Figure 55 : Conversion (24h) en fonction de la nature du tampon pour la réaction d'amination réductrice biocatalysée de A) 124 par DH13B5. B) 72 par DH13F8.	164
Figure 56 : Conversion (48h) en fonction de la concentration en tampon pour la réaction d'amination réductrice biocatalysée de A) 124 par DH13B5. B) 72 par DH13F8.	165
Figure 57 : Conversion (48h) et concentration d'amine formée en fonction de la concentration initiale en A) 124. B) 72.....	166
Figure 58 : Conversion en fonction de la concentration de DH13B5 pour la réaction d'amination réductrice biocatalysée de A) 124. B) 62.	167
Figure 59 : Spectre UHPLC-UV du suivi de la réaction d'amination réductrice de 62 par DH13B5. A) Résultat à 4 h. B) Résultat à 24 h.....	167
Figure 60 : Suivi de la conversion et de la stéréochimie du produit 154 formé en fonction de la concentration en DH13B5.	168
Figure 61 : Suivi de la conversion et de la stéréochimie du produit 66 formé en fonction de la concentration en DH13B5. de = excès diastéroisomérique.	169
Figure 62 : Suivi de la conversion pour la réaction d'amination réductrice sur 72 en fonction de la concentration en DH13B5.....	170
Figure 63 : Analyse GC-FID de la réaction en cascade de <i>TsOYE</i> et DH13F8. t_r (136) = 7,79 min, t_r (61) = 6,92 min, t_r (88) = 6,60 min.....	173
Figure 64 : Structure des cofacteurs synthétiques.	178
Figure 65 : Activité spécifique des AmDHs pour la réaction d'amination réductrice avec les cofacteurs synthétiques.	178
Figure 66 : Activité spécifique en fonction du pourcentage de cosolvant en réaction avec A) DH2B1, B) C3UMY1, C) DH13B5, D) DH13F8.	180
Figure 67 : Suivi spectrophotométrique de la réaction d'amination réductrice avec DH13B5 en présence des NCBs A) MM1. B) MM2. C) MM3.....	181
Figure 68 : Activité spécifique des AmDHs en fonction des cofacteurs synthétiques A) pour la réaction d'amination réductrice. B) pour la réaction de déamination oxydative.	181
Figure 69 : Vitesse de décomposition des cofacteurs synthétiques réduits en fonction de la nature et du pH des tampons.	183
Figure 70 : Suivi spectrophotométrique de la décomposition du BNAH en fonction de la nature du tampon et du pH.....	183
Figure 71 : Vitesse de décomposition des cofacteurs synthétiques en fonction du tampon et de sa concentration.	184
Figure 72 : Vitesse de décomposition des cofacteurs naturels en fonction de la nature du tampon, de sa concentration et du pH.	185

Partie expérimentale

Figure S 1 : Spectrophotometric test for the determination of NH_4Cl amount in purified product 91 or 97..... 205

Schéma 1 : Réaction d'amination réductrice catalysée par les AmDHs.....	31
Schéma 2 : Voies d'accès chimiques aux amines chirales primaires.....	35
Schéma 3 : Résolution cinétique d'un mélange d'amine chirale racémique par cristallisation de sels diastéréoisomériques.....	36
Schéma 4 : A) Hydrogénéation énantiomélique d'imines et d'énamines par des métaux de transitions couplés à des ligands chiraux. B) Exemples de ligands chiraux et précurseurs catalytiques (Li <i>et al.</i> , 2003; Hopmann and Bayer., 2014; Wang <i>et al.</i> , 2007; Pablo <i>et al.</i> , 2012).....	38
Schéma 5 : Hydrogénéation catalytique d'imine primaire par le complexe Ir-f-Binaphane.....	39
Schéma 6 : A) Hydrogénéation asymétrique d'imine par organocatalyse par les esters de Hantzsch (HE). B) Cycle catalytique. Adapté de Rueping <i>et al.</i> , 2005.....	40
Schéma 7 : Réductions énantiométriques du <i>N</i> -Sulfinimide 3,4-dihydronaphtalène (6) à partir de réducteurs boriques.....	40
Schéma 8 : Réaction d'amination réductrice.....	41
Schéma 9 : Aminations réductrices organocatalysées. Adapté de Storer <i>et al.</i> , 2006.....	42
Schéma 10 : Réaction d'amination réductrice conduisant à la formation directe d'une amine primaire. TFE = trifluoroéthanol. Adapté de Tan <i>et al.</i> , 2018.....	42
Schéma 11 : Hydroamination de dérivés du styrène par catalyse au cuivre via le DTBM-SEGPHOS. Adapté de Niu and Buchwald, 2015.....	43
Schéma 12 : Insertion d'une fonction amine dans une liaison C-H par catalyse au rhodium. Adapté de Nörder <i>et al.</i> , 2010.....	44
Schéma 13 : Processus de résolution cinétique dynamique catalysé par les lipases.....	49
Schéma 14 : Résolution cinétique dynamique de la 1-phényléthan-1-amine catalysée par l'enzyme CAL-B.....	50
Schéma 15 : Résolution cinétique dynamique d'alkylamines par l'enzyme CAL-B couplée à des nanoparticules de Pd supportées par AlO(OH). Adapté de Verho and Bäckvall, 2015.....	50
Schéma 16 : Résolution cinétique dynamique d'amines racémiques par l'enzyme CAL-B couplée à un catalyseur au ruthénium.....	51
Schéma 17 : Réaction catalysée par les transaminases.....	51
Schéma 18 : Mécanisme réactionnel des transaminases. Déamination dans le sens direct, amination dans le sens réverse. © Fuchs <i>et al.</i> , 2015.....	52
Schéma 19 : Méthodes de déplacement de l'équilibre de la réaction catalysée par les transaminases. TA = transaminase, LDH = lactate déshydrogénase, GDH = glucose déshydrogénase, AlaDH = Alanine déshydrogénase.....	54
Schéma 20 : Résolution cinétique d'un mélange racémique d'amine par les transaminases.....	54
Schéma 21 : Synthèse biocatalytique vs synthèse chimique de la sitaglipine. <i>i</i> -PrOH = isopropanol. Adapté de Savil <i>et al.</i> , 2010.....	56
Schéma 22 : Réactions catalysées par les aminomutases. AM = aminomutase, SAM = aminomutase <i>S</i> -adénosyle méthionine dépendante, MIO-AM = aminomutase 4-méthylidène imidazole-5-one dépendante.....	57
Schéma 23 : Mécanisme supposé des aminomutases MIO dépendantes. Adapté de Wu <i>et al.</i> , 2011.....	58
Schéma 24 : Formation d'un β-amino acide par couplage entre la phénylalanine aminomutase (PAM) et une racémase. Adapté de Cox <i>et al.</i> , 2009.....	59
Schéma 25 : Réaction catalysée par les ammonia lyases (ALs).....	59
Schéma 26 : Mécanisme réactionnel supposé des ammonia lyases (AL). A) ALs MIO dépendantes, B) ALs MIO-indépendantes. Adapté de de Villiers <i>et al.</i> , 2012. ; Lovelock <i>et al.</i> , 2014.....	60
Schéma 27 : Synthèse enzymatique et chimique de l'intermédiaire 38. Adapté de de Lange <i>et al.</i> , 2011.....	60
Schéma 28 : Réaction catalysée par les monoamine oxydases (MAOs).....	61

Schéma 29 : Réaction de déracémisation de la 1-phényléthan-1-amine (1) par couplage de la MAO-N avec NH ₃ .BH ₃	62
Schéma 30 : Réaction d'amination réductrice d'un α -céto acide catalysée par les AADHs.	63
Schéma 31 : Mécanisme réactionnel de la PheDH de <i>Rhodococcus sp.</i> © Sharma <i>et al.</i> , 2017.....	64
Schéma 32 : Réaction catalysée par les imine réductases (IREDs).....	64
Schéma 33 : Réduction de l'imine (52) catalysée par une (<i>S</i>)-IRED ou une (<i>R</i>)-IRED.....	66
Schéma 34 : Synthèse de la (<i>2R</i>)- <i>N</i> -méthyl-4-phénylbutan-2-amine (58) à partir de la 4-phénylbutan-2-one (54) après préformation de l'imine 57 en milieu aqueux et réduction catalysée par une IRED.....	66
Schéma 35 : A) Composés carbonylés et amines testées lors du criblage. B) Réaction d'amination réductrice de la (<i>3R</i>)-3-méthylcyclohexanone (62) avec catalyse de la réduction de l'imine par une IRED.....	67
Schéma 36 : Différence entre IRED et RedAm. Adapté de France <i>et al.</i> , 2018.	67
Schéma 37 : Mécanisme réactionnel de AspRedAm. Adapté de Aleku <i>et al.</i> , 2017.....	68
Schéma 38 : Déracémisation du 1,2,3,4-térahydronaphtalèn-1-amine (67) par couplage du variant W210A d'AspRedAm et d'une NADPH oxydase (NOX).	69
Schéma 39 : Réaction d'amination réductrice catalysée par les AmDHs.....	70
Schéma 40 : A) Réactions d'amination réductrice catalysées par la LeuDH ou la BsL-AmDH. B) Réaction d'amination réductrice biocatalysée de la 4-méthylpentan-2-one (71) par BsL-AmDH couplée au système de recyclage GDH. Adapté de Abrahamson <i>et al.</i> , 2012.....	72
Schéma 41 : A. Synthèse biocatalysée par BbF-AmDH du (<i>R</i>)-1-(4-phényl)-propyl-2-amine ((<i>R</i>)-75). B. Réaction d'amination réductrice catalysée par BbF-AmDH en milieu biphasique.....	74
Schéma 42 : Synthèse biocatalysée par RsF-AmDH du (<i>R</i>)-1-(4-méthoxyphényl)propan-2-amine ((<i>R</i>)-78b).	75
Schéma 43 : Spectre de substrats de la réaction d'amination réductrice catalysée par CtF-AmDH. Adapté de Pushpanath <i>et al.</i> , 2017.	76
Schéma 44 : Cascade enzymatique couplant ADH et AmDH avec recyclage interne du cofacteur : réaction rédox neutre. Adapté de Mutti <i>et al.</i> , 2015.	77
Schéma 45 : Synthèse du (<i>R</i>)-1-phénylpropan-2-amine ((<i>R</i>)-85) à partir du 1-phénylpropan-2-ol (84) par cascade enzymatique couplant deux ADHs et la BbF-AmDH.....	78
Schéma 46 : Conversion d'alcool en amine énantiopure par couplage entre une ADH et une AmDH par système orthogonal d'oxydoréduction. Adapté de Knaus <i>et al.</i> , 2017.....	79
Schéma 47 : Stratégie « one pot, two steps » pour la synthèse d'amines optiquement pures à partir de composés alcanes. Adapté de Yu <i>et al.</i> , 2018.	79
Schéma 48 : Réaction de déracémisation de la 1-phényléthan-1-amine (1) par déamination oxydative catalysée par chLF-AmDH.....	81
Schéma 49 : Création des extrémités cohésives sur A) le gène à cloner. B) le plasmide.	89
Schéma 50 : Production des enzymes sous forme de lysat clarifié ou purifiée.....	90
Schéma 51 : Réaction d'amination réductrice recherchée dans les bases de données métaboliques en imposant l'absence de fonction sur le carbone α	91
Schéma 52 : A. Réaction catalysée par Kdd. B. Réaction catalysée par la 2,4-DAPDH. n = 1 : substrat métabolique.	92
Schéma 53 : A) Réaction d'amination réductrice. B) Réation de déamination oxydative. C) Suivi spectrophotométrique de la consommation du NAD(P)H (bleu) ou de l'apparition du NAD(P)H (rouge). ABS = Absorbance.	92
Schéma 54 : Réaction de dérivatisation de l'acide 4-aminopentanoïque (97) par l'agent dérivatisant DNFB.....	96
Schéma 55 : Réaction de dérivatisation de l'acide 4-aminopentanoïque (97) par l'agent dérivatisant FDAA.	96
Schéma 56 : Réduction du DHDP en THDP catalysée par la dihydrodipicolinate réductase.	98
Schéma 57 : Systèmes de régénération du cofacteur NADH couplés à la réaction catalysée par DH2B1.....	105

Schéma 58 : Synthèse semi-préparative biocatalysée par DH2B1 de l'acide (4S)-4-aminopentanoïque (97).	112
Schéma 59 : Proposition de mécanisme réactionnel pour l'amination réductrice de 93 biocatalysée par DH2B1.	119
Schéma 60 : Cible de sélection choisi pour la mise en place d'une évolution <i>in vivo</i> de l'activité AmDH des 2,4-DAPDHs.....	127
Schéma 61 : Synthèse biocatalysée du (2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-91 à partir de la D-ornithine (113), par l'aminomutase de <i>Clostridium sticklandii</i>	128
Schéma 62 : Mis en place d'un test microbiologique sur culture solide. + : formation de colonies. - : pas de formation de colonies.....	129
Schéma 63 : Réaction de dérivatisation au BzCl.	136
Schéma 64 : A) Réaction de dérivatisation des amines cycliques au TFAA. B) Réaction de dérivatisation des amines linéaires à l'anhydride acétique en présence de DMAP.....	136
Schéma 65 : Réaction de dérivatisation d'une amine primaire par le NDA (116).	138
Schéma 66 : Réactions catalysées par les opine synthases/déshydrogénases. R ² = CH ₃ : pyruvate, R ² = CH ₂ CH ₂ COOH = α-cétoglutarate.	142
Schéma 67 : Réaction d'amination réductrice biocatalysée par le mutant CENDH.	142
Schéma 68 : Mécanisme réactionnel supposé de DH13B5 (vert) et DH13F8 (noir).	161
Schéma 69 : A) Réactions d'amination réductrice à optimiser avec DH13B5. B) Réaction d'amination réductrice à optimiser avec DH13F8.....	163
Schéma 70 : Cascade biocatalytique couplant les ERs et les AmDHs.	171
Schéma 71 : Réaction d'hydrogénéation asymétrique catalysée par les ERs. AD = adénine dinucléotide. R = ribose phosphate. © Scholtissek <i>et al.</i> , 2017.	172
Schéma 72 : Schéma réactionnel de la cascade couplant les ERs avec les AmDHs pour la synthèse de 88.....	173
Schéma 73 : A) Réaction d'amination réductrice catalysée par les AmDHs en présence d'un système enzymatique de recyclage du cofacteur nicotinamide. B) Réaction d'amination réductrice catalysée par les AmDHs à partir des NCBs en tant que réducteurs.	177
Schéma 74 : Cascade couplant les ERs et les AmDHs dans un processus neutre d'oxydo-réduction	186

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résolution cinétique de la (<i>R</i>) ou (<i>S</i>)-1-phényléthan-1-amine (1) par cristallisation de sels diastéréoisomériques avec divers agents de résolution. <i>ee</i> = excès énantiomérique.	37
Tableau 2 : AmDHs obtenues par ingénierie protéiques et AmDHs naturelles.	82
Tableau 3 : Définition du spectre de substrats pour le criblage des enzymes candidates à l'activité AmDH. Bleu : substrats ciblés.	93
Tableau 4 : Enzymes ressorties hits lors du criblage de la plaque DH2. + : activité/amine détectée. ++ : amine plus fortement détectée. – amine/activité non détectée. nd : non déterminé.	94
Tableau 5 : Activité spécifique des enzymes hits sur les substrats 93 et 95.	97
Tableau 6 : Tableau récapitulatif de l'étude préliminaire des enzymes hits issues du criblage de la plaque DH2. FPLC = Fast Protein Liquid Chromatography.	98
Tableau 7 : Paramètres cinétiques de DH2B1.	102
Tableau 8 : Activité relative des mutants de DH2B1 pour la réaction d'amination réductrice de 93. Résultats normalisés par rapport à la réaction de DH2B1. rt = température ambiante ; - : activité non détectée.	117
Tableau 9 : Paramètres cinétiques de DH2B1 et des mutants E102A et H197A sur NH ₃ et 93.	118
Tableau 10 : Activité relative des mutants et DH2B1 pour les réactions d'amination réductrice sur 95 et 72. Pour 95 : activité normalisée par rapport à celle de DH2B1. Pour 72 : activité normalisée par rapport à celle du mutant le plus actif N135V/N163V/R161M/H264L.	120
Tableau 11 : Comparaison des sites actifs des enzymes modélisées de la plaque DH2 à ceux de DH2B1 cristallisée. Rouge : AmDHs ressorties et confirmées positives lors du criblage spectrophotométrique. Bleu : enzymes possédant tous les résidus importants du site actif identiques à ceux de DH2B1.	122
Tableau 12 : Activité spécifique (mU.mg ⁻¹ enz) des enzymes modélisées homologues 3D à DH2B1 cristallisée.	123
Tableau 13 : Résultats des tests de toxicité et de croissance de <i>E. coli</i> sauvage et <i>E. coli plAmDH⁺</i>	129
Tableau 14 : Enzymes et substrats hits du criblage spectrophotométrique des 2,4-DAPDHs. Bleu ciel :hit < 1 mU.mg ⁻¹ enz. Bleu foncé : hit > 1 mU.mg ⁻¹	145
Tableau 15 : Identité de séquence des enzymes par rapport à l'homologue et activité spécifique (en mU.mg ⁻¹ enz) des enzymes homologues de DH13B5 et DH13F8 trouvées après leur BLAST dans Uniprot.	146
Tableau 16 : Activité spécifique (mU.mg ⁻¹ enz) et spectre de substrats de DH13B5, DH13F8, C3UMY1 et E3CZE3 en fonction du cofacteur utilisé.	152
Tableau 17 : Activité spécifique (mU.mg ⁻¹ enz) de DH13B5, DH13F8, C3UMY1, KOUKT5 et E3CZE3 pour la réaction d'amination réductrice avec la méthylamine sur la cyclohexanone (61) ou l'isobutyraldéhyde (150)..	155
Tableau 18 : Paramètres cinétiques de DH13B5, DH13F8 et C3UMY1. (-) non déterminé ; * Les réactions sont réalisées sur 150 au lieu de 61.	156
Tableau 19 : « Total turn ouver number » (TTN) et « space time yield » (STY) des synthèses optimisées avec DH13B5, DH13F8 et C3UMY1.	171
Tableau 20 : Nature du tampon, pH et concentrations testés pour l'étude de la stabilité des cofacteurs.	182

Partie expérimentale

Table S 1 : Primers for the production of DH2B1 mutants.	198
Table S 2 : All purified enzymes which are tested towards various substrates in biocatalytic synthesis with recycling system. ¹ enzymes from thermophilic organism.	211

Introduction

Le terme d'amine chirale désigne des fonctions amines (primaires, secondaires ou tertiaires) portées par un carbone substitué par 4 groupements différents (Figure 1). Ce carbone, dit asymétrique (C^*), confère la propriété de chiralité à la molécule à laquelle il appartient. Cette dernière peut alors exister sous deux formes, appelées énantiomères, qui ne diffèrent que par la position dans l'espace des groupements portés par le C^* . Ces énantiomères sont caractérisés par la configuration absolue ((R) ou (S) du C^* .



Figure 1 : Enantiomères d'une amine chirale, $R^1 \neq R^2 \neq H \neq NH_2$.

Les amines chirales se retrouvent dans de très nombreux composés naturels (acides aminés, peptides, protéines...) mais sont également présentes dans beaucoup de produits de l'industrie chimique en général. Grâce à toutes les données structurales disponibles et leur capacité à former des liaisons hydrogènes, elles sont notamment devenues de puissants pharmacophores pour l'industrie pharmaceutique (Nugent, 2010). Il est estimé que plus de 40 % des principes actifs contiennent des amines chirales. Nous pouvons par exemple citer la sitagliptine, possédant une amine primaire et utilisée en tant qu'antidiabétique, ou la codéine, contenant une amine tertiaire et préconisée contre la douleur (Figure 2) (Ghislieri and Turner, 2014).

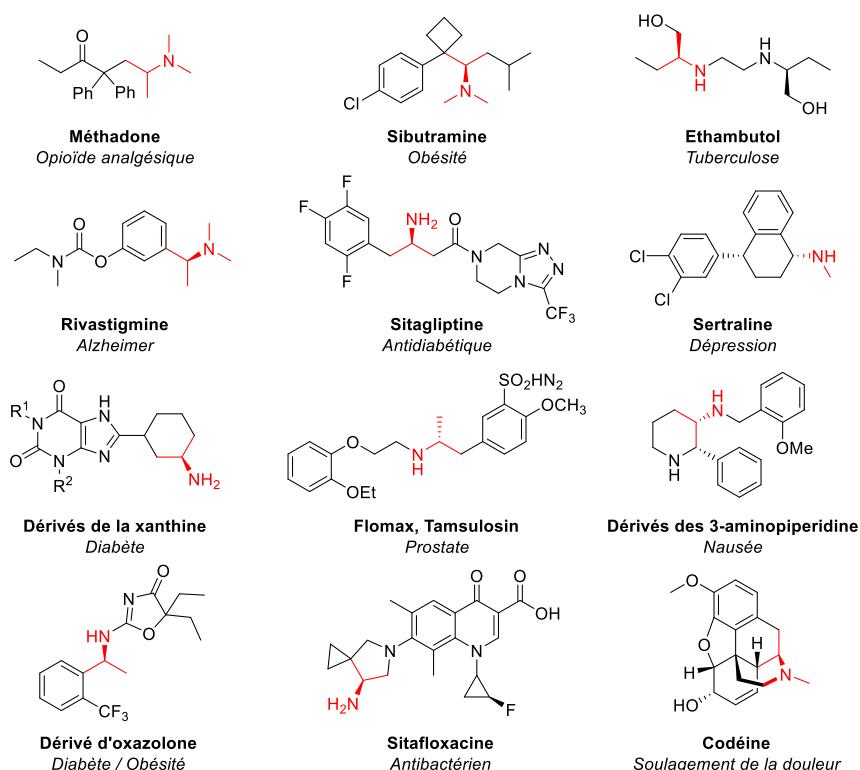


Figure 2 : Exemple de principes actifs pharmaceutiques comportant une amine chirale. Adaptée de Bornscheuer and Höhne, 2009 ; Nugent et El-Shazly, 2010.

En agroalimentaire, de plus en plus de composés comportent également des amines chirales (Schrittwieser *et al.*, 2015). Enfin, ces dernières servent aussi en chimie de synthèse, principalement en tant qu'auxiliaire chiral ou agents de résolution dans des processus multi-étapes.

Au vu de toutes ces applications, de nombreuses méthodes de synthèse de ces amines se sont donc développées. De plus, depuis qu'il a été découvert que deux molécules énantiomères pouvaient avoir des propriétés biologiques totalement différentes (Eriksson *et al.*, 1995), les mesures gouvernementales imposent, pour la mise sur le marché, la pureté énantiomérique de tout composé chiral ayant une cible biologique. En plus d'éviter des problèmes de santé dus aux potentielles propriétés néfastes de l'un des énantiomères, l'impact environnemental est réduit par la diminution de la quantité de produit nécessaire à son efficacité. Tous ces facteurs ont engendré un essor dans le développement de synthèses asymétriques au cours des dernières années.

La majorité des méthodes d'obtention d'amines chirales optiquement pures en chimie organique conventionnelle, consiste à utiliser des métaux de transition nécessitant des ligands chiraux complexes. Bien que ces méthodes, détaillées au cours du premier chapitre, aient largement fait leur preuve dans des procédés industriels, leur impact environnemental reste élevé, notamment à cause de la difficulté d'élimination de ces métaux dans les principes actifs (Sharma *et al.*, 2017).

Une alternative à la chimie conventionnelle s'est donc développée, en particulier lorsque la pureté énantiomérique est de première importance : la biocatalyse (Zaparucha *et al.*, 2011). Elle repose sur l'utilisation de macromolécules biologiques appelées enzymes. Les enzymes catalysent la quasi-totalité des réactions chimiques du métabolisme chez les êtres vivants, il en existe donc un très grand nombre. En plus d'accélérer les procédés comme tout catalyseur, leurs atouts majeurs résident dans leurs capacités à différencier deux énantiomères d'un mélange racémique (stéréospécificité), à produire des composés stéréopurs (stéréosélectivité), à discriminer des groupements fonctionnels (chimiosélectivité) mais aussi à contrôler le site réactionnel lorsque plusieurs possibles (régiosélectivité). Ces propriétés sont dues à l'environnement chiral apporté par l'enzyme, grâce à l'ancrage de la molécule transformée (substrat) au niveau de son site de réaction, appelé site actif. Toutes les enzymes ne possèdent cependant pas l'ensemble de ces propriétés ; celles impliquées dans la détoxicification par exemple, doivent au contraire transformer des substrats de structure variée, et sont par conséquent moins spécifiques. Un autre atout de ces catalyseurs naturels est, en règle générale, leur utilisation dans des conditions douces, c'est-à-dire en milieu aqueux, à pH proche de la neutralité et à température ambiante. Les enzymes respectent donc une grande partie des principes de la chimie verte (Anastas and Eghbali, 2010).

Qu'elles soient natives, évoluées (Sheldon and Pereira, 2017), ou même créées par l'homme (Donnelly *et al.*, 2018), les enzymes sont devenues des outils à part entière dans le domaine de la chimie

et offrent de nouvelles perspectives en dehors du champs d'application pharmaceutique, comme en chimie lourde ou pour les énergies renouvelables (biofuels¹ par exemple).

Plusieurs voies enzymatiques, discutées dans la suite du chapitre 1, peuvent être employées pour la synthèse d'amines chirales. Parmi elles, les amines déshydrogénases (AmDHs) font parti des plus intéressantes de par la simplicité et/ou la disponibilité des réactifs nécessaires. Elles catalysent la réaction d'amination réductrice de cétones à partir d'ammoniac comme seule source d'azote (Schéma 1).

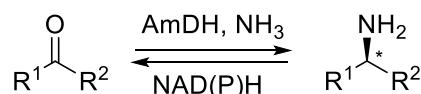


Schéma 1 : Réaction d'amination réductrice catalysée par les AmDHs.

Cette réaction a été reconnue comme l'une des plus importantes pour l'industrie pharmaceutique (Constable *et al.*, 2007), l'idéal étant de trouver des enzymes pouvant catalyser la transformation de cétones variées sans prérequis sur les groupements R¹ et R². Une méthode générique d'accès aux amines chirales à partir de cétones prochirales serait alors disponible. Dès lors, les travaux portant sur la découverte et/ou l'ingénierie de ces enzymes se sont multipliés, et font l'objet de la fin du chapitre 1.

Au commencement du projet AmDH en 2014, par L'équipe de Chimie Organique et Biocatalyse (LCOB) du Laboratoire de Biocatalyse et Métabolisme Synthétique (LBMS) de l'unité Génomique Métabolique (GM) du Genoscope, spécialisée dans la découverte et l'application en synthèse de nouveaux biocatalyseurs, seulement 2 enzymes naturelles étaient répertoriées pour avoir une activité AmDH. Cependant aucun gène n'avait été associé à cette activité (Itoh *et al.*, 2000; Wang and Fang, 2013). Plus remarquable, des AmDHs créées par ingénierie protéique à partir d'enzymes natives avaient également été obtenues par le groupe de Bommarius (Abrahamson *et al.*, 2012, 2013).

Il a alors été supposé que d'autres enzymes natives possédant cette activité devraient être présentes dans la biodiversité. Elles offriraient aux chimistes de nouvelles plateformes catalytiques adaptées ou adaptables à la synthèse d'amines chirales variées.

Mon projet de thèse s'est divisé en deux axes principaux. Le premier a consisté à identifier au sein de la biodiversité bactérienne des enzymes catalysant la réaction d'amination réductrice ; le deuxième à étudier biochimiquement ces AmDHs découvertes et montrer leur potentiel biocatalytique en les appliquant à la synthèse d'amines chirales.

¹ Global Bionergie® est par exemple spécialisé dans la mise en place de bio-procédé pour la production de bio-carburant. (<http://www.global-bioenergies.com>)

La stratégie de recherche des AmDHs dans la biodiversité par approche génomique sera développée au cours du deuxième chapitre. Ce dernier sera complété des études biochimiques et structurales d'une des enzymes découvertes, issue de *Petrotoga mobilis*, mais aussi de l'application de cette dernière dans la synthèse asymétrique d'une amine chirale.

D'autres explorations de la biodiversité menées suivant la même approche génomique, mais aussi en exploitant les données structurales, seront présentées dans le chapitre III. Elles ont abouti à la découverte de nouvelles enzymes, qui ont été caractérisées et ont fait l'objet d'optimisations des conditions réactionnelles en vue de synthèses à échelle semi-préparative de diverses amines chirales optiquement pures. Ces travaux exposés dans le quatrième chapitre, ont été réalisés parallèlement à une étude portant sur l'emploi de cofacteurs synthétiques avec l'ensemble des AmDHs étudiées. Cette alternative biocatalytique à l'utilisation des cofacteurs naturels, coûteux en synthèse, constituera le dernier chapitre de cette thèse.

Les travaux détaillés dans ce manuscrit sont, sauf indication contraire, ceux auxquels j'ai pleinement participé. Les protocoles expérimentaux sont détaillés en partie expérimentale, rédigée en anglais pour des raisons de facilité de publication des travaux de recherche.

Chapitre I : Etat de l'art sur la synthèse d'amines chirales et objectifs du projet de recherche

1. SYNTHESES CHIMIQUES DES AMINES CHIRALES PRIMAIRES

De nombreuses méthodes chimiques existent pour la synthèse d'amines chirales primaires, secondaires ou tertiaires à partir de composés achiraux (Nugent, 2010). Seules celles les plus couramment utilisées et conduisant à des amines primaires RNH_2 différentes des α et β amino acids, objectif initial du projet, seront développées dans la suite de ce chapitre.

Parmi les différents procédés reportés, 4 principaux permettent l'obtention d'amines primaires (Schéma 2). Le plus simple et le plus courant, notamment en industrie, est la cristallisation de sels diastéréoisomériques à partir d'un mélange racémique, mais la réduction stéréosélective d'imines et d'énamines a également une place de choix en chimie de synthèse (Bornsheuer and Höhne, 2009). Deux autres méthodes peuvent aussi être utilisées pour la formation d'amines chirales : l'hydroamination et l'insertion d'une fonction amine dans une liaison C-H (Nugent and El Shazly, 2010). Ces 4 types de formations chimiques d'amines de type RNH_2 sont décrits plus en détails dans les paragraphes suivants.

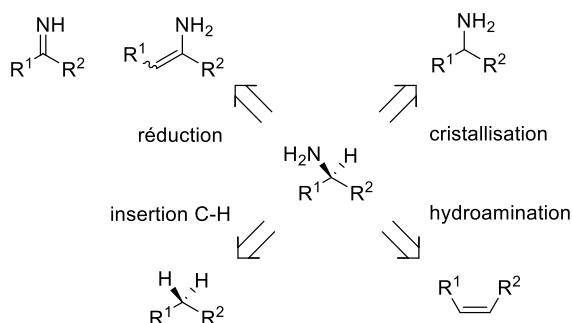


Schéma 2 : Voies d'accès chimiques aux amines chirales primaires.

1.1. RESOLUTION CINETIQUE PAR CRISTALLISATION DE SELS DIASTEREOISOMERIQUES

La résolution cinétique consiste à séparer deux énantiomères d'un mélange racémique. Elle fait intervenir un troisième composé chiral et optiquement pur, appelé agent de résolution, qui va permettre la formation de diastéréoisomères. Contrairement aux énantiomères, les diastéréoisomères possèdent des propriétés physico-chimiques différentes, ce qui rend possible leur séparation par des méthodes classiques de purification (Fogassy *et al.*, 2006).

L'une des méthodes de résolution cinétique la plus avantageuse car moins coûteuse, exploite la différence de solubilité des diastéréoisomères dans une solution donnée par la formation de sels. L'agent de résolution utilisé est généralement une molécule simple appartenant au pool chiral et facilement accessible. Dans le cas d'un mélange racémique d'amines chirales, un acide carboxylique est le plus souvent choisi : par réaction acide-base, l'amine primaire récupère le proton de l'acide carboxylique pour conduire à la formation de sels (Schéma 3). L'un des diastéréoisomères précipite alors dans le milieu tandis que l'autre reste soluble. Une simple filtration permet ensuite de séparer les deux amines chirales. Une étape d'élimination de l'agent de résolution est cependant souvent nécessaire afin de récupérer le produit sous la forme souhaitée.

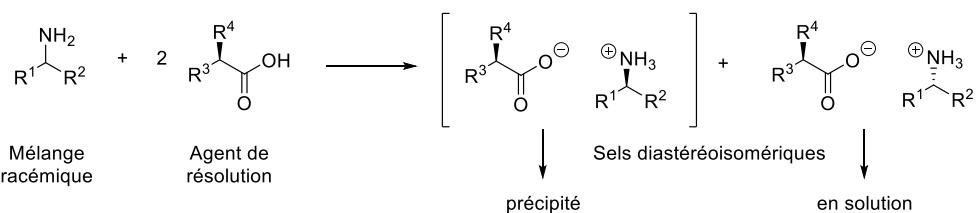


Schéma 3 : Résolution cinétique d'un mélange d'amine chirale racémique par cristallisation de sels diastéréoisomériques.

Il est à noter que si cette méthode est employée pour la séparation des amines chirales, elle s'applique aussi très bien à un mélange racémique d'acides. Dans ce cas-là, une amine optiquement pure jouera le rôle d'agent de résolution (Clayden *et al.*, 2013).

Une multitude d'agents de résolution de type acide carboxylique existe pour la séparation des amines chirales. Suivant celui utilisé, il est possible de faire précipiter l'un ou l'autre des énantiomères. Nous pouvons prendre l'exemple de la (*R*) ou (*S*)-1-phényléthan-1-amine (**1**), produite industriellement *via* des sels cristallins (Breuer *et al.*, 2004). L'énantiomère (*R*) est obtenu par cristallisation avec les acides (*S*)-malique (**2**), (*R,R*)-tartrique (**3**) et le composé **4**, alors que l'énantiomère (*S*) cristallise lui avec l'acide (*R*)-mandélique (**5**) (Tableau 1). Les acides **3** et **4** sont plus généralement employés pour la séparation d'aryle alkyle amines, où le cycle aromatique peut être substitué par des halogénures, éthers, ou alkyles.

Le principal inconvénient de la résolution cinétique est qu'elle conduit à un rendement maximal de 50 % en produit souhaité, facteur souvent rédhibitoire dans une synthèse multi-étapes. En revanche, couplée à une racémisation de l'énantiomère non précipité (résolution cinétique dynamique (RCD)), il est alors possible d'obtenir des conversions quasiment totales.

Il est également difficile de prévoir le comportement des sels diastéréoisomériques en solution ce qui rend ces procédés longs à développer. De plus, comme évoqué précédemment, une étape est nécessaire

pour éliminer l'agent de résolution. Toutes ces contraintes sont des raisons au développement de synthèses asymétriques d'amines.

Tableau 1 : Résolution cinétique de la (*R*) ou (*S*)-1-phényléthan-1-amine (**1**) par cristallisation de sels diastéréoisomériques avec divers agents de résolution. ee = excès énantiomérique.

 1	 (<i>R</i>)- 1 ou (<i>S</i>)- 1
 2 (<i>S</i>)-acide malique	
 3 (<i>R,R</i>)-acide tartrique	 4 L-acide phenylcarbamoyllacétique
 5 (<i>R</i>)-acide mandélique	
Enantiomère obtenu	(<i>R</i>)- 1
ee (%)	98 %
	> 98 %
	90 %
	> 95 %

1.2. OBTENTION D'AMINES CHIRALES PAR REDUCTION D'IMINES

L'obtention d'amines chirales par réduction d'imines ou d'énamines requiert dans la quasi-totalité des cas, l'activation de la fonction. Divers groupements peuvent jouer le rôle d'activateur d'imines (phosphonyle phényle, benzyle, tosyle, copules chirales) mais elles peuvent également prendre la forme d'oxime ou d'hydrazone (Figure 3) (Nugent, 2010). Les énamines quant à elles sont très largement retrouvées avec le groupement *N*-Acétyle. La présence du groupe activant impose une étape supplémentaire de clivage de ce dernier afin d'obtenir l'amine primaire correspondante.

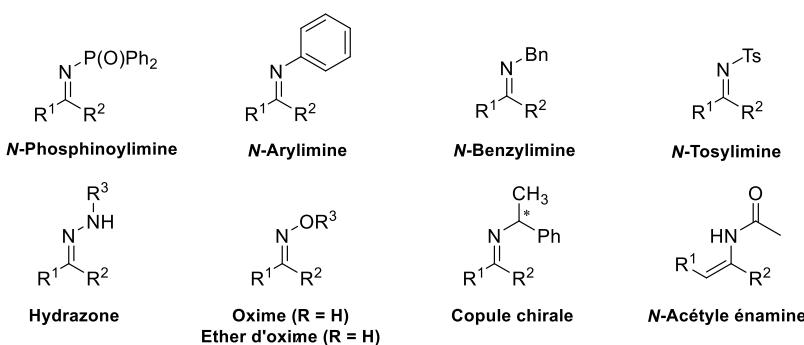


Figure 3 : Imines activées.

Deux grandes techniques sont utilisées pour réduire les imines et les énamines : l'hydrogénéation et la réduction par les hydrures.

1.2.1. Hydrogénéation catalytique énantiosélective

L'hydrogénéation catalytique correspond à l'utilisation de dihydrogène pour réduire des doubles ou triples liaisons. Elle fait intervenir des métaux de transition afin de catalyser la réaction. Dans le cas de réductions énantiosélectives, les métaux sont présents au sein de ligands chiraux.

De très nombreux exemples de réductions énantiosélectives d'imines et d'énamines *via* une hydrogénéation catalytique existent dans la littérature (Claver and Fernández, 2008; Xie *et al.*, 2011). La diversité des métaux utilisables couplée à la variété des imines activées et la multitude de ligands existant ouvrent d'énormes perspectives de catalyse (Schéma 4) (Li *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007; Pablo *et al.*, 2012; Hopmann and Bayer, 2014). De nombreux brevets utilisant ces méthodes sont déposés, obligeant beaucoup de laboratoires et d'industriels à développer eux-mêmes leurs propres ligands afin de les contourner. Les rendements et excès énantiomériques (*ee*) de ces réactions sont généralement élevés, ce qui en fait une des méthodes de choix dans les synthèses multi-étapes.

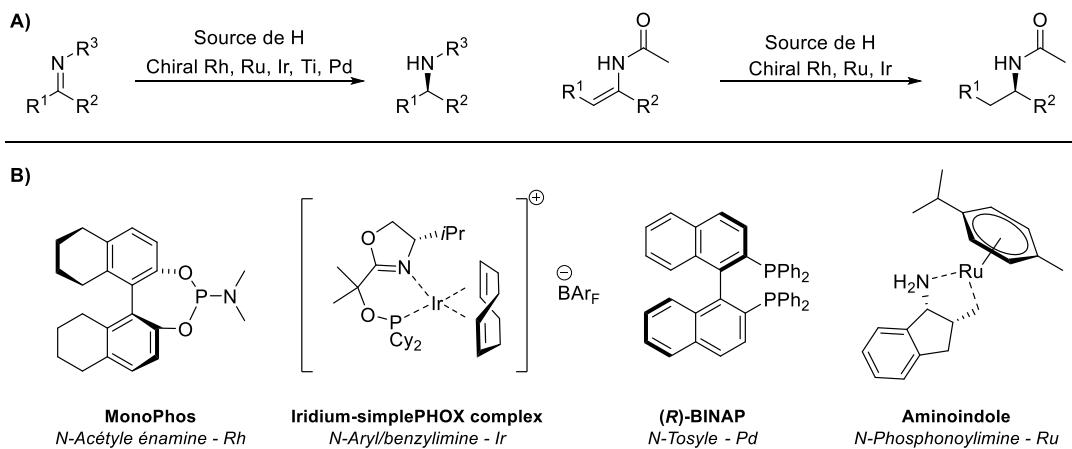


Schéma 4 : A) Hydrogénéation énantiosélective d'imines et d'énamines par des métaux de transitions couplés à des ligands chiraux.
B) Exemples de ligands chiraux et précurseurs catalytiques (Li *et al.*, 2003; Hopmann and Bayer., 2014; Wang *et al.*, 2007; Pablo *et al.*, 2012).

Un exemple intéressant d'hydrogénéation catalytique est celui décrit par Hou *et al.* en 2009, qui ont réussi à obtenir une amine primaire optiquement pure à partir d'une imine non activée, par l'utilisation d'un catalyseur iridium coordonné au (*S,S*)-f-Binaphane (Schéma 5) (Hou *et al.*, 2009).

Cette réaction a été appliquée à différentes imines et conduit à de très bons *ee* si l'un des groupements (R¹) est aromatique, les meilleurs excès étant obtenus quand le second (R²) est de faible encombrement stérique tel un méthyle.

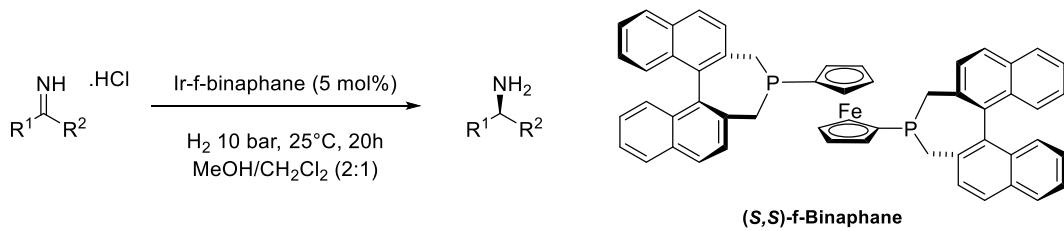


Schéma 5 : Hydrogénéation catalytique d'imine primaire par le complexe Ir-f-Binaphane.

L'un des inconvénients majeurs de l'hydrogénéation catalytique stéréosélective reste le coût des catalyseurs et des ligands bien qu'ils soient utilisés en faible quantité. Leur élimination quasi absolue des principes actifs afin de satisfaire les normes réglementaires, génère également des coûts importants et peut compliquer les applications industrielles.

1.2.2. Réduction énantiométrique par organocatalyse

L'organocatalyse peut être une alternative à l'utilisation des métaux de transitions (Vries and Mršić, 2011). Elle utilise des molécules organiques chirales énantiomériquement pures afin de catalyser une réaction stéréosélective. Bien que son efficacité en termes de turn over soit généralement plus faible que la méthode précédente, elle présente l'avantage principal de s'opérer dans des conditions de pression standard.

L'organocatalyse s'est inspirée des réductions présentes dans la nature où celles-ci sont effectuées par l'intermédiaire d'enzymes et de cofacteurs nucléotidiques (Adolfsson, 2005). En 2005, Rueping *et al.* ont reporté l'hydrogénéation asymétrique d'imine grâce à l'utilisation d'un acide phosphorique chiral dérivé du BINOL, en combinaison avec un ester de Hantzsch en tant que réducteur (Schéma 6) (Rueping *et al.*, 2005).

Les esters de Hantzsch miment le noyau actif des cofacteurs enzymatiques nicotinamides et sont donc de puissants donneurs d'hydrure. L'acide phosphorique dérivé du BINOL apporte quant à lui non seulement l'environnement chiral à la réaction, mais permet également l'activation de l'imine par protonation de cette dernière (étape 1). L'ester de Hantzsch va alors attaquer de façon stéréosélective l'une des faces de l'imine, discriminées par l'encombrement stérique du BINOL (étape 2). Le BINOL est ensuite régénéré dans une dernière étape par réaction acide base avec l'ester de Hantzsch oxydé (étape 3).

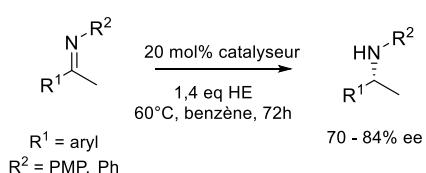
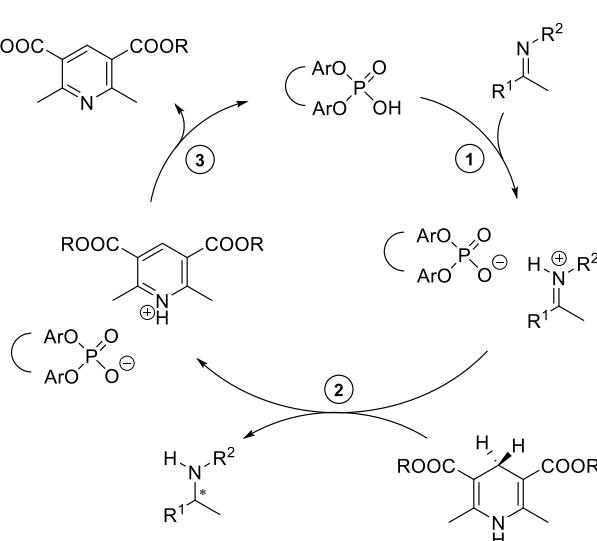
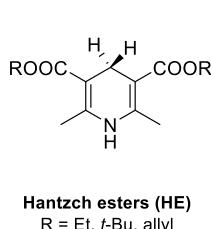
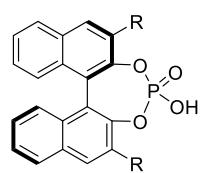
A. Réaction

B. Cycle catalytique
Catalyseur et ester de Hantzsch


Schéma 6 : A) Hydrogénéation asymétrique d'imine par organocatalyse par les esters de Hantzsch (HE). B) Cycle catalytique. Adapté de Rueping *et al.*, 2005.

Depuis, de nouveaux dérivés de BINOL et d'ester de Hantzsch ont été développés, mais ce type de catalyse se limite souvent à des aryle alkyle imines ($R^1 = \text{aromatique}$) ou à des imines cycliques, non développées dans ce manuscrit (Zhu *et al.*, 2015).

1.2.3. Réduction par les hydrures

La réduction des imines peut être réalisée par des réducteurs tels que LiAlH_4 ou NaBH_4 . Comme ces composés n'apportent pas d'environnement chiral au milieu réactionnel, la stéréosélectivité de la réaction est généralement apportée par un auxiliaire chiral lié de façon covalente à l'imine (Wills, 2008).

Suivant le type de réducteurs utilisés, il est possible, à partir d'un même produit de départ (même copule chirale), d'obtenir les deux stéréoisomères de l'amine résultante. Colyer *et al.* ont par exemple montré que la réduction du *N*-Sulfinimide 3,4-dihydronaphtalène (**6**) par NaBH_4 dans le tétrahydrofurane (THF) hydraté conduit à la formation du produit (*R*)-**7**, alors que l'emploi de l'hydrure L-sélectride, volumineux, dans le THF permet d'obtenir la stéréochimie (*S*) après attaque de la face la plus disponible (Schéma 7) (Colyer *et al.*, 2006).

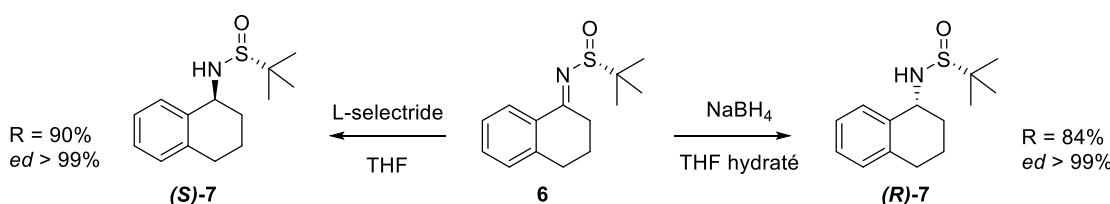


Schéma 7 : Réductions énantiométilées du *N*-Sulfinimide 3,4-dihydronaphtalène (**6**) à partir de réducteurs boriques.

Dans tous les exemples de cette partie, l'imine précurseur de l'amine cible est formée lors d'une étape préliminaire et souvent isolée avant d'être engagée dans les réactions décrites. Les substituants de l'imine utilisés dans ces réactions permettent sa relative stabilité, problème majeur de ces synthèses. L'obtention d'amine optiquement pure par amination réductrice contourne ce problème.

1.3. **OBTENTION D'AMINES CHIRALES PAR AMINATION REDUCTRICE STEREOSELECTIVE DIRECTE**

La réaction directe d'amination réductrice stéréosélective consiste à former en une seule étape, une amine chirale optiquement pure à partir de la cétone correspondante (Schéma 8). L'intermédiaire imine formé au cours de la réaction n'est pas isolé du milieu réactionnel et est directement réduit en présence d'une source chirale, pour donner le produit d'intérêt.

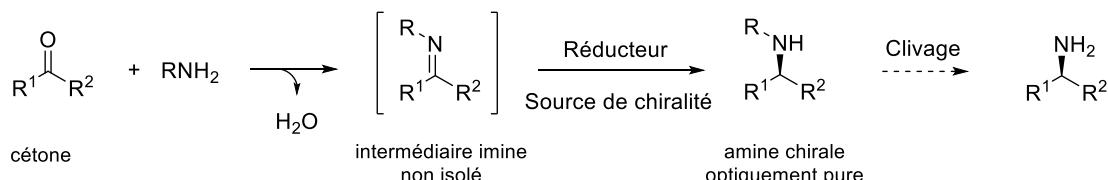
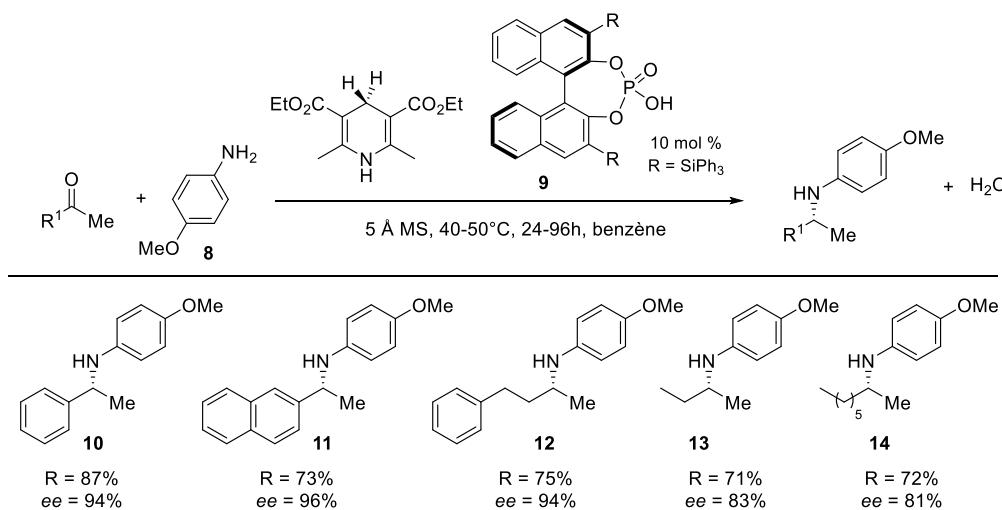


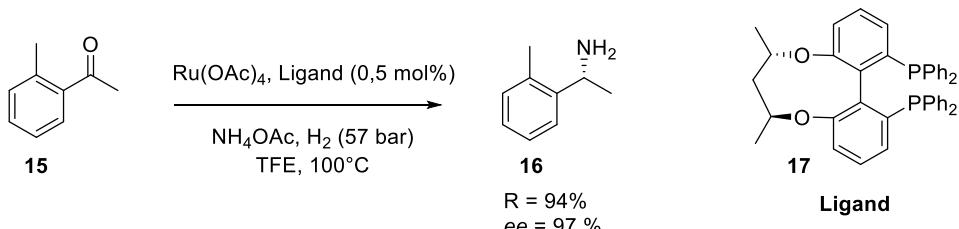
Schéma 8 : Réaction d'amination réductrice.

La source d'azote est généralement une amine substituée RNH_2 , ce qui en fait une méthode de premier choix pour la synthèse des amines secondaires. L'obtention de l'amine primaire quant à elle, nécessite une étape supplémentaire de clivage du groupement R.

La majorité des aminations réductrices stéréosélectives sont catalysées par des métaux de transitions couplés à des ligands chiraux, mais l'organocatalyse avec l'ester phosphorique chiral exposée précédemment peut également être employée (Tararov and Börner, 2005; Wang and Xiao, 2013). Storer *et al.* ont notamment développé et appliqué cette synthèse sur différents types de substrats cétones et ont obtenus de bons rendements (71-87 %) et *ee* (81-94 %) (Schéma 9) (Storer *et al.*, 2006). Il est intéressant de noter que cette amination réductrice organocatalysée permet de former des amines chirales sur des composés aliphatiques (**13**, **14**) avec des rendements satisfaisants ($\text{R} = 71\text{-}72\%$) et une énantiomérisélectivité très correcte ($ee = 81\text{-}83\%$). Bien que cette dernière soit plus faible qu'avec un groupement R¹ aromatique, c'est l'un des rares exemples de synthèses chimiques d'amines chirales permettant une stéréosélectivité convenable sur des composés à chaînes alkyles.


 Schéma 9 : Aminations réductrices organocatalysées. Adapté de Storer *et al.*, 2006.

Un autre exemple notable d'amination réductrice, récemment paru, a montré la possibilité d'une formation directe d'amine primaire à partir du composé carbonylé correspondant et d'acétate d'ammonium comme seule source d'azote (Tan *et al.*, 2018). Cette réaction, catalysée par le ruthénium, conduit à de très bons rendements et une forte stéréosélectivité dans le cas de cétones substituées par des groupements aromatiques (Schéma 10). Malheureusement, les *ee* chutent avec les alkyles cétones (*ee* = 20 %) ainsi que le rendement de la réaction ($R = 49\%$).


 Schéma 10 : Réaction d'amination réductrice conduisant à la formation directe d'une amine primaire. TFE = trifluoroéthanol. Adapté de Tan *et al.*, 2018.

1.4. HYDROAMINATION ET INSERTION DANS UNE LIAISON C-H

L'hydroamination et l'insertion d'une fonction amine dans une liaison C-H sont deux autres méthodes pour obtenir des amines chirales. Elles conduisent, comme l'amination réductrice, plutôt à des amines secondaires ou tertiaires, mais il est possible après déprotection, d'accéder aux amines primaires correspondantes si les groupements substituants sont judicieusement choisis clivables. De même que

pour les synthèses précédentes, elles sont catalysées par des métaux de transition couplés à des ligands chiraux et les substrats de la réaction sont la plupart du temps aromatiques.

1.4.1. Hydroamination

L'hydroamination correspond à l'addition d'un composé aminé (souvent R_3N) sur un substrat insaturé et est généralement catalysée par le cuivre (Pirnot *et al.*, 2016). En 2015, Niu et Buchwald ont développé une méthode d'hydroamination sur des dérivés du styrène (**18**) afin d'obtenir des amines secondaires (**20**), avec une variabilité possible au niveau du groupement R (Me, Et, $(CH_2)_2CO_2Et$, $(CH_2)_2OBn$...) qui n'affecte pas l'enantiosélectivité de la réaction (95-97%) (Schéma 11) (Niu and Buchwald, 2015).

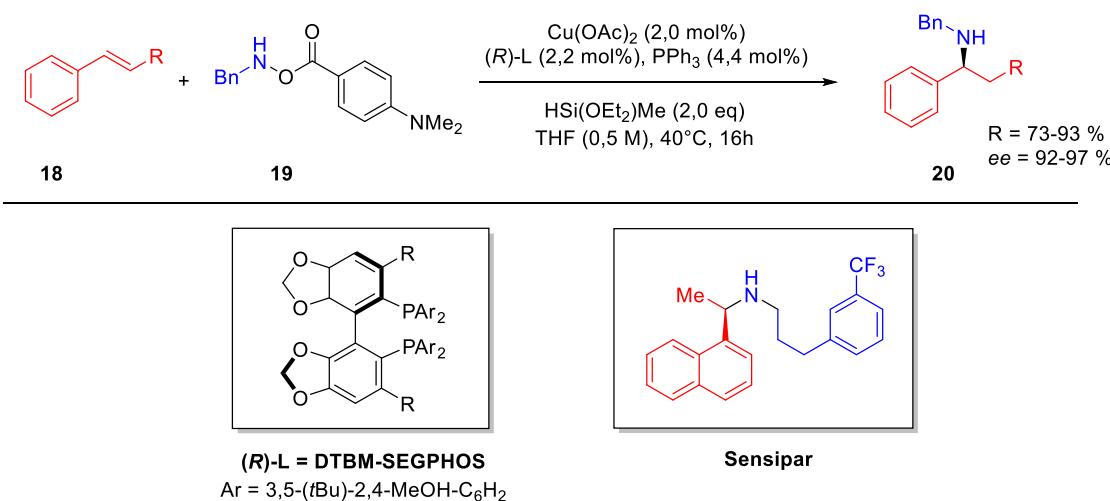


Schéma 11 : Hydroamination de dérivés du styrène par catalyse au cuivre *via* le DTBM-SEGPHOS. Adapté de Niu and Buchwald, 2015.

Le ligand DTBM-SEGPHOS (L) permet le contrôle de la stéréosélectivité de la réaction. En effet, l'utilisation du (*R*)-L ou du (*S*)-L conduit respectivement aux produits (*S*) ou (*R*).

Cette synthèse a également montré son efficacité pour le couplage d'autres composés aromatiques et amines (triéthylamine, 2-méthylphényléthanamine...) mais est plutôt employée pour la synthèse directe d'amines secondaires. Le sensipar, principe actif dans le traitement de l'hyperparathyroïdie, peut être formé à partir de l'hydroamination du 1-vinylnaphthalène.

1.4.2. Insertion C-H

L'insertion d'une amine dans une liaison C-H doit faire face à de nombreux obstacles lors de son développement en synthèse (Timsina *et al.*, 2018). Le principal réside dans le clivage de la liaison C-H, demandant le franchissement d'une haute barrière énergétique (85-105 kcal/mol). De plus, les contrôles chimio-, régio-, et stéréosélectif de cette réaction thermodynamiquement défavorable sont compliqués

par la présence de nombreuses liaisons C-H sur les molécules substrats. Malgré cela, de nombreux travaux ont été effectués sur ce type d'insertions, puisqu'elles permettent de s'affranchir des réactifs pré-fonctionnalisés mais sont aussi avantageuses en termes d'économie d'atomes.

Des stratégies ont alors été explorées afin de dépasser ces complications, particulièrement par l'emploi de catalyseurs métalliques afin de réduire la barrière énergétique, mais aussi par l'utilisation de substrats et/ou d'amines de haute énergie favorisant l'équilibre thermodynamique (Park *et al.*, 2017).

La très grande majorité de ces réactions sont réalisées avec des substrats aromatiques, sur des liaisons C-H aromatiques ou benzyliques et peuvent être intra-moléculaires pour la formation de cycle azoté, ou intermoléculaires. Bach *et al.* ont par exemple développé une synthèse diastéréosélective d'une amination C-H intermoléculaire par catalyse au rhodium. Grâce au centre stéréogène présent à côté de l'atome de carbone cible, l'insertion stéréosélective *syn* du 2,2,2-trichloroethoxysulfonamide (**22**) (TcesNH_2) est contrôlée (Schéma 12) (Nörder *et al.*, 2010).

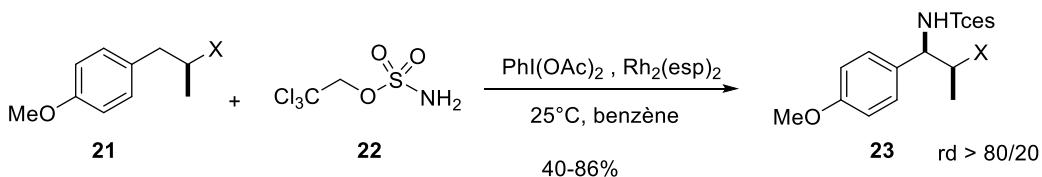


Schéma 12 : Insertion d'une fonction amine dans une liaison C-H par catalyse au rhodium. Adapté de Nörder *et al.*, 2010.

1.5. CONCLUSION

L'importance des amines chirales dans divers domaines a entraîné le développement de nombreuses synthèses asymétriques donnant lieu à de bons rendements et *ee*. Malgré la variété des réactions mises en jeu, la plupart nécessitent tout de même l'intervention de métaux de transition et de ligands chiraux. En plus de leur prix relativement onéreux, leur élimination totale au sein du produit final génère souvent des problèmes pour une application industrielle où la pureté est primordiale.

Par ailleurs, très peu d'exemples existent dans la littérature pour l'obtention directe d'amines primaires. Les synthèses font en grande partie appel à des imines activées, et donc à une étape de clivage du groupement activant. De plus, les substrats de ces différentes réactions sont majoritairement des composés aromatiques. La formation d'amines chirales à partir de fonctions carbonyles aliphatiques reste donc encore un défi.

Enfin, toutes ces réactions se font dans des conditions opératoires souvent contraignantes (température, pression) et nécessitant l'utilisation de solvants organiques. C'est pourquoi, au regard de l'impact environnemental, il est apparu indispensable de développer des voies alternatives. Une des

solutions émergeantes depuis plusieurs années, se trouve dans la mise en place de réactions biocatalysées où la stéréosélectivité est contrôlée par l'environnement chiral apporté par les enzymes.

2. SYNTHESES BIOCATALYTIQUES D'AMINES CHIRALES

Si, dans les années passées, certaines réserves ont été émises sur les voies de synthèses biocatalytiques, ces dernières sont aujourd’hui étudiées attentivement lors de la phase de recherche et développement de procédés industriels (Bommarius, 2005; Wohlgemuth, 2010). Ce tournant dans l’histoire de la biocatalyse est en partie dû aux efforts mis sur l’ingénierie protéique, qui permet de surmonter certains obstacles liés à l’utilisation des enzymes (Turner, 2009; Woodley, 2013). En effet, employées dans des conditions éloignées de leur environnement naturel, les enzymes sont souvent exposées aux solvants organiques, à de fortes concentrations en substrat, produit et sel ainsi qu’à des températures et pH non optimaux, les rendant alors instables voire inactives (Huisman and Collier, 2013). De plus, leur évolution naturelle au fil des siècles les a rendues souvent très spécifiques d’un substrat, les chimistes organiciens étant plutôt amateurs de méthodes génériques (Reetz, 2013). Malgré cela, leurs avantages incontestables en synthèses (conditions douces, stéréosélectivité, diminution du nombre d’étapes de synthèse...) ont fait accroître les recherches de nouveaux biocatalyseurs (Sheldon and Woodley, 2017). Améliorées par l’ingénierie protéique permettant désormais l’élargissement de leur gamme d’applications, les enzymes sont de plus en plus considérées par les chimistes organiciens lors des conceptions rétrosynthétiques (Clouthier and Pelletier, 2012; Turner and O'Reilly, 2013; de Souza *et al.*, 2017), et représentaient en 2012, environ 10 % du marché des catalyseurs, soit 3,4 billions de dollars (Milmo, 2012).

2.1. BIOCATALYSEURS ET AMINES CHIRALES

2.1.1. Recherche et développement de nouveaux biocatalyseurs

L’essor de la biocatalyse est intimement corrélé aux développements de nouveaux outils aussi bien biologiques (production d’enzymes recombinantes, séquençage...) que bio-informatiques (modélisation, docking...) qui ont permis la mise au point de trois grandes stratégies pour la découverte de nouveaux biocatalyseurs : recherche *in silico* de nouvelles enzymes par annotation ou comparaison de séquence, modification moléculaire d’enzymes existantes et fabrication *de novo* d’enzymes (Figure 4) (Behrens *et al.*, 2011; Davids *et al.*, 2013; Bornscheuer, 2016).

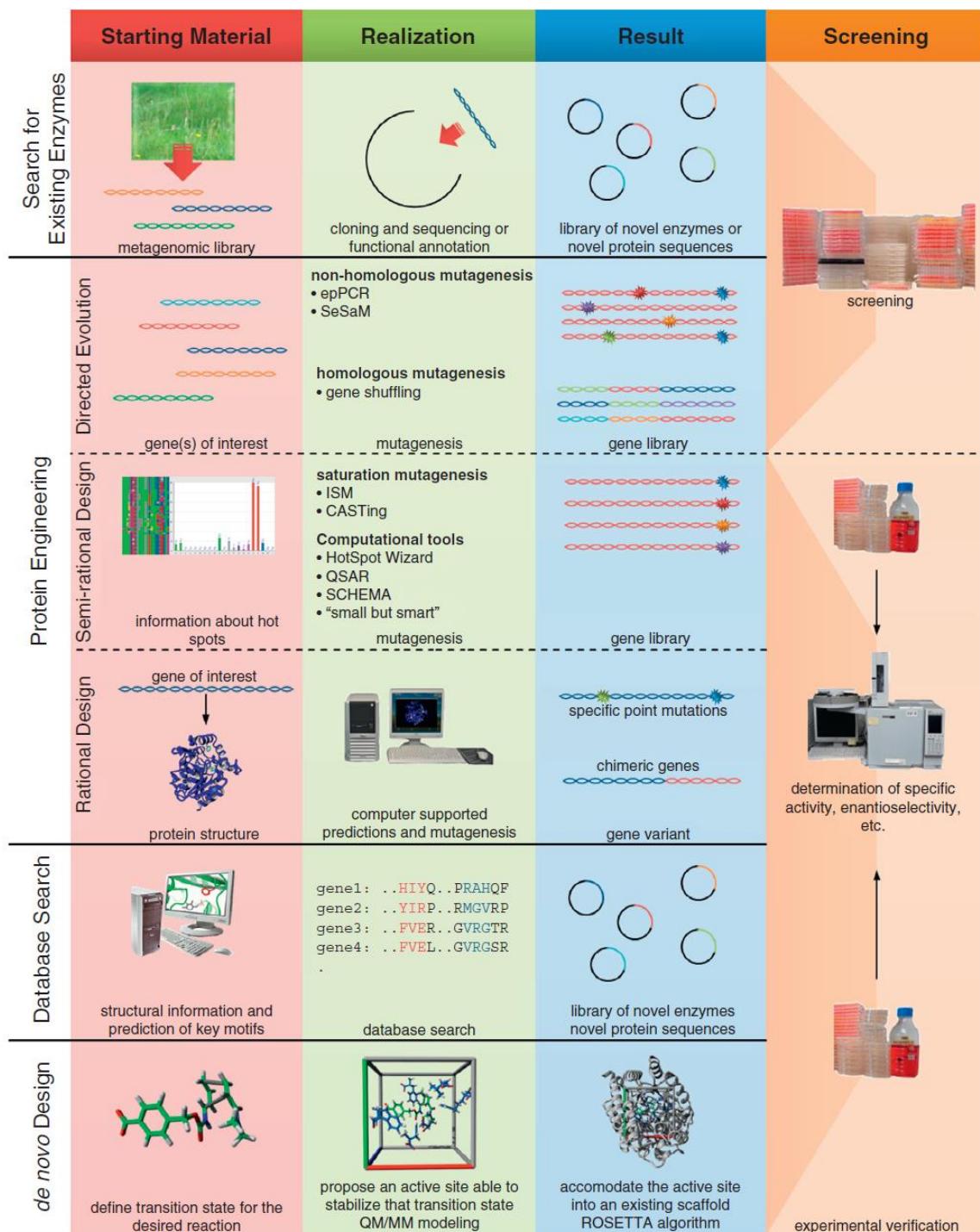


Figure 4 : Vue d'ensemble des procédés utilisés pour identifier ou développer de nouvelles enzymes possédant les propriétés désirées.
 © Davids *et al.*, 2013.

La recherche de nouvelles enzymes *in silico* s'appuie sur l'exploitation des données de séquences publiques, dans lesquelles l'ensemble des séquences protéiques obtenues après séquençage de gènes codant pour des enzymes isolées, de génomes complets ou de consortiums microbiens sont déposées (Zaparucha *et al.*, 2018). Un premier criblage par annotation ou par comparaison deux à deux des séquences primaires avec celles d'enzymes d'activité expérimentalement démontrée (BLAST : Basic

Local Alignment Search Tool) permet de trouver rapidement des homologues dont l'activité est ensuite confirmée ou non par criblage.

D'autres stratégies, toujours basées sur la comparaison de séquences, recherchent des motifs communs caractéristiques d'une catégorie d'enzymes (Fraaije *et al.*, 2005). Ces divers domaines et signatures (motifs de Markov cachés (HMM), domaine Pfam...) permettent souvent de discerner des sous familles au sein de superfamilles. La base de données InterPro regroupe des domaines « IPR », fonction de ces différentes signatures (Finn *et al.*, 2017).

Au sein de ces stratégies *in silico*, nous pouvons également citer une méthode plus récente, fondée sur la recherche d'une constellation 3D minimale de résidus définis comme essentiels à la catalyse. Cette constellation est utilisée pour cibler la Protein Data Bank (PDB), répertoriant les informations structurales des protéines mais aussi des bases de données plus spécifiques des sites actifs telles que « Catalytic Site Atlas (CSA) » (Furnham *et al.*, 2014) et « New Enzyme Activity Data Base » (NEADB) actuellement développée dans l'unité. Cette stratégie permet de découvrir des enzymes appartenant à des familles encore peu connues, car de séquences 1D ou 3D très différentes. En 2014, deux EneReductases (ERs) de repliements complètement différents de celles connues ont ainsi été découvertes (Steinkellner *et al.*, 2014). Grâce aux programmes actuels d'élucidation structurale à grande échelle, les bases de données de structures s'enrichissent et comptent de nombreuses protéines de fonctions inconnues.

La modification d'enzymes déjà existantes permet quant à elle de conférer à la protéine la(es) propriété(s) souhaitée(s) (Porter *et al.*, 2016). Elle repose sur deux grands principes : l'évolution dirigée et l'approche rationnelle (« rational design »). L'évolution dirigée consiste à modifier par mutation ponctuelle ou recombinaison de gènes homologues, la séquence du gène d'intérêt. Cependant, cette méthode engendre souvent de très grandes bibliothèques de mutants à cibler. A l'inverse, « le rational design » cible des résidus spécifiques à muter, et peu de variants sont donc à générer. Par contre, cette démarche nécessite la connaissance de la structure 3D de l'enzyme et demande également une expertise en modélisation bioinformatique afin de prédire l'effet des mutations et sélectionner *in silico* les plus probantes. L'évolution dirigée et le « rational design » peuvent également être combinés : l'approche semi-rationnelle, ou « semi rational design », consiste alors à identifier un petit ensemble d'acides aminés cibles et à effectuer dans un second temps des mutations saturantes sur ceux-ci. Cette méthode permet de réduire la taille des collections à cibler tout en augmentant les chances d'acquisition de l'activité recherchée.

Enfin, le *de novo* design repose lui sur la modélisation de l'état de transition de la réaction cible, puis la construction informatique autour de celui-ci d'un théozyme, c'est-à-dire d'un site actif capable de le stabiliser. Ce dernier est ensuite introduit *in silico* dans une structure protéique déjà existante, puis l'enzyme créée virtuellement est produite. De cette façon, une enzyme sur mesure est alors façonnée

pour une réaction donnée grâce à des calculs de mécanique quantique et de mécanique moléculaire (Zanghellini, 2014).

Différents biocatalyseurs sont utilisés pour la synthèse d'amines chirales. Ils ont été trouvés selon des approches génomiques basées sur la séquence linéaire, de manière globale ou selon des motifs, mais aussi par ingénierie protéique. Ces enzymes sont détaillées dans les paragraphes suivants.

2.1.2. Enzymes pour la synthèse d'amines chirales

Plusieurs enzymes sont décrites pour la production d'amines chirales optiquement pures par biocatalyse (Bornscheuer and Höhne, 2009; Kohls *et al.*, 2014; Grogan, 2018). Comme pour la partie explicitant les voies d'accès par synthèse chimique, nous nous limiterons à la description de celles utilisées pour la synthèse d'amines primaires.

Les enzymes donnant accès à des amines chirales primaires se répartissent dans cinq des six classes enzymatiques en fonction de la réaction catalysée et seront plus amplement développées dans la suite de ce chapitre (Figure 5) : les lipases (hydrolases), les ammonia lyases (lyases), les transaminases (transférases), les aminomutases (isomérases) et les monoamine oxydases, les imine réductases, les réductives aminases et les amines déshydrogénases (oxydoréductases).

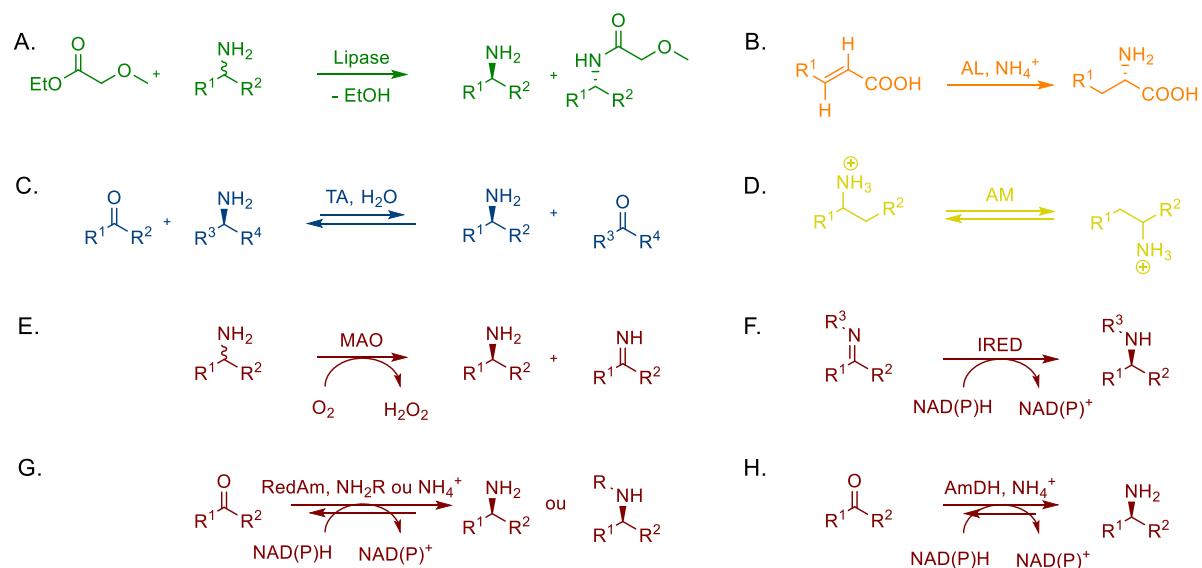


Figure 5 : Ensemble des enzymes permettant la formation d'amines chirales. A. Lipase ; B. Ammonia lyase (AL) ; C. Transaminase (TA) ; D. Aminomutase (AM) ; E. Monoamine oxydase (MAO) ; F. Imine réductase (IRED) ; G. Réductive aminase (RedAm). H. Amine déshydrogénase (AmDH). Vert : hydrolase ; Bleu : transférase ; Orange : lyase ; Jaune : isomérase ; Rouge : oxydoréductases.

2.2. LIPASES

Les lipases (EC 3.1.1.3) font partie de la famille des hydrolases. Dans la nature, elles catalysent la réaction d'hydrolyse d'ester en alcool et acide correspondant, notamment au cours de la lipolyse.

Les lipases sont l'une des catégories d'enzymes les plus utilisées par l'industrie chimique, et représenteraient d'ici 2020, un marché de 590 millions de dollars (Seddigi *et al.*, 2017). Cet engouement s'explique par les nombreux avantages qu'elles présentent ; en plus de leur chemo-, régio- et énantiosélectivité, elles peuvent être employées aussi bien en milieu aqueux qu'organique. De plus, elles sont actives sur un très large spectre de substrats et ne nécessitent pas de cofacteur pour la catalyse (Ahmed *et al.*, 2012). Combiné au fait qu'elles sont également capables de catalyser des réactions non naturelles telles que des transestérifications, l'intérêt pour ces enzymes s'est considérablement accru, et elles sont de plus en plus accessibles commercialement (Dwivedee *et al.*, 2018).

Dans le cas des amines chirales, les lipases sont utilisées dans des résolutions cinétiques rendues parfois dynamiques (RCD) grâce à une étape de racémisation de l'énanthiomère non acétylé. L'éthyle méthoxyacétate est un des donneurs d'acétyle majoritairement employé dans ces réactions (Schéma 13) (Wolf, 2007).

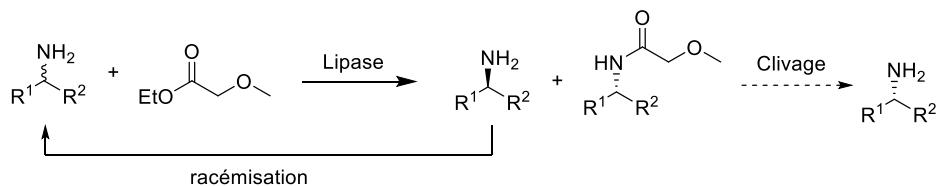


Schéma 13 : Processus de résolution cinétique dynamique catalysé par les lipases.

Le couplage d'une méthode de racémisation à une réaction enzymatique n'est cependant pas évident et plusieurs difficultés se manifestent. Le point critique, valable quelque soit la réaction considérée, est la compatibilité des conditions réactionnelles. C'est encore plus vrai pour les amines chirales, où la racémisation demande des conditions souvent drastiques plutôt austères aux enzymes. En effet, elle requiert généralement deux réactions d'oxydo-réduction consécutives (oxydation puis réduction). Ces dernières font appel aux métaux de transition avec lesquels les amines se coordonnent facilement et des températures élevées sont alors nécessaires afin de limiter ce phénomène. De plus, ce type de racémisation passe par un intermédiaire imine très réactif entraînant l'apparition de sous-produits et par conséquent une perte de rendement et des purifications complexes. C'est pourquoi l'éventail des réactions de RCD est assez restreint, la plupart faisant appel aux métaux de transition couplés à la lipase commerciale CAL-B de *Candida antartica*, très résistante et possédant une grande promiscuité de substrat (Gotor Fernández *et al.*, 2006).

En 1996, Reetz et Schimossek rapportent la première utilisation en RCD de cette enzyme, par couplage avec du palladium en présence de triéthylamine (Reetz and Schimossek, 1996). A partir d'un mélange racémique de 1-phénylethan-1-amine (**1**), ils ont réussi à isoler l'énanthiomère acétylé (*R*)-**24** grâce à une réaction de transestérification avec l'acétate d'éthyle, avec un *ee* de 99 % et des rendements d'environ 75 % (Schéma 14).

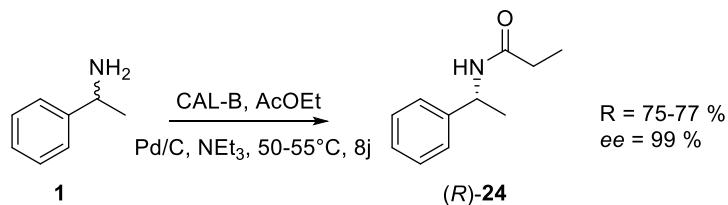


Schéma 14 : Résolution cinétique dynamique de la 1-phénylethan-1-amine catalysée par l'enzyme CAL-B.

Depuis cette publication, plusieurs méthodes se sont développées pour la RCD des amines *via* les lipases (de Miranda *et al.*, 2015; Verho and Bäckvall, 2015; Seddigi *et al.*, 2017). Kim *et al.* ont par exemple travaillé sur l'utilisation du palladium sous forme de nanoparticules fines supportées sur de l'oxohydroxyde d'aluminium (Pd/AlO(OH)) (Kim *et al.*, 2010). Ils ont ainsi pu obtenir, à l'aide de l'enzyme CAL-B immobilisée et commercialisée par Novozyme©, diverses alkylamines optiquement pures (*ee* 83-99 %) avec de bons rendements (90 - < 99 %) en seulement 4 h de réaction (Schéma 15). La diminution du temps de réaction permet entre autres de réduire la formation des produits indésirables liée à la formation de l'espèce réactive imine. Cette méthode a été reprise par Ma *et al.* pour la synthèse d'un intermédiaire de la rasagiline, utilisée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Ma *et al.*, 2014).

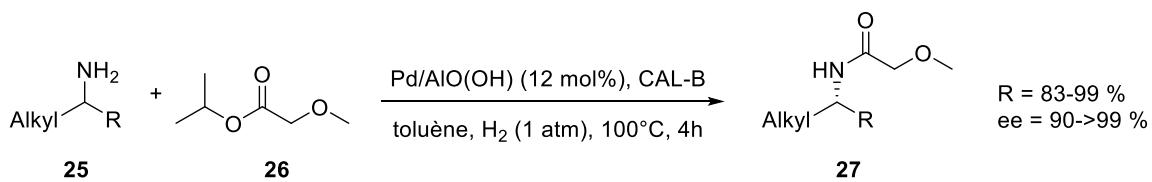


Schéma 15 : Résolution cinétique dynamique d'alkylamines par l'enzyme CAL-B couplée à des nanoparticules de Pd supportées par AlO(OH). Adapté de Verho and Bäckvall, 2015.

Bien que le palladium soit le plus souvent employé, d'autres catalyseurs métalliques permettent la racémisation des amines. Hoben *et al.* ont par exemple utilisé une catalyse au ruthénium, et remplacé l'éthyle méthoxy acétate (**26**) par le dibenzyle carbonate (**28**) tout en conservant l'enzyme CAL-B

(Schéma 16) (Hoben *et al.*, 2008). La formation d'un carbamate (**29**) à la place d'un amide, facilite l'étape suivante de clivage afin de récupérer l'amine primaire correspondante.

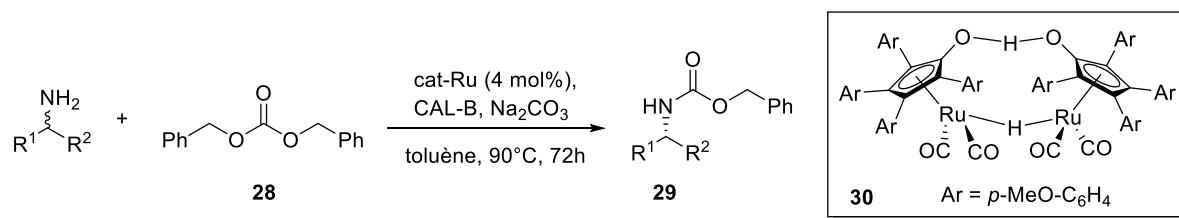


Schéma 16 : Résolution cinétique dynamique d'amines racémiques par l'enzyme CAL-B couplée à un catalyseur au ruthénium.

Peu de lipases sont capables de supporter les conditions exigées par ce type de racémisation chimique, ce qui diminue le spectre d'application. La nécessité d'une réaction subséquente pour recouvrir l'amine primaire, additionnée à l'utilisation des métaux de transitions accroissent l'impact environnemental de ces méthodes, mais les lipases restent encore largement utilisées en industrie pour la résolution cinétique d'amines.

2.3. TRANSAMINASES

2.3.1. Présentation générale

Les transaminases (TAs) font partie des enzymes les plus étudiées pour la formation d'amines chirales. Elles appartiennent à la famille des transférases (EC 2.6.1.X) et catalysent l'amination réversible d'une cétone par le transfert d'une fonction amine d'un substrat donneur vers un substrat accepteur (Schéma 17) (Slabu *et al.*, 2017). L'équilibre thermodynamique de la réaction n'est pas favorable à la synthèse de l'amine, mais à celui de la cétone (Kroutil *et al.*, 2013).

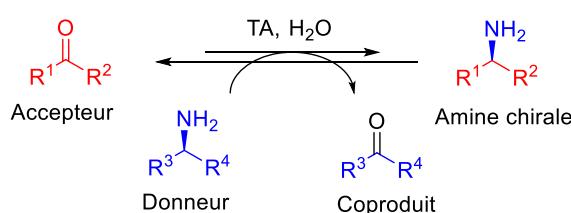


Schéma 17 : Réaction catalysée par les transaminases.

Les TAs sont dépendantes du cofacteur pyridoxal 5'-phosphate (PLP), forme biologiquement active de la vitamine B12. Il existe deux types de TAs PLP-dépendantes dans la nature, les α -TAs et les ω -TAs (Steffen-Munsberg *et al.*, 2015), classées en fonction des substrats accepteurs qu'elles convertissent.

Les α -TAs rassemblent toutes les enzymes catalysant le transfert d'une fonction amine sur un α -céto-acide, alors que les ω -TAs désignent des TAs fonctionnant sur des substrats dont la partie carboxylique est plus éloignée voire absente de la structure (Gomm and O'Reilly, 2018). Ces dernières possèdent donc un potentiel d'action plus large et sont beaucoup plus utilisées en biocatalyse.

2.3.2. Mécanisme réactionnel

Les TAs PLP-dépendantes réagissent selon un mécanisme ping-pong (Schéma 18) (Sayer *et al.*, 2014; Engelmark Cassimjee *et al.*, 2015). La première partie du mécanisme réactionnel permet la récupération du groupement amine du substrat donneur, tandis que la deuxième va fixer ce groupement sur le substrat accepteur (Fuchs *et al.*, 2015). La catalyse de la réaction commence par la formation d'une base de Schiff entre le résidu lysine contenu dans le site actif de la TA et l'aldéhyde du PLP (A). Cette aldimine réagit ensuite avec le substrat donneur pour former une imine protonée et supprimer ainsi la liaison covalente enzyme/PLP (B). L'imine se tautomérise ensuite grâce à l'intervention de la lysine et du noyau pyridine du PLP, source d'électrons (C-E) (Anderson, 2017). Elle est ensuite hydrolysée donnant le cofacteur sous forme de pyridoxamine 5'-phosphate (PMP), porteur de l'amine, et le sous-produit cétone de la réaction.

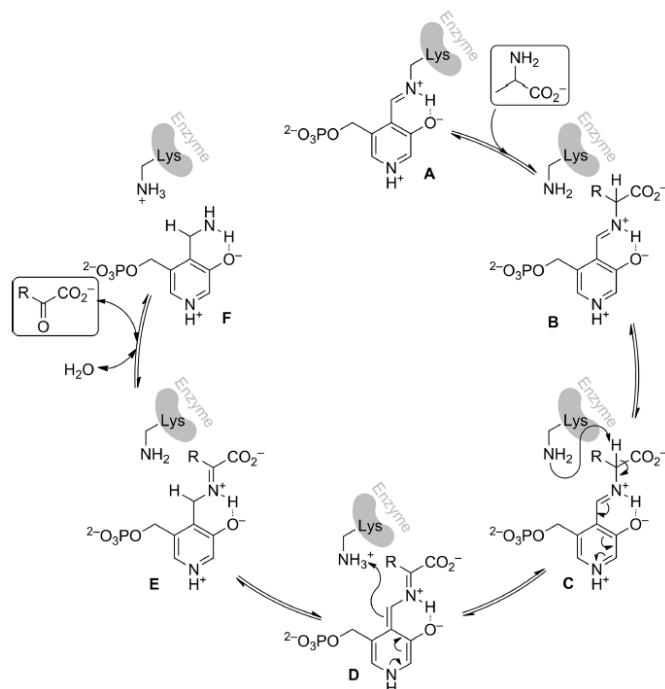


Schéma 18 : Mécanisme réactionnel des transaminases. Déamination dans le sens direct, amination dans le sens réverse. © Fuchs *et al.*, 2015.

La seconde partie du mécanisme reprend exactement les mêmes étapes dans le sens inverse, afin de transférer le groupement amine sur le substrat accepteur. Le substrat principal cétone de la réaction

forme une imine avec l'amine du PMP, libérant une molécule d'eau. La tautomérisation de cette imine permet ensuite l'attaque de la lysine qui se trouve de nouveau liée au PLP, régénérant la base de Schiff. Le produit de la réaction est alors formé et une nouvelle catalyse peut avoir lieu.

Les ω -TAs sont utilisées en biocatalyse à la fois pour la résolution cinétique d'un mélange racémique d'amine chirale, mais aussi pour la synthèse asymétrique d'amines énantiopures à partir de la cétone prochirale correspondante (Born scheuer and Höhne, 2009; Deslauriers, 2017).

2.3.3. Synthèse asymétrique et déplacement de l'équilibre thermodynamique

La synthèse asymétrique d'amines chirales *via* les ω -TAs peut conduire théoriquement à une transformation totale de la cétone en produit souhaité. Dans la pratique, un tel rendement n'est possible que si l'équilibre de la réaction, défavorable à la formation de l'amine, est déplacé (Gomm and O'Reilly, 2018; Guo *et al.*, 2018).

L'une des méthodes les plus simples pour déplacer cet équilibre consiste à utiliser un excès de cosubstrat, mais ceci engendre dans la plupart des cas l'inhibition de l'enzyme et des problèmes de stabilité (Tufvesson *et al.*, 2011).

Une autre façon de tirer la réaction vers la formation de l'amine est d'éliminer le coproduit (Schéma 19). Dans le cas où lalanine est utilisée en tant que donneur d'amine, des méthodes enzymatiques ont été développées afin de transformer le pyruvate généré en un autre produit non substrat des ω -TAs, selon un processus très favorable thermodynamiquement (Schéma 19A) (Turner *et al.*, 2009). Deux enzymes sont fréquemment employées :

- La pyruvate décarboxylase : elle forme du formaldéhyde et libère du CO₂, rendant alors irréversible la réaction (Höhne *et al.*, 2008).
- La lactate déshydrogénase (LDH) : cette oxydo-réductase transforme le pyruvate en lactate grâce au cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide (NADH). Ce cofacteur, relativement onéreux, ainsi que sa forme phosphatée (NADPH), sont très souvent employés en biocatalyse. Des systèmes permettant leur utilisation en quantité catalytique grâce à leur régénération dans le milieu ont alors été développés et font généralement appel à une seconde enzyme (Chenault and Whitesides, 1987; Zhao and van der Donk, 2003). Dans l'exemple présenté, la glucose déshydrogénase (GDH) oxyde le glucose en gluconolactone en se servant du NAD⁺ produit par la LDH ; le NADH est alors reformé. Néanmoins, l'ajout de la GDH complexifie le milieu.

Plutôt que de transformer le pyruvate, il est également possible de le régénérer en donneur d'amine, ce qui permet d'introduire lalanine en quantité catalytique, évitant ainsi l'inhibition par excès de

substrat (Schéma 19B). En revanche, l'alanine déshydrogénase (AlaDH) utilisée dans ce cas-là est une enzyme NADH-dépendante qui nécessite un système de recyclage de ce cofacteur, ce qui complexifie là aussi le milieu réactionnel (Simon *et al.*, 2014).

L'utilisation d'isopropyle amine en remplacement de l'alanine peut être une alternative et présente l'avantage de conduire à la formation d'acétone pouvant être éliminée du milieu par évaporation en cours de réaction (Schéma 19C). D'autres composés tels que des diamines, qui après réaction se cyclisent spontanément, sont également étudiés mais ils entraînent une difficulté de purification du composé cible à plus grande échelle (Gomm and O'Reilly, 2018).

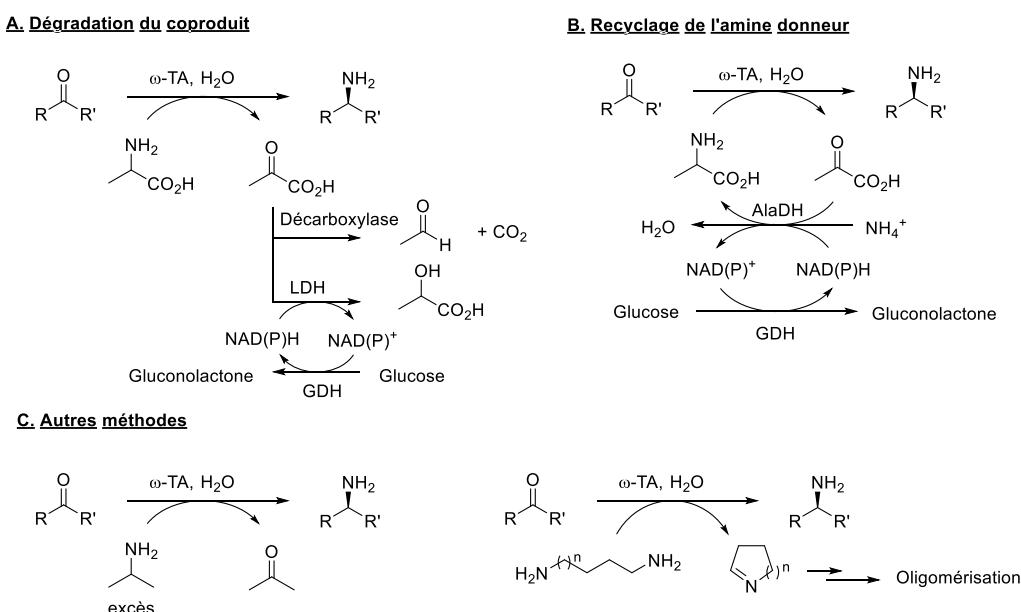


Schéma 19 : Méthodes de déplacement de l'équilibre de la réaction catalysée par les transaminases. TA = transaminase, LDH = lactate déshydrogénase, GDH = glucose déshydrogénase, AlaDH = Alanine déshydrogénase.

2.3.4. Résolution cinétique

Les ω -TAs étant très stéréosélectives, elles peuvent être impliquées dans des processus de résolution cinétique (Schéma 20) (Born scheuer and Höhne, 2009; Deslauriers, 2017). L'équilibre de la réaction est dans ce cas favorable à la formation de la cétone (Koszelewski *et al.*, 2010).

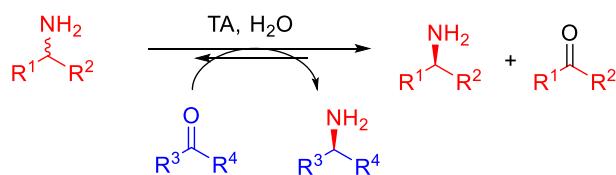


Schéma 20 : Résolution cinétique d'un mélange racémique d'amine par les transaminases.

Bien que fréquemment utilisée (Hanson *et al.*, 2008; Koszelewski *et al.*, 2009; Bea *et al.*, 2011), cette méthode souffre de quelques inconvénients outre le rendement maximal de 50 %. Le premier est sans conteste la formation de deux sous-produits de réaction qui complique grandement la purification. De plus, ces sous-produits génèrent très souvent une inhibition de l'enzyme, notamment lorsque le pyruvate est utilisé en tant qu'amino accepteur (Yun *et al.*, 2005; Gundersen *et al.*, 2015). Afin de contourner ce problème, les méthodes d'élimination de la cétone ou de recyclage du coproduit de réaction vues précédemment peuvent aussi être appliquées (Koszelewski *et al.*, 2010). Il est également possible d'augmenter les rendements théoriques en couplant deux TAs de stéréosélectivités inverses afin d'obtenir 100% de l'énanthiomère d'intérêt (D. Patil *et al.*, 2018).

2.3.1. Stéréosélectivité et spectres de substrats

La majorité des TAs sont (*S*)-sélectives. Ceci est dû à l'existence de deux poches dans le site actif, une étroite et une large accueillant respectivement les substituants « large » et « small » du substrat (Figure 6) (Fuchs *et al.*, 2015). Si le groupement « large » peut avoir une certaine flexibilité de structure, ce n'est pas le cas du groupement « small » qui se restreint souvent à un méthyle ou un éthyle. Ceci limite donc le spectre de substrats de ces enzymes.

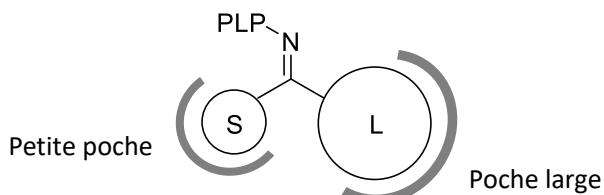


Figure 6 : Structure des substrats des transaminases. Adaptée de Fuchs *et al.*, 2015.

Néanmoins, des travaux d'ingénierie protéique peuvent permettre de pallier ces inconvénients. Il est en effet possible de changer la stéréosélectivité des transaminases (Svedendahl *et al.*, 2010) ou encore de leur faire accepter des substrats avec deux groupements larges.

Un des exemples remarquables est l'ingénierie réalisé par Codexis© sur une (*R*)- ω -TA afin qu'elle accepte la cétone pro-sitagliptine **31** et qu'elle remplace ainsi la catalyse initiale au rhodium dans le procédé de synthèse de la sitagliptine (Schéma 21) (Savile *et al.*, 2010). Des études par modélisation et docking ont permis d'identifier les interactions défavorables à la fixation de **31**. Par mutation dirigée de 27 résidus impliqués, l'équipe a alors réussi à rendre le composé **31** substrat de la (*R*)- ω -TA. Un rendement total supérieur de 13 % par rapport à l'utilisation du rhodium avec un *ee* supérieur à 99,95 % a été obtenu et la productivité a été augmentée de 53 %.

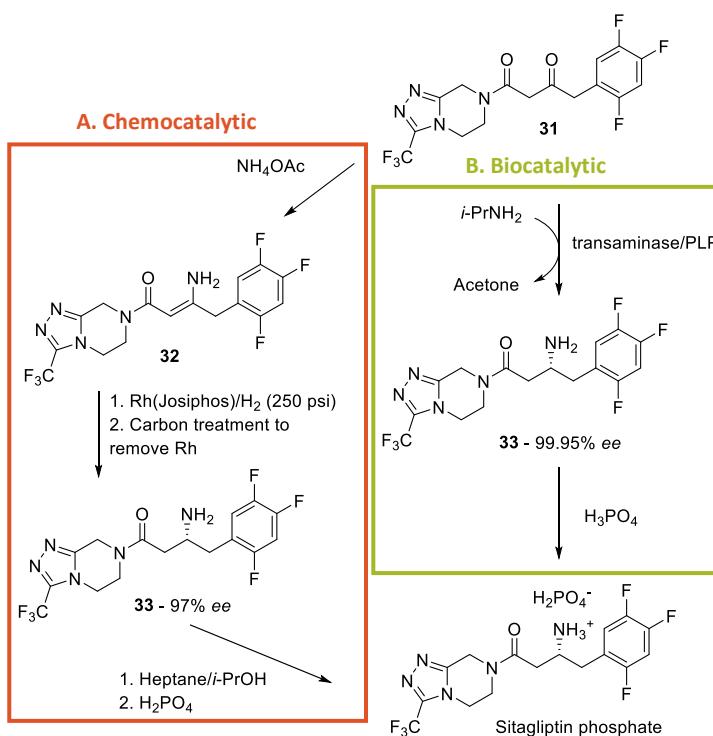


Schéma 21 : Synthèse biocatalytique vs synthèse chimique de la sitagliptine. *i*-PrOH = isopronanol. Adapté de Savil *et al.*, 2010.

Plus récemment, des sites clés de mutations ont été identifiés par l'équipe de Bornscheuer dans les ω -TAs permettant la transformation de cétones aromatiques et aliphatiques encombrées telles que la 2,2-diméthyl-1-phényl-propan-1-one (Weiß *et al.*, 2016, 2017).

Au vu des nombreux travaux effectués sur ces TAs, des outils informatiques se sont récemment développés. A partir d'une étude bibliographique poussée répertoriant et analysant plus de 500 TAs, Bornscheuer *et al.* ont mis en place une base donnant accès aux enzymes les plus adaptées pour une transformation souhaitée (Calvelage *et al.*, 2017). Une autre base de données, créée par Bruss *et al.* (ω -Transaminase Engineering Database (oTAED)) répertorie quant à elle, les séquences et les données de structure des ω -TAs (Buß *et al.*, 2018). Elle compte déjà plus de 67 000 enzymes, classées en fonction de leur homologie de séquence et permet l'identification rapide des positions équivalentes dans les protéines homologues, grâce à un schéma de numérotation standard.

2.3.2. Conclusion

Les ω -TAs ont donc un fort potentiel pour la formation d'amines chirales de par leur grande stéréosélectivité. De plus, la connaissance de leur structure et du mécanisme réactionnel permet de créer de manière raisonnée des variants actifs sur des substrats éloignés des ceux naturels. Utilisées dans des synthèses asymétriques directes d'amines chirales, les TAs sont également souvent retrouvées dans des cascades multi-enzymatiques (Ricca *et al.*, 2011). Ces travaux ne seront pas plus développés dans ce

manuscrit, mais nous pouvons tout de même citer leur implication dans la formation d'amine à partir d'alcool *via* une alcool déshydrogénase² (ADH) (Fuchs *et al.*, 2015) ou dans la création de liaison C-C par couplage avec une transcétolase³ pour la synthèse de sucres (Lorilliére *et al.*, 2017).

2.4. AMINOMUTASES

Les aminomutases (AMs) (EC 5.4.3) font partie de la classe enzymatique des isomérasées. Elles catalysent l'échange réversible d'un hydrogène et d'une fonction amine portés par des carbones voisins (Schéma 22).

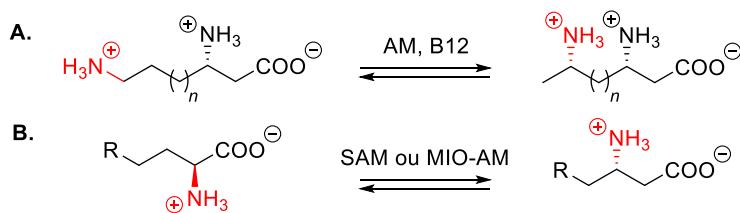


Schéma 22 : Réactions catalysées par les aminomutases. AM = aminomutase, SAM = aminomutase S-adénosyle méthionine dépendante, MIO-AM = aminomutase 4-méthylidène imidazole-5-one dépendante.

Dans la nature, ces enzymes sont impliquées dans le catabolisme anaérobie des acides aminés mais également dans la synthèse de molécules biologiquement actives telles que la blasticidine, la viomycine et le taxol (Wu *et al.*, 2011). Les aminomutases présentent une variété de mécanismes réactionnels, et se divisent en trois catégories principales : les adénosylcobalamine, méthionine adénosyle et 4-méthylidène imidazole-5-one dépendantes.

2.4.1. Les aminomutases adénosylcobalamine dépendantes

Les aminomutases adénosylcobalamine (coenzyme B12) dépendantes catalysent la migration d'une amine terminale d'un substrat à chaîne aliphatique sur le carbone directement voisin de cette fonction (Schéma 22A). Elles agissent selon un mécanisme radicalaire comptant au minimum 12 étapes, et ont besoin de l'intervention du coenzyme B12 (source de radical) et de phosphate pyridoxal (PLP) comme cofacteur afin de stabiliser les radicaux formés (Wolthers *et al.*, 2008). Le substrat est par contre un α -acide aminé.

² Les alcools déshydrogénases catalysent la réduction réversible d'une fonction cétone en alcool (cf I.2.7.3.1)

³ Les transcétolases catalysent la formation de cétoses D-thréo à partir d'aldéhydes α -hydroxylés.

Majoritairement issues d'organismes anaérobies, ces enzymes sont tout de même tolérantes à l'oxygène, ce qui facilite leur purification et leur utilisation. Cependant, malgré leur potentiel intérêt dans la synthèse d'amines chirales, cette catégorie d'enzymes est peu étudiée en biocatalyse notamment à cause des cofacteurs coûteux (B12 et PLP) indispensables à la catalyse.

2.4.2. Les aminomutases *S*-adénosyle méthionine dépendantes

Similaires en terme de substrats et de mécanisme aux précédentes, les aminomutases *S*-adénosyle méthionine (SAM-AMs) dépendantes sont, elles, spécialisées dans la transformation des α -amino acids en β -amino acids (Schéma 22B) (Wang and Frey, 2007). Ces produits étant des cibles thérapeutiques importantes, ces enzymes ont par exemple fait l'objet d'un dépôt de brevet par BASF $^{\circledR}$ pour la formation de (*S*)- β -lysine par la 2,3-lysine aminomutase issue de *Clostridium subterminal* (Frey and Ruzicka, 2008).

L'utilisation des SAM-AMs en biocatalyse est tout de même freinée par l'anaérobie stricte requise à leur fonctionnement et le besoin de cofacteurs onéreux.

2.4.3. Les aminomutases 4-méthylidène imidazole-5-one dépendantes.

Les aminomutases 4-méthylidène imidazole-5-one (MIO) dépendantes catalysent la même réaction que les SAM-AMs, à la différence près qu'elles ne sont actives que sur des acides aminés aromatiques, de type tyrosine, phénylalanine ou tryptophane (Turner, 2011). Mécanistiquement et structuralement parlant, ces enzymes sont proches des ammonia lyases (développées dans le paragraphe suivant) : elles font appel au cofacteur MIO, formé autocatalytiquement à partir du tripeptide Ala-Ser-Gly et interne à l'enzyme.

Plusieurs mécanismes réactionnels ont été proposés pour ces enzymes, mais après des études cristallographiques et de docking, le plus probable serait celui où le MIO joue le rôle d'accepteur électrophile de l'amine (Schéma 23) (Louie *et al.*, 2006; Christianson *et al.*, 2007).

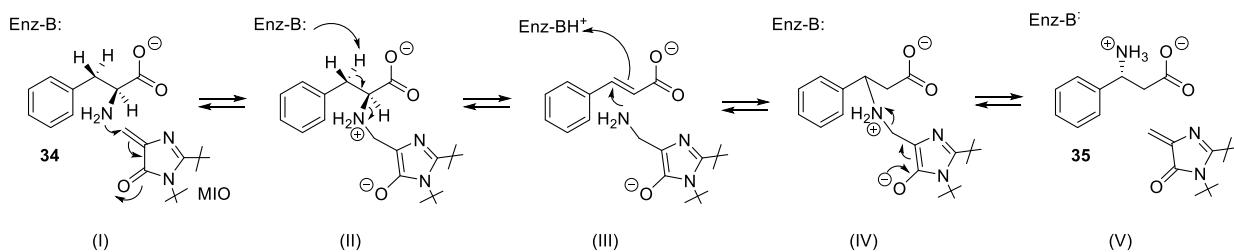


Schéma 23 : Mécanisme supposé des aminomutases MIO dépendantes. Adapté de Wu *et al.*, 2011.

Après formation de l'énone MIO et attaque nucléophile en 1,4 de l'amine de l'acide sur cette dernière (I), l'amine se retrouve transitoirement fixée au MIO (II-III). Cette dernière réagit ensuite sur le C β de l'acide α - β insaturé pour donner le β -amino acide correspondant et le MIO (IV-V).

Insensibles à la présence d'oxygène, ces enzymes sont utilisées principalement pour la synthèse de β -amino acides aromatiques non naturels (Klettke *et al.*, 2007). Les AMs étant sélectives des α -amino acides de configuration (*S*), lorsque que le produit de départ est racémique, les MIO-AMs peuvent être couplée à une racémase pour obtenir un système de RCD comme montré dans le cas de la phénylalanine aminomutase (PAM) (Schéma 24) (Cox *et al.*, 2009).

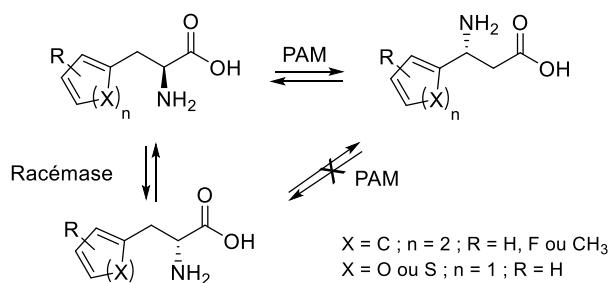


Schéma 24 : Formation d'un β -amino acide par couplage entre la phénylalanine aminomutase (PAM) et une racémase. Adapté de Cox *et al.*, 2009.

2.5. AMMONIA LYASES

Les ammonia lyases (ALs) (EC 4.3.1.23/25) réalisent l'hydroamination réversible régio- et stéréosélective d'ammoniac sur une double liaison *trans* en α d'un acide pour donner l'amino acide correspondant (Schéma 25) (Puthan Veetil *et al.*, 2012).

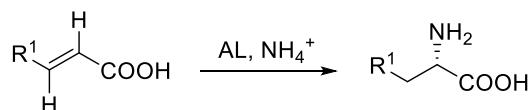


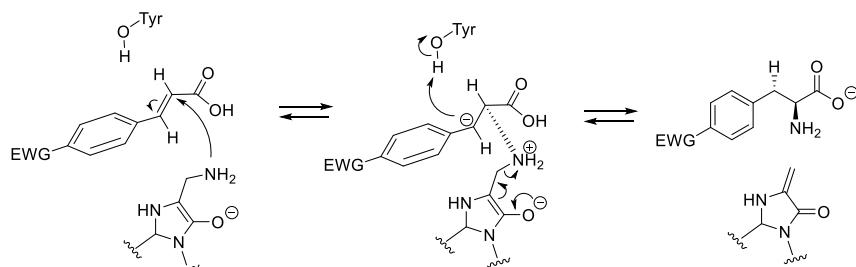
Schéma 25 : Réaction catalysée par les ammonia lyases (ALs).

Il existe deux types d'ALs, les MIO dépendantes, pour les acides aminés aromatiques (phénylalanine AL (PAL), tyrosine AL (TAL), histidine AL (HAL)) et les MIO indépendantes telles que les aspartases (Heberling *et al.*, 2013).

Le mécanisme de ces enzymes n'est pas bien résolu, mais passerait par la formation d'un carbanion (mécanisme type E1bc dans le sens de l'élimination de l'azote) (de Villiers *et al.*, 2012; Lovelock *et al.*, 2014; Parmeggiani *et al.*, 2017). Dans le cas des ALs MIO-dépendantes, l'ammoniac réagirait tout

d'abord avec le cosubstrat MIO puis l'amine formée attaquerait le carbone sp^2 en α de l'acide carboxylique, sur la face *si* du substrat (Schéma 26A). Le carbanion ainsi généré et stabilisé par délocalisation récupérerait un proton d'un résidu type tyrosine. Ce mécanisme engendre une hydroamination en *trans* sur la double liaison.

A) Enzymes MIO-dépendantes



B) Enzymes MIO-indépendantes

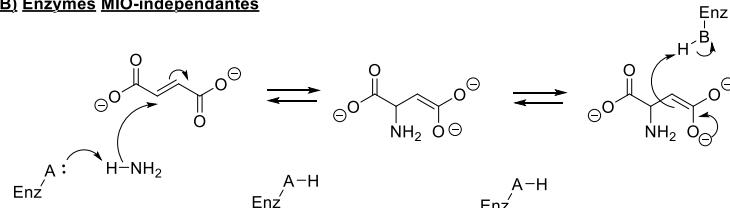


Schéma 26 : Mécanisme réactionnel supposé des ammonia lyases (AL). A) ALs MIO dépendantes, B) ALs MIO-indépendantes. Adapté de de Villiers *et al.*, 2012. ; Lovelock *et al.*, 2014.

Le mécanisme des ALs MIO-indépendantes resterait globalement identique, mis à part que l'ammoniac attaquerait directement le C sp^2 , avec capture concertée d'un proton par un résidu basique de la poche catalytique (Schéma 26B). La formation du carbanion lors de la réaction restreint le spectre de substrats à des molécules possédant des groupements stabilisants (acide, aromatique).

Ces enzymes sont intéressantes d'un point de vue industriel puisque, contrairement aux transaminases vues précédemment, elles ne nécessitent pas de système de déplacement de l'équilibre, un excès d'ammoniac étant suffisant (Schulze and Wubbolts, 1999). De plus, l'amine souhaitée est obtenue sans coproduit. DSM[®] utilise par exemple la PAL dans un procédé permettant la production de l'intermédiaire clé **38**, utilisé dans la synthèse de l'indoline (Schéma 27) (de Lange *et al.*, 2011).

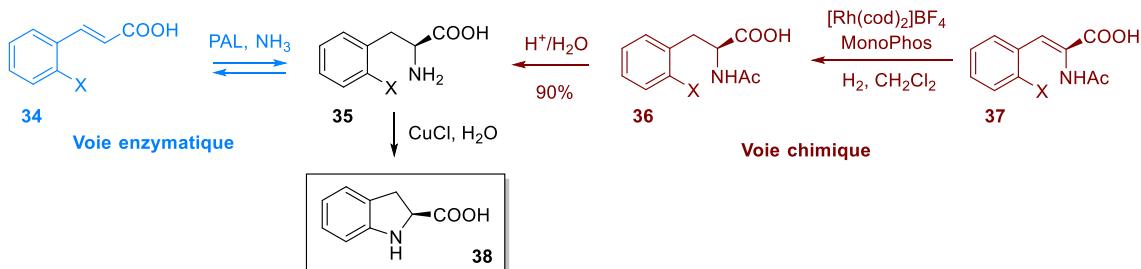


Schéma 27 : Synthèse enzymatique et chimique de l'intermédiaire 38. Adapté de de Lange *et al.*, 2011.

Initialement réalisée par réduction asymétrique catalysée au rhodium de l'énamine **37** et clivage du groupement protecteur, la synthèse du dérivé de la phénylalanine (**35**) a été remplacée par l'hydroamination de l'acide cinnamique (**34**) catalysée par la PAL. Grâce à l'utilisation des cellules entières de *E.coli* contenant la protéine surexprimée, l'amino acide **35** est obtenu avec un rendement de 91 % en 8,5 h et un *ee* de 99 %. Une analyse prenant en compte le matériel, l'énergie et les déchets de la synthèse a montré que l'empreinte carbone de ce nouveau procédé est diminuée de plus de 50 % par rapport à l'ancien.

Des travaux d'ingénierie sur le site actif d'une PAL récemment découverte de *Planctomyces brasiliensis* ont permis d'élargir la poche catalytique de cette enzyme (Ahmed *et al.*, 2018). De nouveaux substrats aromatiques enrichis en électrons sont alors convertis dans des proportions similaires à la PAL sauvage sur son substrat naturel. De plus, les variants obtenus conservent une forte énantiométrie (*ee* > 99%) et des synthèses à l'échelle préparative ont conduit à des rendements compris entre 10 et 63 %.

Malgré leur potentiel, ces enzymes ne sont utilisées que dans la synthèse d' α -acides aminés et ne seront donc pas plus développées ici.

2.6. OXYDO-REDUCTASES

2.6.1. Monoamine Oxidases

Les monoamine oxydases (MAOs) (EC 1.4.3.4) flavine adénine dinucléotide (FAD) dépendantes catalysent la réaction irréversible d'oxydation d'une fonction amine en imine et génèrent du peroxyde d'hydrogène (Schéma 28). Le FAD est un cofacteur d'oxydo-réduction dérivant de la riboflavine (vitamine B2) et se lie de façon covalente à l'enzyme (groupement prosthétique). Ces enzymes sont beaucoup étudiées d'un point de vue biologique puisqu'elles sont impliquées entre autres dans le métabolisme des neurotransmetteurs amines et sont alors devenues des cibles thérapeutiques pour le traitement des dépressions (Dostert *et al.*, 1989; Edmondson *et al.*, 2005).

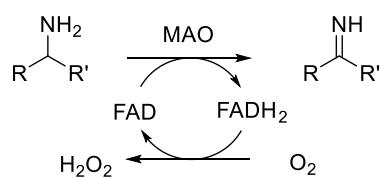


Schéma 28 : Réaction catalysée par les monoamine oxydases (MAOs).

En 2002, Alexeeva *et al.* utilisent pour la première fois ces enzymes dans un processus de déracémisation de la 1-phénylethan-1-amine (**1**) (Alexeeva *et al.*, 2002). Après mutation de la MAO d'*Aspergillus niger* (MAO-N), le simple mutant N336S s'est révélé être 10 fois plus actif et 80 fois plus sélectif de l'énanthiomère (*S*) que l'enzyme sauvage. Couplée au complexe ammonium-borane permettant la réduction de l'imine formé **39** en amine racémique **1**, la RCD ainsi mise en place conduit à l'obtention du composé (*R*)-**1** avec un *ee* de 93 % et un rendement de 77 % (Schéma 29).

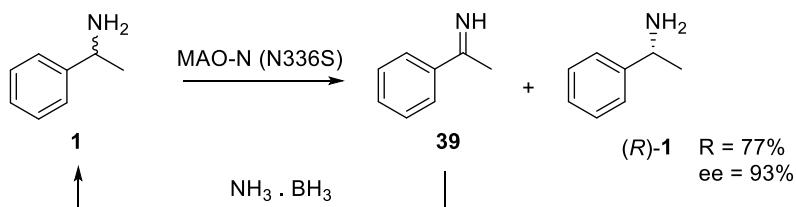


Schéma 29 : Réaction de déracémisation de la 1-phénylethan-1-amine (**1**) par couplage de la MAO-N avec NH₃.BH₃.

A la suite de ces premiers travaux, d'importantes études sur l'ingénierie de ces enzymes ont permis la création de plusieurs mutants de la MAO-N, actifs sur différents types de substrats, allant des amines à chaînes aliphatiques, aux amines secondaires cycliques aromatiques (Figure 7A) (Ghislieri *et al.*, 2013). Ils ont notamment permis l'acceptation de substituants encombrants de part et d'autre de l'amine, non pris par les MAOs sauvages connues. Le mutant MAO-N D11 a par exemple été utilisé dans une étape de la synthèse de la lévocétrizine (Figure 7B). L'amine optiquement enrichie **50** est obtenue avec un rendement de 45 % et un *ee* de 97 % grâce à un processus de RCD couplant la MAO-N D11 avec la réduction de l'imine par le complexe BH₃-NH₃.

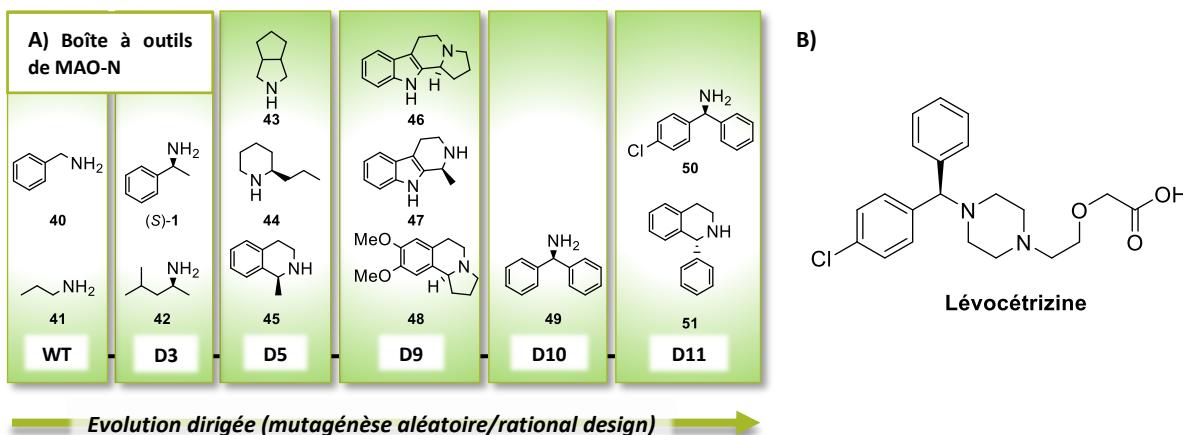


Figure 7 : A) Boîte à outils de différentes MAOs développées par ingénierie protéique. Adaptée de Ghislieri *et al.*, 2013. B) Structure de la lévocétrizine.

Des travaux similaires ont été réalisés par Li *et al.*, sur la cyclohexylamine monoamine oxidase de *Brevebacterium oxydans* (Li *et al.*, 2016). Après construction et criblage d'une banque de mutants, ils ont mis en évidence une amélioration de l'activité sur des amines primaires ou secondaires telles que la (*S*)-1-phénylpropan-1-amine ou la (*S*)-heptan-2-amine en fonction des mutations réalisées.

Les MAOs sont donc une alternative possible aux lipases pour la résolution d'amines chirales (Leisch *et al.*, 2011). Cependant, l'imine formée est sensible à l'hydrolyse et le produit indésirable alcool alors obtenu fait généralement chuter les rendements ce qui limite leur développement en biocatalyse.

2.6.2. Acide aminé déshydrogénases

Les acides aminés déshydrogénases (AADHs) (EC 1.4.1.X) sont des enzymes NAD(P)H-dépendantes qui catalysent la réaction d'amination réductrice d'un α/β -céto-acide avec l'ammoniac pour former l'acide α/β -aminé correspondant (Schéma 30).

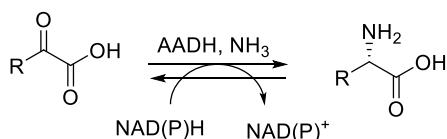
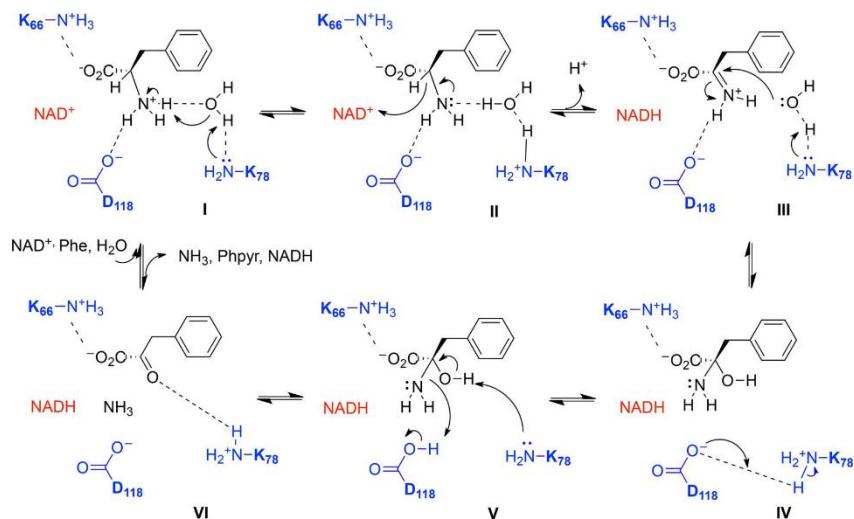


Schéma 30 : Réaction d'amination réductrice d'un α -céto acide catalysée par les AADHs.

Une vaste bibliographie sur les AADHs existe, aussi bien en termes d'études biochimiques que sur leurs diverses applications (Polaina, 2007). Grâce aux études mécanistiques et cristallographiques, leur mécanisme réactionnel ainsi que la structure de leur site actif sont maintenant bien connus (Brunhuber *et al.*, 2000). Deux résidus apparaissent indispensables à la catalyse et sont retrouvés dans la majorité des AADHs : un résidu lysine et un glutamate, respectivement K78 et D118 dans la phénylalanine déshydrogénase (PheDH) de *Rhodococcus sp.* dont le mécanisme est décrit dans le Schéma 31 pour la déamination oxidative (Brunhuber *et al.*, 2000).

Le substrat entre dans la poche catalytique sous forme zwitterionique et se fixe *via* des interactions ioniques et/ou liaisons hydrogènes, notamment entre la partie carboxylique de la phénylalanine et les résidus K66 et N262 du site actif. La catalyse commence par la déprotonation de la fonction amine du substrat par une molécule d'eau, activée par la lysine 78 (I). L'iminium se forme ensuite par transfert de l'hydrure du C α sur le NAD $^+$ (II), puis réagit avec une molécule d'eau (III), conduisant à la formation de l'intermédiaire hémiaminal (IV). Une prototropie entre D118 et K78 permet de régénérer K78 sous forme basique qui va alors déprotoner l'alcool de l'intermédiaire hémiaminal et provoquer le départ d'ammoniac (V). Le phénylpyruvate est libéré, suivi de l'ammoniac et du NADH (VI).


 Schéma 31 : Mécanisme réactionnel de la PheDH de *Rhodococcus sp.* © Sharma *et al.*, 2017.

Comme les ALs vu précédemment (cf. I.2.5), ces enzymes sont utilisées pour la synthèse d' α -amino-acide et ne seront donc pas plus développées.

2.6.3. Imine Réductases

Les imines réductases (IREDs) (EC 1.5.1.48) sont des oxydo-réductases NADPH-dépendantes qui catalysent la réduction asymétrique d'une imine prochirale en amine correspondante (Schéma 32).

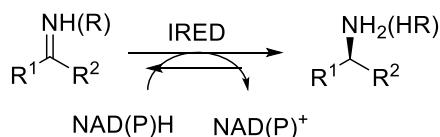


Schéma 32 : Réaction catalysée par les imine réductases (IREDs).

Dans la nature, ces enzymes sont impliquées dans de nombreuses voies de biosynthèse de composés biologiquement actifs tels que le folate, des dérivés de sidérophore ou encore la morphine (S. C. Cosgrove *et al.*, 2018). La diversité structurale de leur(s) substrat(s) natif(s), tous cycliques cependant, a entraîné des évolutions distinctes de ces enzymes et les séquences primaires répertoriées aujourd'hui pour les IREDS sont souvent éloignées les unes des autres (Mangas-Sánchez *et al.*, 2017).

Bien qu'intensément étudiées d'un point de vue physiologique et biochimique de par leur intervention dans le métabolisme, les IREDS n'étaient jusqu'alors que peu exploitées en biocatalyse, notamment à cause de leur spectre de substrats restreint aux imines endocycliques mais aussi de l'instabilité de ces dernières en milieu aqueux (Godoy Alcántar *et al.*, 2005). Néanmoins, de récents travaux ont décrit des

IREDs actives sur des imines exocycliques, c'est pourquoi ces enzymes vont être détaillées dans la suite de ce manuscrit.

2.6.3.1. Structure, mécanisme et site actif

Les IREDs sont des enzymes dimériques dans lesquelles le domaine Rossman N-terminal d'un des monomères est relié au domaine C-terminal du second *via* un réseau hélicoïdale caractérisé par l'interaction d'une longue hélice α (Figure 8A) (Grogan and Turner, 2016). La structure de la protéine reste flexible au cours de la catalyse, en particulier au niveau du site actif situé à l'interface des deux monomères, où un rapprochement des deux domaines semble s'opérer après fixation du substrat et du NADPH (Sharma *et al.*, 2017).

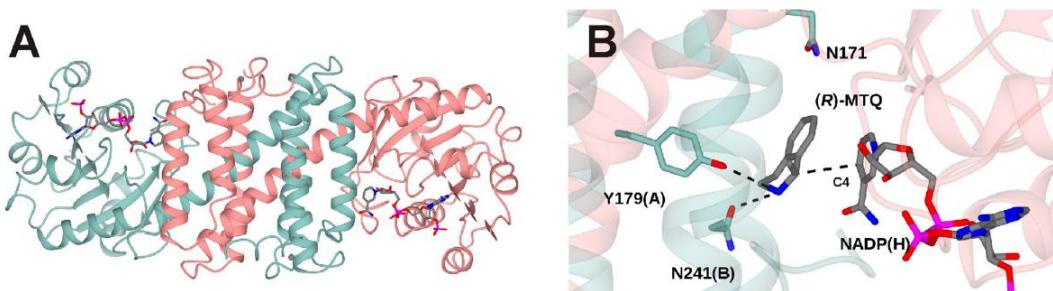


Figure 8 : Structure des IREDs. A) Structure dimérique de l'IRED d'*Amycolatopsis orientalis* (AoIRED). B) Site actif en présence du NADPH et du substrat (R)-1-méthyl-tétrahydroisoquinolidine ((R)-MTQ). © Sharma *et al.*, 2017.

Si la structure 3D de ces enzymes est plutôt bien définie, les résidus impliqués dans la catalyse ne sont pas clairement identifiés. Deux hypothèses de mécanisme réactionnel ont été proposées, mais le plus probable suggère que le substrat imine serait tout d'abord protonné par une molécule d'eau, puis l'iminium ainsi formé serait réduit par transfert de l'hydrure du NADPH (Rodríguez Mata *et al.*, 2013; Fademrecht *et al.*, 2016). L'enzyme n'interviendrait alors que dans le positionnement du substrat afin qu'il ait l'orientation et la distance optimales pour être réduit. Aucun résidu donneur de proton du site catalytique ne serait donc essentiel à la catalyse, bien que certaines IREDs possèdent une tyrosine ou un aspartate pouvant jouer ce rôle (Figure 8B).

Une analyse plus approfondie des séquences des différentes IREDs ont permis de proposer un motif caractéristique du site actif de ces enzymes : Gx[DE]x[GDA]x[APS]x3{K}x[ASL]x[LMVIAG en position standard 177–191 (Fademrecht *et al.*, 2016).

2.6.3.2. Exemple de réductions catalysées par les IREDs

Mitsukura *et al.* ont été les premiers à rapporter la réduction asymétrique d'imines cycliques par des IREDs (Mitsukura *et al.*, 2011, 2013). A partir de deux IREDs différentes isolées de deux souches

distinctes de *Streptomyces*, ils ont réussi à obtenir les deux énantiomères de la 2-méthylpyrrolidine (**53**) (Schéma 33).

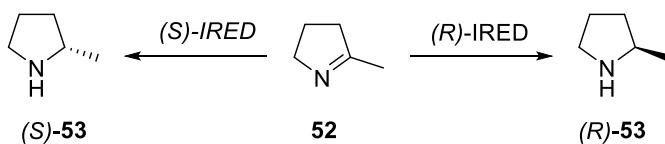


Schéma 33 : Réduction de l'imine (**52**) catalysée par une (*S*)-IRED ou une (*R*)-IRED.

En 2014, Müller *et al.* démontrent que les IREDs peuvent être utilisées pour l'amination réductrice de composés carbonylés (Huber *et al.*, 2014). Malgré une faible conversion obtenue (8,8 %), ils ont réussi à isoler la (*2R*)-*N*-méthyl-4-phénylbutan-2-amine (**58**) avec un *ee* de 76 % (Schéma 34). Le large excès de méthylamine (**55**) utilisé (0,02 µmol de substrat pour 220 mmol de méthylamine) ainsi que la faible conversion laissent supposer que l'IRED ne catalyse pas la formation de l'imine dans cette réaction, mais la réduirait uniquement une fois celle-ci préformée dans le milieu.

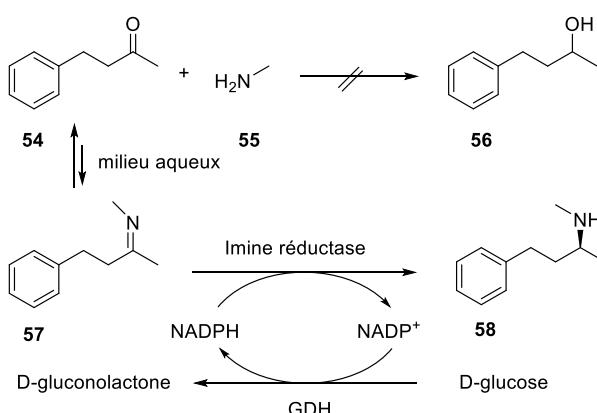


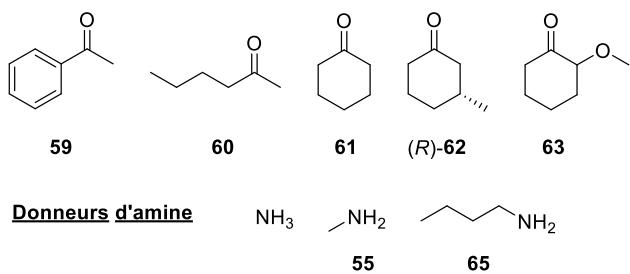
Schéma 34 : Synthèse de la (*2R*)-*N*-méthyl-4-phénylbutan-2-amine (**58**) à partir de la 4-phénylbutan-2-one (**54**) après préformation de l'imine **57** en milieu aqueux et réduction catalysée par une IRED.

Depuis ces travaux, la recherche sur les IREDs s'est intensifiée et elles ont été utilisées pour la synthèse d'amines secondaires cycliques optiquement pures principalement, mais aussi dans des cascades enzymatiques (Lenz *et al.*, 2017).

Récemment, Weltz *et al.* ont criblé 33 IREDs sur 5 cétones (**59-63**) et 3 amines (ammoniac, **55** et **65**) introduits à 12,5 équivalents (Schéma 35A) (Wetzl *et al.*, 2016). La méthylamine est ressortie comme la meilleure source d'amine pour la majorité des IREDs et des substrats testés, avec des conversions pouvant atteindre plus de 90 %. Ce criblage révèle également qu'une dizaine d'enzymes permettent la formation d'amines primaires par l'utilisation de l'ammoniac en tant que source d'amine, mais ces enzymes ne semblent toujours pas catalyser la formation de l'imine. Des conversions de 85 et 96 % sont

obtenues respectivement avec la 3-méthylcyclohexanone ((*R*)-**62**) et la 2-méthoxycyclohexan-1-one (**63**). Une montée en échelle sur 100 mg de (*R*)-**62** a permis d'obtenir un rendement de 50 % en 3-méthylcyclohexylamine ((*1S*-*3R*)-**66**) avec un excès diastéréoisomérique de 94 % mais une concentration assez élevée d'enzyme (Schéma 35B).

A) Cétones criblées



B) Exemple de synthèse

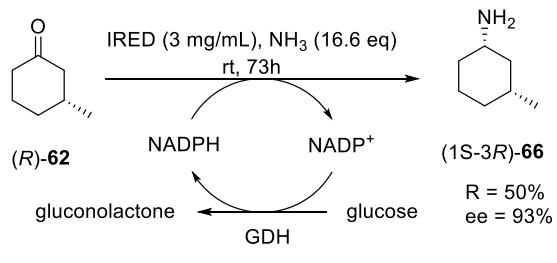


Schéma 35 : A) Composés carbonylés et amines testées lors du criblage. B) Réaction d'amination réductrice de la (3*R*)-3-méthylcyclohexanone (62) avec catalyse de la réduction de l'imine par une IRED.

2.6.3.3. Amination réductrice catalysée par les réductives aminases

Les réductives aminases (RedAms) sont une sous-classe des IREDs nouvellement découvertes, qui catalysent à la fois la formation de l'imine et sa réduction au cours de la réaction d'amination réductrice, contrairement aux IREDs décrites jusqu'alors (Schéma 36) (Aleku *et al.*, 2017; Roiban *et al.*, 2017; France *et al.*, 2018). Il n'est alors pas nécessaire d'utiliser un large excès d'amine, ce qui les rend plus attractives pour des applications biocatalytiques.

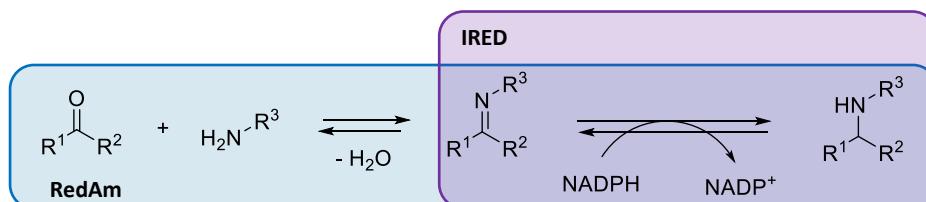


Schéma 36 : Différence entre IRED et RedAm. Adapté de France *et al.*, 2018.

Aleku *et al.* ont rapporté la première RedAm issue d'un champignon, *Aspergillus oryzae* (*AspRedAm*) (Aleku *et al.*, 2017). Un criblage de cette enzyme sur 32 composés carbonylés avec 19 amines différentes a montré qu'*AspRedAm* posséde un très large spectre de substrats, avec tout de même une activité très préférentielle pour la formation d'amines secondaires. Seule l'amination réductrice de la cyclohexanone avec 4 équivalents d'ammoniac est reportée et conduit à une conversion de 47 % en cyclohexylamine.

Le repliement 3D de l'AspRedAm est caractéristique de celui des IREDs vu précédemment, cependant leur structure globale est plus compacte, notamment au niveau du site actif où le mouvement de fermeture des deux domaines conduit à une poche plus étroite (Figure 9).

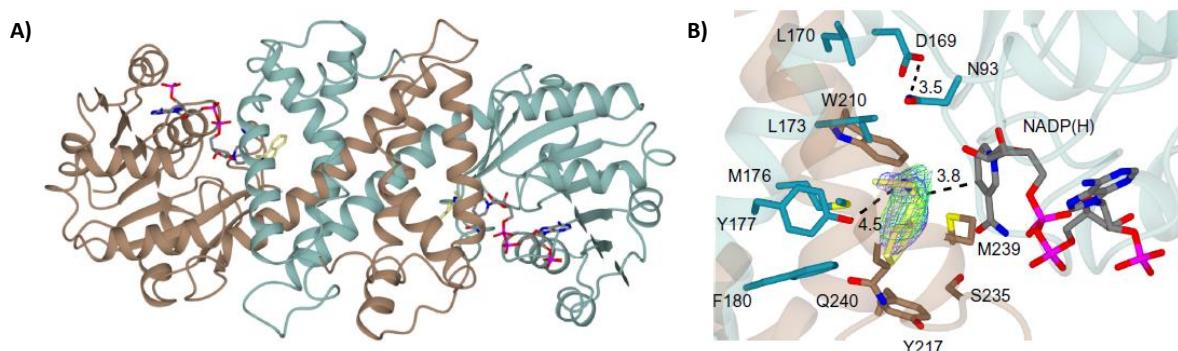


Figure 9 : A) Repliement dimérique d'AspRedAm. B) Site actif d'AspRedAm. © Aleku *et al.*, 2017.

Des études poussées sur la cinétique de cette enzyme ont révélé qu'elle obéit à un mécanisme réactionnel séquentiel ordonné (Schéma 37). La catalyse de l'amination réductrice par l'AspRedAm commence par la fixation du cofacteur NADPH. Le composé carbonylé entre dans un second temps, suivi de l'amine. Après transformation du substrat, l'enzyme libère le produit puis le NADP⁺.

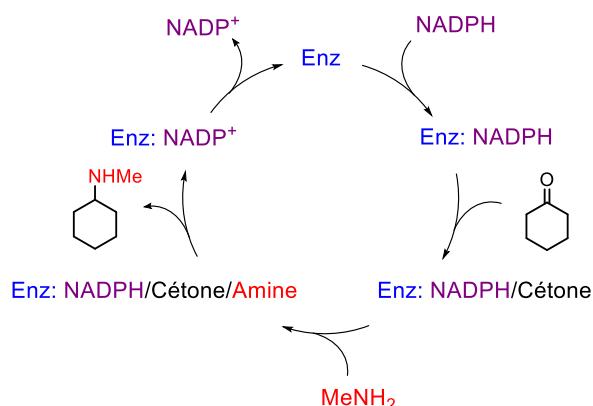


Schéma 37 : Mécanisme réactionnel de AspRedAm. Adapté de Aleku *et al.*, 2017.

Par ailleurs, alors que l'enzyme sauvage AspRedAm montre une stéréosélectivité pour la synthèse des composés aminés (*R*), la simple mutation W210A dans son site actif permet une inversion de l'énanthiosélectivité de l'enzyme. L'accès aux deux configurations est alors possible avec de bons excès énantiomériques pour la majorité des substrats testés (70-94 %).

En plus de son utilisation en synthèse directe, AspRedAm ainsi que les mutants associés ont également été employés dans la résolution cinétique d'amines chirales racémiques (Aleku *et al.*, 2018). Couplée à une NAD(P)H oxydase (NOX) pour la régénération du cofacteur NADP à partir de dioxygène, elle

permet l'enrichissement en (*R*) ou (*S*)-amine par transformation de l'énanthiomère réactif en cétone. Le composé (*R*)-**67** a ainsi pu être obtenu avec un *ee* de 83 % après conversion de 44 % du composé (*S*)-**67** en **68** (Schéma 38).

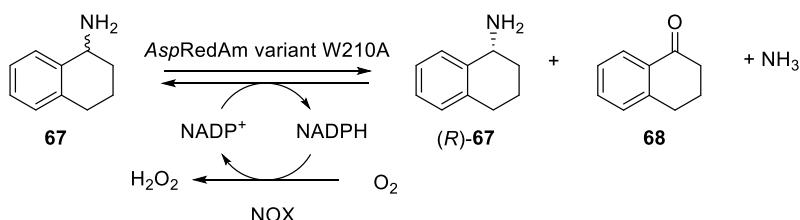


Schéma 38 : Déracémisation du 1,2,3,4-tétrahydronaphtalèn-1-amine (**67**) par couplage du variant W210A d'AspRedAm et d'une NADPH oxydase (NOX).

Comme dans les exemples précédents, des RCDs ont également été mise en place avec ces enzymes. La présence de $NH_3 \cdot BH_3$, réducteur chimique, permet de convertir de nouveau la cétone **68** en amine racémique **67**. Malgré de très bons rendements (> 97 %) pour la plupart des cas présentés et des énantiométrie comprises entre 93 et > 99 %, aucun exemple ne décrit l'obtention d'amines primaires avec ces RCDs.

Dernièrement, des RedAms bactériennes ont été découvertes par approche génomique basée sur la comparaison de séquence 1D avec celle d'AspRedAm (France *et al.*, 2018). Comme cette dernière, les enzymes trouvées sont très peu actives avec l'ammoniac et de faibles rendements ont été obtenus ($R = 20\%$ avec la cyclohexanone). Les RedAms ne semblent donc pas être des bonnes candidates pour la synthèse d'amines primaires.

2.6.3.4. Conclusion

Les IREDs sont de plus en plus considérées pour la synthèse d'amines chirales. Initialement utilisées pour la réduction d'imines cycliques à cause de l'instabilité celles acycliques en milieu aqueux, la découverte de leur activité à partir du composé carbonylé en présence d'un large excès d'amine a ouvert le champ des possibilités réactionnelles. La découverte des RedAms possédant le même repliement que les IREDs mais catalysant à la fois la formation de l'imine et sa réduction permet aujourd'hui la synthèse asymétrique d'amines secondaires variées. Une base de données répertoriant les différentes IREDs a été créée (<https://ired.biocatnet.de/>), offrant aux chimistes organiciens une boîte à outils pour de futures synthèses.

Néanmoins, peu d'exemples concluants sont retrouvés dans la littérature pour la synthèse énantiométrielle d'amines chirales primaires par l'intermédiaire de ces enzymes, qui restent cependant très intéressantes pour l'accès aux amines secondaires ou tertiaires.

2.7. AMINE DESHYDROGENASES

Dans la littérature, les amines déshydrogénases (AmDHs) désignent des oxydo-réductases capables de réaliser l'amination réductrice réversible d'une fonction carbonyle en amine correspondante avec comme source d'azote, l'ammoniac (Datta *et al.*, 2001). La majorité de ces enzymes utilisent un cofacteur flavine (FAD ou FMN), mais il existe également des AmDHs quinone ou NAD(P)H-dépendantes.

Pour des applications en biocatalyse, seules les AmDHs NAD(P)H-dépendantes sont intéressantes car, bien qu'ayant un certain coût, ces cofacteurs nicotinamides peuvent être utilisés en quantité catalytique grâce à des systèmes enzymatiques de recyclage bien établis (Zhao and van der Donk, 2003; Bornscheuer and Höhne, 2009). Dans la suite de ce manuscrit, le terme d'AmDH désignera seulement les enzymes NAD(P)H-dépendantes (Schéma 39).

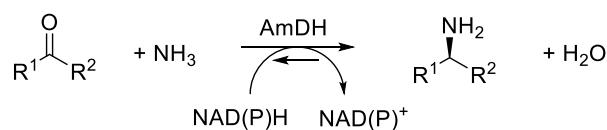


Schéma 39 : Réaction d'amination réductrice catalysée par les AmDHs

Les AmDHs catalysent la même réaction que les RedAms, à la différence près qu'elles sont plus actives dans la formation des amines primaires que des amines secondaires, pour lesquelles elles ne présentent que peu voire pas d'activité.

Les AmDHs ne semblent pas présenter d'inconvénients majeurs pour des applications biocatalytiques de synthèses d'amines primaires :

- Source d'amine NH_3 largement disponible et de très bas coût.
- Utilisation du NAD(P)H, cofacteur pour lesquels il existe des systèmes de recyclage bien établis.
- L'équilibre de la réaction est thermodynamiquement favorable à la formation de l'amine.
- L'amine primaire RNH_2 est obtenue directement sans étape supplémentaire de déprotection et peut être alkylée si nécessaire par voie chimique pour donner différentes amines secondaires.

2.7.1. Amine Déshydrogénases naturelles

La première AmDH naturelle issue de *Streptomyces virginiae* (*Sv-AmDH*), a été mise en évidence par Itoh *et al.* en 2000 (Itoh *et al.*, 2000). Malgré la non connaissance du gène codant pour cette protéine, sa purification par colonnes successives a permis de la caractériser en partie et de l'utiliser dans des processus biocatalytiques. Après détermination des conditions réactionnelles optimales, cette enzyme NADH-dépendante a montré une activité comparable sur un très large spectre de substrats, allant des céto-alcools aux cétones aliphatiques, en passant par les acides aminés et les cétones benzyliques (environ 0,8 U.mg⁻¹). Malheureusement, cette *Sv-AmDH* est instable en solution à 30 °C et perd 45 % de son activité en seulement 30 min. De plus, elle n'est pas stéréosélective, un facteur 2 seulement différencie les vitesses d'oxydation entre la (*R*)-1-phényléthan-1-amine ((*R*)-**1**) et la (*S*)-1-phényléthan-1-amine ((*S*)-**1**). Cette caractéristique a probablement freiné toute recherche supplémentaire autour de cette enzyme, comme l'identification du gène responsable de cette activité.

En 2013, une seconde AmDH naturelle issue de la bactérie marine *Pseudomonas kilonensis* (*Pk-AmDH*) a fait l'objet d'un brevet (Wang and Fang, 2013). Comme pour *Sv-AmDH*, le gène codant pour cette enzyme n'est pas identifié, mais contrairement à la précédente, *Pk-AmDH* permet l'obtention d'amines chirales avec de très bons *ee* et rendements. Des réactions avec des extraits cellulaires sont décrites sur des cétones variées telles que l'acétophénone ou l'hexan-3-one. La même équipe a breveté 3 ans plus tard l'AmDH d'une autre bactérie marine, *Pseudomonas balearica* (*Pb-AmDH*), active sur des substrats similaires (Wang *et al.*, 2016).

L'absence des gènes correspondants à ces AmDHs naturelles limite grandement leur utilisation en biocatalyse, les quantités d'enzymes étant limitées par l'impossibilité de surexpression dans une bactérie hôte comme *E.coli*. Etant donné les avantages qu'apportent ces biocatalyseurs pour la synthèse d'amines chirales et l'importance de disposer de voies d'accès alternatives pour ces composés cibles, il est apparu nécessaire de créer cette activité enzymatique.

2.7.2. Obtention d'AmDHs par ingénierie protéique des AADHs

Dans la nature, la très grande majorité des enzymes décrites réalisant la réaction d'amination réductrice sont les AADHs, catalysant la formation d'un acide aminé à partir du céto-acide correspondant (cf. I.2.6.2). Selon leur mécanisme, la partie acide carboxylique du substrat intervient uniquement dans la fixation de ce dernier dans le site actif de l'enzyme. La mutation des résidus en interaction avec cette fonction a donc été envisagée afin d'obtenir des AmDHs ayant moins de restriction structurale envers le substrat. Toutes les AmDHs utilisées en biocatalyse aujourd'hui ont été créées ainsi.

2.7.2.1. Mutation des leucine déshydrogénases (LeuDHS)

L'équipe de Bommarius a été la première à créer des mutants des AADHs afin de les utiliser pour la synthèse d'amines chirales aliphatiques optiquement pures (Schéma 40A) (Abrahamson *et al.*, 2012).

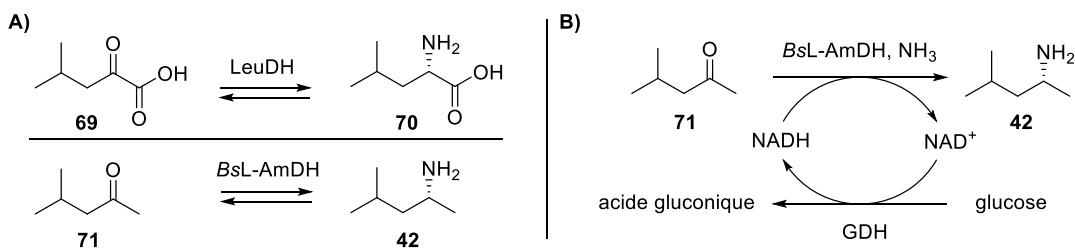
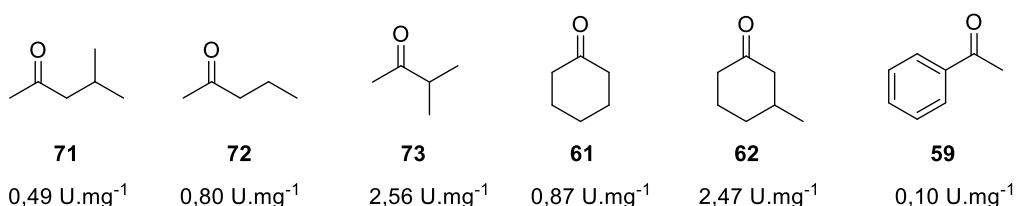


Schéma 40 : A) Réactions d'amination réductrice catalysées par la LeuDH ou la BsL-AmDH. B) Réaction d'amination réductrice biocatalysée de la 4-méthylpentan-2-one (71) par BsL-AmDH couplée au système de recyclage GDH. Adapté de Abrahamson *et al.*, 2012.

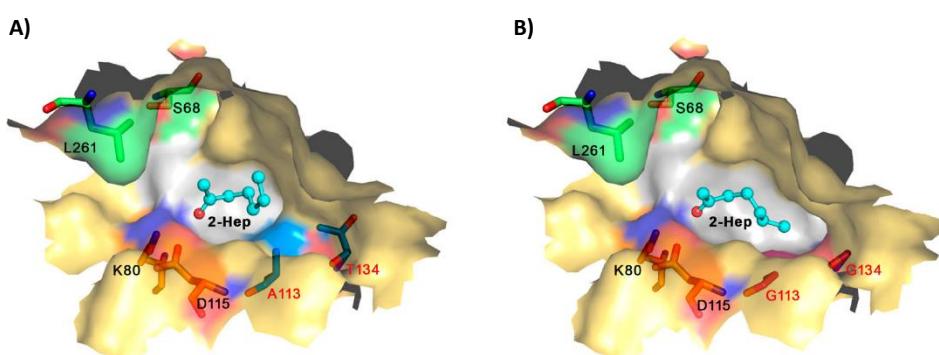
A partir de la leucine déshydrogénase de *Bacillus stereothermophilus* (*Bs*-LeuDH), et en se basant sur le mécanisme de la PheDH décrit précédemment (cf. I.2.6.2), la K68 a été identifiée comme le résidu principal en interaction avec la partie carboxylique du substrat. Après mutagénèse saturante, le mutant K68M a montré une faible activité sur la 4-méthylbutan-2-one (71), équivalent sans acide carboxylique du substrat naturel (69). Plusieurs librairies de mutants, générées à partir de mutations (seuls ou en combinaison) des autres résidus de la poche ont alors été produites, en suivant la même méthode. K80 et D115 étant catalytiques, ils ont quant à eux été conservés. Ainsi, après production et criblage de 11854 mutants, K68S/E114V/N261L/V291C (*Bs*L-AmDH) s'est révélé être le variant le plus actif sur 71, avec une activité spécifique de 0,69 U.mg⁻¹. La stéréosélectivité de l'enzyme naturelle est maintenue et la réaction biocatalysée sur le substrat 71 conduit à la formation du (*R*)-4-méthylpentan-2-amine ((*R*)-42) avec une conversion de 92,5 % et un *ee* de 99,8 % (Schéma 40B). La leucine n'est quant à elle plus substrat de la *Bs*L-AmDH, et des activités sur l'acétophénone et la cyclohexanone sont observées (respectivement 58,8 mU.mg⁻¹ et 123,4 mU.mg⁻¹).

En 2015, Chen *et al.* ont créé une nouvelle AmDH en partant de la LeuDH d'*Exiguobacterium sibiricum* (*Es*LeuDH) (Chen *et al.*, 2015). En s'appuyant sur les travaux de l'équipe de Bommarius, l'introduction de seulement deux mutations (K77S et N270L) dans la séquence de la *Es*LeuDH leur a permis d'obtenir un variant (*Es*L-AmDH) actif sur des cétones aliphatiques (71-73) et cycliques (61) mais aussi sur l'acétophénone (59), avec des activités spécifiques supérieures à celles de la *Bs*L-AmDH, et de très bons *ee* (99 %) toujours en faveur de l'enantiomère (*R*) (Figure 10).

Figure 10 : Activités spécifiques de la *EsL-AmDH* sur différents substrats.

Cette *EsL-AmDH* a été étudiée plus en détail par Löwe *et al.* sur un panel de substrats aromatiques (substitution du cycle aromatique par des groupements donneurs ou attracteurs) et sur des cétones possédant des substituants plus volumineux de type butyle ou α/β céto-acide/ester (en remplacement du méthyle porté par la cétone réactive) (Löwe *et al.*, 2018). Dans chaque cas, une activité relative de 10-30 % par rapport à l'acétophénone (**59**) est observée. Cette baisse étant possiblement la conséquence d'une faible solubilité des substrats testés, une étude sur la présence de cosolvants miscibles à l'eau a été menée avec **59** comme modèle. Il a été observé que le diméthylsulfoxyde (DMSO) présent à hauteur de 20 % v/v dans la réaction permettait un gain d'activité de 60 %. Un test d'immobilisation de *EsL-AmDH* sur un support hydrophobe (kit Sigma Aldrich) a également été réalisé et a montré que l'enzyme conserve aussi bien son activité que son énantiomérisélectivité.

A partir de leur enzyme *EsL-AmDH* et de deux nouvelles créées sur le même principe (*LfL-AmDH* issue de *Lysinibacillus fusiformis*, et *BspL-AmDH* issue *Bacillus sphaericus*), Chen *et al.* ont poursuivi leur travaux d'ingénierie en élargissant la poche catalytique grâce à deux mutations supplémentaires, A113G et T134G (pour *LfL-AmDH*) (Figure 11) (Chen *et al.*, 2018). Ces nouveaux variants sont alors capables d'accepter des substrats à longue chaîne carbonée, avec des activités spécifiques nettement augmentées sans altérer la stéréosélectivité. Ainsi, le mutant obtenu à partir de la *LfL-AmDH* non active sur la 2-heptanone, possède, lui, une activité spécifique de 2,6 U.mg⁻¹ sur ce substrat. De plus, ces mutations, effectuées sur plusieurs L-AmDH, aboutissent au même résultat ce qui suggère que cette méthode peut vraisemblablement être généralisée.

Figure 11 : A) Poche catalytique de la *LfL-AmDH*. B) Poche catalytique du mutant A113G/T134G de la *LfL-AmDH*. 2-Hept = 2-heptanone.
© Chen *et al.*, 2018.

2.7.2.2. Mutation des PheDHs

A la suite de leurs travaux sur la LeuDH, le groupe de Bommarius a réalisé les premiers variants de la PheDH de *Bacillus badius* (Abrahamson *et al.*, 2013). Par la même approche que pour la LeuDH, un criblage de 969 clones a révélé le mutant K77S/N276L (*BbF-AmDH*) comme le plus actif envers le *p*-fluorophénylacétone (**74**). Son spectre de substrat comprend diverses cétones, incluant la phénoxy-2-propanone, la 2-hexanone (**60**) et la 3-méthyl-2-butanone (**73**).

Une synthèse biocatalysée par *BbF-AmDH* sur 20 mM de **74** en présence d'un système de recyclage du cofacteur a permis d'obtenir un rendement de 73,9 % en produit (*R*)-**75** avec une pureté énantiomérique supérieure à 99,8 % (Schéma 41A).

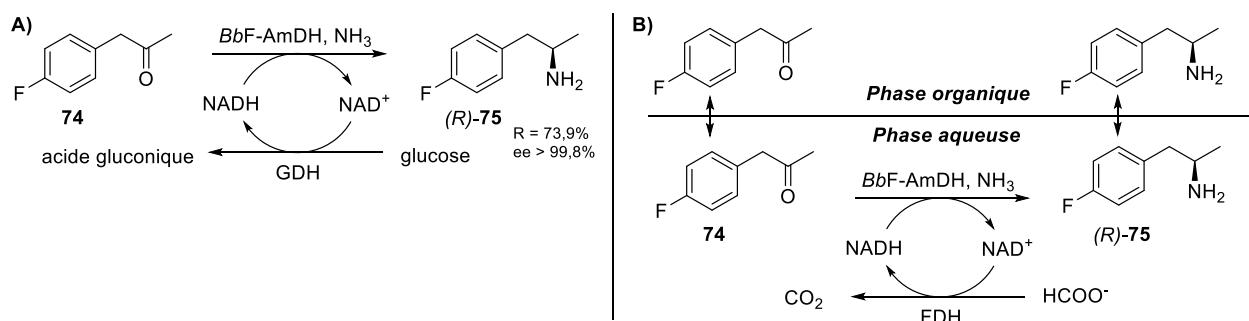


Schéma 41 : A. Synthèse biocatalysée par *BbF-AmDH* du (*R*)-1-(4-phényl)-propyl-2-amine ((*R*)-**75**). B. Réaction d'ammination réductrice catalysée par *BbF-AmDH* en milieu biphasique.

Un système en milieu biphasique eau/heptane a également été développé avec cette nouvelle AmDH, et des conversions similaires ont été obtenues entre les deux procédés pour des concentrations initiales en **74** identiques (Schéma 41B) (Au *et al.*, 2014). Par ailleurs, des molécules insolubles dans l'eau telles que la 1-adamantyle méthyle cétone (**76**) ou la 3-méthyl-1-phényl-2-butanone (**77**) respectivement précurseurs d'analogues des principes actifs pharmaceutiques sitagliptine et saxagliptine peuvent également être transformées par *BbF-AmDH* (Figure 12).

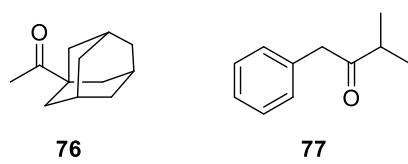


Figure 12 : Structure de la 1-adamantyle méthyle cétone (**76**) et de la 3-méthyl-1-phényl-2-butanone (**77**).

L'enzyme ayant montré une instabilité à sa température optimale de 50 °C, des travaux d'encapsulation de la *BbF-AmDH* ont été réalisés par Ren *et al.* (Ren *et al.*, 2017). Dans le but d'empêcher la destructuration de la structure quaternaire de l'enzyme, cette dernière a tout d'abord été

recouverte de polyéthylènimine (PEI), puis fixée dans des microcapsules de titane (AmDH-PEI-Ti). Ce complexe conserve 80 % de son activité après 40 min à 50 °C, alors que *BbF-AmDH* libre la perd totalement dans les mêmes conditions.

D'autres travaux d'ingénierie réalisés à partir de la PheDH de *Rhodococcus sp.* ont été effectués par Ye *et al.* (Ye *et al.*, 2015). Des étapes successives de mutations leur ont permis d'identifier, après un criblage de 7990 clones, le triple mutant K66C/S149G/N262C (*RsF-AmDH*), capable de réaliser l'amination réductrice de l'acétophénone (**59**) (5,0 mU.mg⁻¹) et de la 4-phényl-2-butanone (**54**) (8,8 mU.mg⁻¹). La mutation supplémentaire S149G de ce mutant par rapport à *BbF-AmDH* permet l'élargissement de l'entrée du site actif. De même que les autres AmDHs obtenues par mutation, de très bons *ee* envers l'énanthiomère (*R*) (> 98 %) et de fortes conversions (98 %) sont observés lors de synthèses couplées au système de recyclage GDH du cofacteur.

Le système de régénération du cofacteur peut aussi être co-immobilisé avec l'enzyme d'intérêt afin de faciliter la mise en œuvre des réactions et le recyclage des biocatalyseurs. *RsF-AmDH* a ainsi été co-immobilisée avec GDH sur des nanoparticules magnétiques de nickel-acide nitrilotriacétique par interaction entre le nickel et l'HisTag des protéines : 81 % de la productivité du système est maintenue après 3 cycles de recyclage des enzymes (Liu *et al.*, 2017).

Knaus *et al.* ont exploré plus largement le spectre de substrats de cette *RsF-AmDH* et ont montré qu'elle accepte des dérivés du *O*-méthoxy-phénylacétone, des cétones aliphatiques comme la 2-octanone (99 % de conversion) ou encore de cétones possédant deux substituants volumineux telles que la 1-phénylpentan-3-one (83 % de conversion) (Knaus, Böhmer, *et al.*, 2017). Une synthèse sur 208 mg de **78a** a permis l'obtention du produit aminé correspondant (*R*)-**78b** avec un rendement de 82 % et une énantiométrie supérieure à 99 % en 24 h, à 30 °C (Schéma 42). D'autre part, il a été démontré que *RsF-AmDH* était également compatible avec le système de recyclage FDH du cofacteur, plus avantageux en termes d'économie d'atomes.

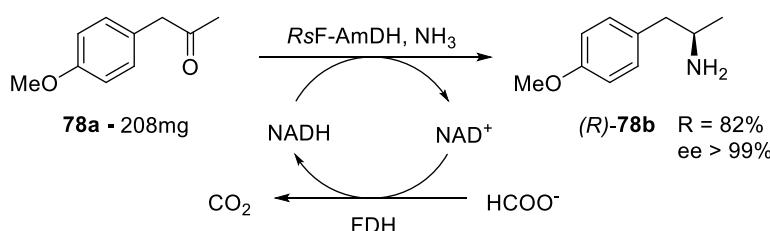


Schéma 42 : Synthèse biocatalysée par *RsF-AmDH* du (*R*)-1-(4-méthoxyphényl)propan-2-amine ((*R*)-78b).

Enfin, une troisième PheDH, issue cette fois de *Caldalkalibacillus thermarum* a été mutée sur les positions identifiées comme effectives par Bommarius (Pushpanath *et al.*, 2017). Pushpanath *et al.* ont d'abord exploré la biodiversité existante afin de sélectionner une PheDH d'un organisme thermophile, et donc plus susceptible d'être thermiquement stable. Le mutant K68S/N266L (*CtF-AmDH*) résultant présente en effet, une T_m ⁴ de 83,5 °C, soit une amélioration de 27 °C par rapport à *BbF-AmDH*. Les spectres de substrats de ces deux enzymes sont similaires (Schéma 43), avec tout de même des activités spécifiques légèrement supérieures pour *CtF-AmDH*, notamment pour la *p*-méthylacétophénone (0,28 U.mg⁻¹ contre 1,60 U.mg⁻¹). Comme la majorité des AmDHs obtenues à partir d'AADHs, ce mutant est sensible à de fortes concentrations en sel, substrat (environ 80 mM) et/ou produit. L'utilisation en milieu biphasique (eau/iso-amyl acétate) de cellules entières d'*E.coli* possédant *CtF-AmDH* et GDH surexprimées, a permis de limiter ces inhibitions et de convertir à 96 % 400 mM de 1-phénoxypropan-2-one en (*R*)-**81**, avec un « space time yield⁵ » (STY) de 60 g.L⁻¹.d⁻¹.

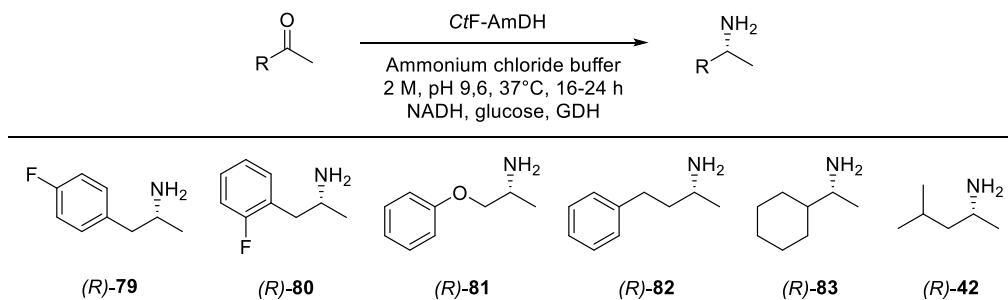


Schéma 43 : Spectre de substrats de la réaction d'amination réductrice catalysée par *CtF-AmDH*. Adapté de Pushpanath *et al.*, 2017.

2.7.2.3. Protéine chimère

A partir de la *BbF-AmDH* et de la *BcL-AmDH*, Bommarius *et al.* ont créé un protéine chimère combinant le domaine N-ter de la *BbF-AmDH* (résidus 1-149) avec le domaine C-Ter de la *BcL-AmDH* (résidus 140-366) (Bommarius *et al.*, 2014). Cette nouvelle AmDH (chFL-AmDH) est donc constituée du domaine NAD de *BcL-AmDH* et de la poche catalytique de *BbF-AmDH*.

Cette fusion permet l'acceptation de nouveaux substrats tels que l'acétophénone (**59**), sans perte de l'énaniosélectivité de l'enzyme. Ce résultat prouve que le domaine NAD peut jouer un rôle dans la spécificité de substrats. De plus, il apparaît que la température optimale de chFL-AmDH est plus élevée de 20°C par rapport à celle de *BbF-AmDH* et de *BcL-AmDH*, initialement de 50°C, ce qui montre que la recombinaison de protéines peut jouer un rôle dans la stabilité thermique de la protéine.

⁴ T_m = « melting temperature » : définie comme la température à laquelle la protéine est à 50% dénaturée.

⁵ Le « space time yield » représente la quantité de produit formé par litre de milieu réactionnel et par jour.

2.7.3. Cascades enzymatiques

Les AmDHs fonctionnant dans des conditions réactionnelles simples et avec des cofacteurs nicotinamides impliqués dans de nombreuses réactions d'oxydo-réductions, elles ont récemment été intégrées dans des cascades couplant plusieurs enzymes (Sebastian C. Cosgrove *et al.*, 2018).

2.7.3.1. Couplage ADH/AmDH : réaction rédox neutre

Les premières cascades enzymatiques étudiées avec les AmDHs ont été leur couplage avec des ADHs. Ces enzymes NAD(P)H-dépendantes catalysent la réduction d'une fonction cétone en alcool, généralement de façon stéréosélective. Bien que largement utilisées pour cette propriété en biocatalyse (Sellés Vidal *et al.*, 2018), leur capacité d'oxydation est plutôt exploitée lors de leur association avec des AmDHs. En effet, la grande diversité structurale des alcools disponibles donne alors accès à des amines chirales variées en seulement une étape (Schéma 44). De plus, les ADHs et les AmDHs fonctionnant toutes deux avec les cofacteurs nicotinamides, un recyclage interne du cofacteur est possible : l'ADH réalise l'oxydation de l'alcool en cétone *via* le cofacteur oxydé NAD(P)⁺, qui est alors réduit en NAD(P)H au cours de cette réaction. Inversement, l'AmDH réduisant la cétone en amine, le cofacteur réduit est oxydé lors de cette seconde étape ce qui permet donc sa régénération.

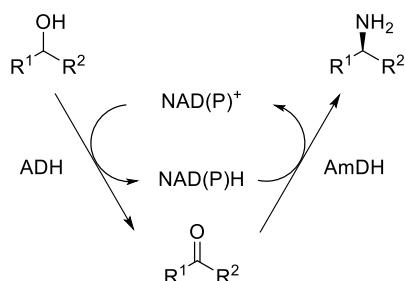


Schéma 44 : Cascade enzymatique couplant ADH et AmDH avec recyclage interne du cofacteur : réaction rédox neutre. Adapté de Mutti *et al.*, 2015.

Cette cascade enzymatique a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche. Mutti *et al.* l'ont par exemple utilisée en couplant la chFL-AmDH ou la BbF-AmDH avec deux ADHs NADH-dépendantes de stéréosélectivités complémentaires (Mutti *et al.*, 2015). Ainsi, quelque soit la configuration absolue de l'alcool de départ, il est possible d'obtenir la (*R*)-amine correspondante, grâce à l'énanthiosélectivité des AmDHs. Ce système a prouvé sa viabilité sur la transformation du mélange racémique de **84** en **(R)-85** donnant après 24 h de réaction un rendement de 85 % et un *ee* > 99 % (Schéma 45).

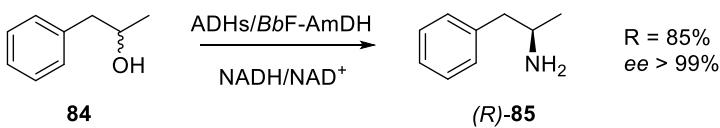


Schéma 45 : Synthèse du (R)-1-phénylpropan-2-amine ((R)-85) à partir du 1-phénylpropan-2-ol (84) par cascade enzymatique couplant deux ADHs et la BbF-AmDH.

Afin d'éviter l'utilisation de deux ADHs pour consommer l'ensemble le substrat racémique, Thomson et Turner ont travaillé sur l'évolution d'une ADH NADPH-dépendante non stéréosélective de *Thermoanaerobacter ethanolicus* (*TeS*-ADH), afin de la rendre NADH-dépendante, cofacteur de *BbF*-AmDH (Thompson and Turner, 2017). Le mutant *TeS*-ADH W110A/G198D alors généré a été utilisé dans la cascade précédente sur 100 mg de 1-(4-méthoxyphényl)propan-2-ol (**84**). Un rendement de 84 % (conversion 90 %) en amine correspondante (**(R)-85**) a été obtenu en 48 h.

Dans le même temps, Chen *et al.* ont développé une cascade similaire à partir de leur *EsL*-AmDH et d'une ADH NADH-dépendante naturelle peu stéréosélective issue de *Streptomyces coelicolor* (F.-F. Chen *et al.*, 2015). Après optimisation du système, la réaction a été testée avec divers alcools aliphatiques et cycliques. De forts *ee* ont été obtenus dans chaque cas (> 99 %), mais les rendements sont eux très dépendants des alcools mis en réaction (21 à 97 %).

Böhmer *et al.* ont proposé une co-immobilisation ADH-AmDH sur des billes de verre par affinité ionique avec le Fe(III) (Böhmer *et al.*, 2018). Ce travail a été réalisé avec l'ADH d'*Aromatoleum aromaticum* et chLF-AmDH de Bommarius. Des conversions du même ordre de grandeur ont été obtenues avec les enzymes libres ou immobilisées, et aucun impact lié à cette immobilisation n'est à déplorer sur l'énanteriosélectivité de l'AmDH, toujours supérieure à 99 % en faveur des (R)-amines. Malgré un gain notable en termes de turn over de 2 à 15 fois supérieur aux enzymes libres, le système reste à améliorer quant à sa recyclabilité, un des intérêts majeurs de l'immobilisation. En effet, seulement deux cycles de réaction de 24 h ont été possibles, au-delà, la conversion chute à 50%.

2.7.3.2. Couplage ADH/AmDH : recyclage orthogonal

Knaus *et al.* ont envisagé une cascade ADH/AmDH alternative à celle précédemment présentée où une ADH NADPH-dépendante a été couplée à une AmDH NADH-dépendante ; l'auto-recyclage du cofacteur n'est alors plus possible (Knaus, Cariati, *et al.*, 2017). Un système orthogonal a donc été proposé, faisant intervenir deux enzymes supplémentaires (Schéma 46) :

- Une NADP oxidase (NOX) (YcnD), pour le recyclage du NADP : cette enzyme réduit l'oxygène pour former du peroxyde d'hydrogène. Ce dernier souvent néfaste pour les enzymes doit être

éliminé, c'est pourquoi une catalase a également été introduite dans le milieu afin de le dissimuler en eau et dioxygène (Hernandez *et al.*, 2012).

- La FDH, pour le recyclage du NADH

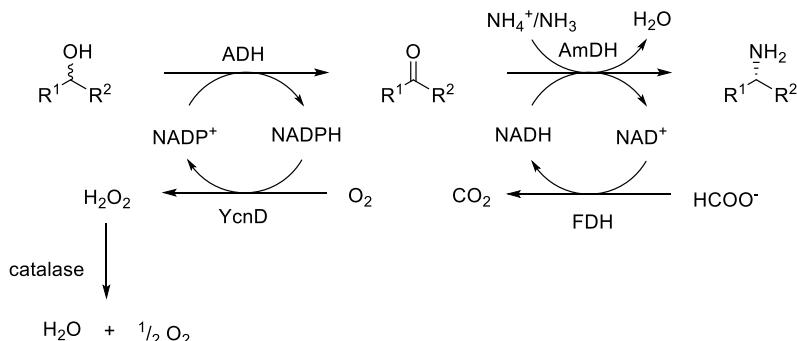


Schéma 46 : Conversion d'alcool en amine énantiopure par couplage entre une ADH et une AmDH par système orthogonal d'oxydoréduction. Adapté de Knaus *et al.*, 2017.

Un tel système permet donc de coupler les ADH NADPH-dépendantes avec les AmDHs, ce qui élargit son applicabilité. Son handicap majeur par rapport à la cascade précédente est l'utilisation de trois enzymes en plus de l'AmDH et de l'ADH, mais ceci est contrebalancé par une constante d'équilibre globale 10^{41} fois supérieure à la méthode cyclique. Les cosubstrats de ces enzymes de recyclage ont l'avantage d'être inorganiques, abondants et de très faible coût. Des ee dépassant les 99 % ont été obtenus avec tous les substrats testés (alcool aromatiques et aliphatiques) et les temps de réaction sont plus courts que dans les cascades précédentes (6 h contre 24-48 h).

2.7.3.3. Couplage P450/ADH/AmDH

Dernièrement, Yu *et al.* ont imaginé une cascade enzymatique permettant d'obtenir une amine primaire à partir d'alcane, l'intérêt étant de valoriser aussi les ressources fossiles (Schéma 47) (Yu *et al.*, 2018).

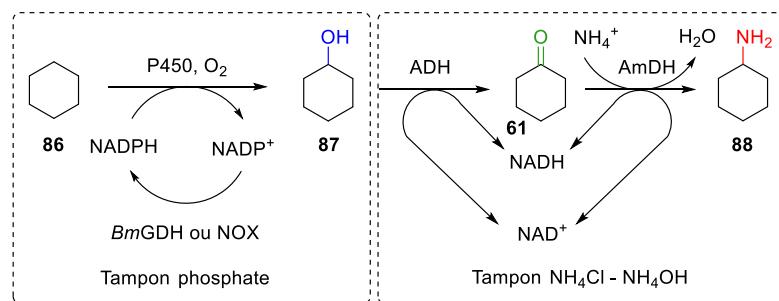


Schéma 47 : Stratégie « one pot, two steps » pour la synthèse d'amines optiquement pures à partir de composés alcane. Adapté de Yu *et al.*, 2018.

Dans un premier temps, une P450 fonctionnalise le cyclohexane (**86**) en cyclohexanol (**87**). Les P450 étant NADPH dépendantes, un système de recyclage GDH ou NOX est intégré au milieu réactionnel. Dans un second temps, le cyclohexanol (**87**) est oxydé grâce à une ADH en cyclohexanone (**61**) qui est ensuite réduit en cyclohexylamine (**88**) par une AmDH. Dans cette étape, le cofacteur nicotinamide NAD(H) est « auto-recyclé » comme décrit précédemment (cf. 2.7.3.1).

La principale difficulté rencontrée dans la mise en place de cette cascade a été l'incompatibilité des conditions réactionnelles entre la P450 et l'*EsL-AmDH*, principalement due à l'inhibition de la P450 par excès d'ammoniac. Une stratégie « one-pot, two steps » a alors été développée, consistant tout d'abord à transformer le cyclohexane (**86**) en cyclohexanol (**87**) *via* la P450, puis à ajouter le cocktail enzymatique ADH/AmDH/GDH conduisant à la formation de l'amine **88**. Après 6 heures de réaction (pH 8,5, 16 °C pour limiter l'évaporation du cyclohexane (**86**)), un traitement thermique est appliqué au milieu réactionnel (30 min à 70 °C), puis le pH est augmenté à 9,5 par ajout du tampon NH₄Cl/NH₄OH. L'ADH, l'AmDH et le NAD⁺ sont ensuite introduits et la réaction est agitée 18 h supplémentaires à 25 °C. Après un temps total de 24 h, 92,5 % du cyclohexanol (**87**) est transformé en cyclohexylamine (**88**).

Cette cascade a également été réalisée avec des cellules entières de *E.coli*, dans lesquelles les deux couples d'enzymes P450/NOX et ADH/AmDH sont surexprimés *via* des plasmides différents (Yu *et al.*, 2018). Dans ce cas, le système NOX est préféré à la GDH puisque spécifique du NADPH. De même que précédemment, le cyclohexane (**86**), le xylitol (substrat de la NOX) et le NADP sont ajoutés au milieu contenant les cellules resuspendues en milieu phosphate. Après 6 h d'incubation, le NAD⁺ est introduit, et le pH est ajusté par de l'hydroxyde d'ammonium, source d'ammoniac pour la réaction d'amination réductrice. Au bout de 48 h de réaction, 12,5 mM de cyclohexylamine (**88**) s'est formée dans le milieu, soit une conversion de 12,5 %. Cette biotransformation a aussi été appliquée à la synthèse de la (*R*)-1-phénylethan-1-amine ((*R*)-**1**) et a permis la formation du produit (*R*)-**1**, avec un *ee* > 99 %. Bien que les conversions obtenues pour cette cascade soient faibles et qu'elles demandent encore à être améliorées, cette étude est une preuve de concept de la formation d'amines chirales à partir d'alcane en seulement une étape de synthèse.

2.7.4. Résolution cinétique

Les AmDHs créées par ingénierie concercent la stéréosélectivité des AADHS, mais l'absence de la fonction carboxylique dans le substrat entraîne un changement de priorité des substituants (convention Cahn-Ingold-Prelog (CIP)), et les amines formées sont donc de stéréochimies (*R*). La synthèse asymétrique de l'énanthiomère (*S*) reste donc encore un challenge, mais ce dernier peut tout de même être obtenu par un procédé de résolution cinétique (Jeon *et al.*, 2017). Dans ce cas-là, les enzymes sont utilisées pour catalyser la réaction de déamination oxydative transformant alors uniquement la (*R*)-amine en cétone, enrichissant ainsi le milieu en composé (*S*) (Schéma 48). Afin de régénérer le cofacteur, ce système est couplé à une NOX.

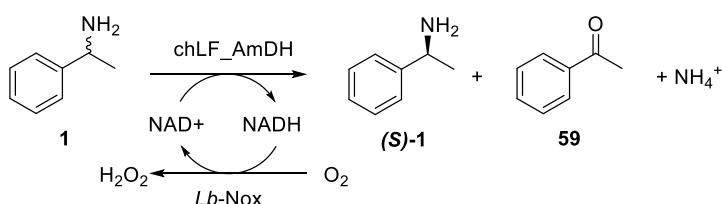


Schéma 48 : Réaction de déracémisation de la 1-phényléthan-1-amine (1) par déamination oxydative catalysée par chLF-AmDH.

D'abord testée sur enzymes purifiées, la déracémisation de 10 mM de 1-phényléthan-1-amine (**1**) conduit seulement à un excès énanthiomérique de 20 % en 24 h. Des études d'inhibition des produits/substrats sur l'AmDH et la NOX ont finalement mis en avant qu'une concentration de seulement 2 mM d'acétophénone (**59**) entraîne une perte d'activité de 40 % de l'AmDH. De même, la NOX ne conserve que 40 % de son activité en présence de 5 mM d'amine **1**. Afin de contourner ce problème, les deux enzymes ont été co-exprimées dans *E.coli*, puis la même réaction a été réalisée en cellules entières. Au bout de 5 h, l'énanthiomère (*R*) est obtenu avec un *ee* supérieur à 99 %. Cette nette amélioration peut s'expliquer par l'isolement des enzymes à l'intérieur de la cellule qui augmenterait la stabilité de l'enzyme. La diffusion des produits/substrats à travers la membrane cellulaire réduirait également l'inhibition des enzymes par ces derniers.

D'autres mélanges racémiques d'amines tels que 1-(3,5-difluorophényl)éthan-1-amine, 1-(m-tolyl)éthan-1-amine ou encore la 2-heptanamine ont été résolue par cette méthode : dans chaque cas, un excès énanthiomérique supérieur à 99 % est obtenu.

Malgré les avantages que présente ce système, il souffre comme toutes les résolutions cinétiques, d'un rendement maximal de 50 %.

2.7.5. Conclusion

Depuis les travaux d'ingénierie développés par le groupe de Bommarius sur la *Bs*-LeuDH et la *Bb*-PheDH, plusieurs enzymes homologues à celles-ci ont été mutées selon le même principe. Un petit panel de nouvelles AmDHs moins restrictives en termes de substrats est donc disponible pour la formation stéréosélective d'amines primaires chirales en biocatalyse (Tableau 2). De plus, des procédés employant ces enzymes en milieu biphasique ou les immobilisant/encapsulant pour augmenter leur stabilité ont déjà été proposés. Leur potentiel biocatalytique a été montré par différentes synthèses réalisées jusqu'à l'échelle du gramme (1,2 g de substrat) et par le développement de cascades multi-enzymatiques.

Tableau 2 : AmDHs obtenues par ingénierie protéiques et AmDHs naturelles.

AmDHs	Mutations	AADH mutée	Organisme	Référence
<i>Bs</i> L-AmDH	K68S/E114V/N261L/V291C	LeuDH	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	(Abrahamson <i>et al.</i> , 2012)
<i>Es</i> L-AmDH	K77S/N270L	LeuDH	<i>Exiguobacterium sibiricum</i>	(F.-F. Chen <i>et al.</i> , 2015)
<i>Lf</i> L-AmDH	Non décrite	LeuDH	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2018)
<i>Bsp</i> L-AmDH	Non décrite	LeuDH	<i>Bacillus sphaericus</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2018)
<i>Bb</i> F-AmDH	K77M/N276L	PheDH	<i>Bacillus badius</i>	(Abrahamson <i>et al.</i> , 2013)
<i>Rs</i> F-AmDH	K66C/S149G/N262C	PheDH	<i>Rhodococcus sp</i>	(Ye <i>et al.</i> , 2015)
<i>Ct</i> F-AmDH	K68S/N266L	PheDH	<i>Caldalkalibacillus thermarum</i>	(Pushpanath <i>et al.</i> , 2017)
<i>ch</i> FL-AmDH		Chimère	/	(Bommarius <i>et al.</i> , 2014)
AmDHs naturelles				
<i>Sv</i> -AmDH			<i>Streptomyces virginiae</i>	(Itoh <i>et al.</i> , 2000)
<i>Pk</i> -AmDH			<i>Pseudomonas kilonensis</i>	(Wang and Fang, 2013)
<i>Pb</i> -AmDH			<i>Pseudomonas balearica</i>	(Wang <i>et al.</i> , 2016)

Malgré l'intérêt indéniable des AmDHs en biocatalyse, leur obtention exclusivement à partir de mutations d'AADHs restreint la diversité de ces enzymes. Par ailleurs, seulement trois AmDHs naturelles ont été décrites, mais l'absence de gène associé empêche leur utilisation en biocatalyse.

3. CONCLUSION ET OBJECTIFS DU PROJET

De nombreuses méthodes existent donc aujourd'hui pour l'obtention d'amines chirales optiquement pures. Si chimiquement, la cristallisation de sels diastéréoisomériques reste la méthode la plus utilisée en industrie, la recherche dans ce domaine continue sans cesse de progresser pour proposer des synthèses stéréosélectives. Malgré la diversité de ces réactions, réduction d'imine, amination réductrice, hydroamination, ou encore l'insertion dans une liaison C-H, elles font majoritairement appel à des ligands chiraux onéreux et des métaux de transition difficiles à éliminer totalement du produit final. Des procédés alternatifs tels que l'organocatalyse biomimétique se sont développés mais se limitent pour l'instant majoritairement aux aryles amines. De plus, très peu d'exemples dans la littérature montrent des synthèses chimiques asymétriques directes d'amines chirales primaires. En effet, des étapes de

protection/déprotection mais aussi d'activation de la fonction imine sont très souvent indispensables à la réactivité mais aussi à la chimiosélectivité de la réaction.

Des nouvelles méthodes biocatalytiques pour la synthèse de ces amines primaires chirales optiquement pures ont alors été développées. En plus d'opérer dans des conditions plus douces, les enzymes permettent la catalyse de la réaction et l'apport de l'environnement chiral nécessaire à la stéréosélectivité. Les lipases et les ω -TAs sont employées en industrie respectivement dans des processus de résolution cinétique et de synthèse asymétrique, mais ces deux enzymes présentent chacune quelques inconvénients ; les premières nécessitent une étape supplémentaire de clivage du groupement *N*-acétylé introduit pour obtenir l'amine primaire correspondante ; les deuxièmes ont elles besoin d'un substrat donneur, généralement perdu en fin de réaction. D'autres enzymes telles que les MAO, AM, AL ou encore IRED font depuis peu l'objet d'attentions particulières et sont des alternatives intéressantes. Cependant, certaines difficultés doivent encore être contournées notamment l'utilisation de cofacteurs coûteux en synthèse (B12, PLP, SAM), le spectre de substrats restreint, l'instabilité du substrat en milieu aqueux, *etc.*

Dernièrement, des enzymes NADPH-dépendantes capables de réaliser la réaction d'amination réductrice à partir de cétone et d'ammoniac ont été découvertes : les RedAms (malgré une préférence pour les amines RNH_2), et les AmDHs. La plupart des AmDHs existantes aujourd'hui ont toutefois été obtenues par ingénierie protéique, par mutations dirigées des AADHs, et les seules activités naturelles détectées sont orphelines de gènes. La recherche d'homologues dans la biodiversité par approche génomique n'est donc pas possible, et la diversité de ces enzymes est donc très restreinte.

Partant de ce constat, mon projet de recherche sur les AmDHs s'est alors axé sur deux objectifs principaux :

- Le premier réside dans la découverte de nouveaux biocatalyseurs possédant une activité naturelle AmDH et de leur gène associé. Pour cela, une stratégie par approche génomique a été choisie, permettant ainsi de bénéficier des différentes expertises présentes au sein de l'unité Génomique Métabolique (GM).
- Le deuxième concerne la caractérisation des enzymes découvertes et l'évaluation de leur potentiel biocatalytique. Une fois les enzymes caractérisées et leurs conditions opératoires optimisées, les enzymes sont utilisées comme catalyseurs dans des synthèses de divers amines chirales.

Chapitre II : Découverte,
caractérisation et utilisation de
l’Amine Déshydrogénase de
Petrotoga mobilis

1. RECHERCHE DANS LA BIODIVERSITE

La recherche d’enzymes au sein de la biodiversité s’effectue en collaboration étroite avec la plateforme de clonage et de criblage des activités enzymatiques mise en place par L’équipe de Criblage des Activités de Bioconversion (LCAB) du LBMS de l’unité GM, déjà utilisées à de nombreuses reprises dans d’autres projets de biocatalyse (Vergne Vaxelaire *et al.*, 2013; Reignier *et al.*, 2014; Guérard Hélaine *et al.*, 2015). Cette plateforme a été sollicitée plusieurs fois au cours du projet, et j’ai pu suivre et participer aux différentes étapes menant à la découverte des nouvelles AmDHs.

1.1. APPROCHE GENOMIQUE

Le processus de recherche d’enzymes dans la biodiversité peut être décomposé en deux grandes parties (Figure 13) :

1. Sélection des enzymes candidates à l’activité désirée et de leur gène associé. Cette recherche s’appuie sur des analyses génomiques par des outils bio-informatiques.
2. Production et criblage des enzymes candidates sur un ensemble de substrats.

1.1.1. Sélection des enzymes candidates

A l’aide des bases de données métaboliques (Kegg, Metacyc, Brenda) et des recherches bibliographiques (publications, brevets), les enzymes connues et expérimentalement décrites pour réaliser la réaction cible sont répertoriées (Figure 13, étape 1). Elles vont constituer le set de référence d’une recherche *in silico* d’enzymes homologues, c’est-à-dire qu’elles vont servir d’« hameçons » pour explorer la biodiversité bactérienne et récupérer des protéines plus ou moins similaires. Cette recherche s’effectue principalement par BLAST du set de référence avec l’ensemble des entrées d’Uniprot et des séquences de métagénomes présentes au Genoscope (*Cloaca maxima*⁶ principalement) (Figure 13, étape 2). Le seuil d’identité de séquence, pour qu’une protéine soit retenue, est fixé à 30 % sur 80 % de la longueur ; nous considérons qu’en dessous de ce seuil, les enzymes catalysent rarement la même réaction chimique.

Le programme informatique regroupe ensuite en « cluster » toutes les enzymes récupérées précédemment et partageant au moins 80 % d’identité de séquence (Figure 13, étape 3). Lorsqu’une enzyme se retrouve seule dans un groupe, on parle de singleton. Ce seuil est adaptable en fonction du

⁶ *Cloaca maxima* est un métagénome issu d’un bassin anaérobie de la station d’épuration d’Evry.

projet et se base sur l’hypothèse que les enzymes de plus de 80 % d’identité de séquence sont isofonctionnelles. Un seuil plus strict autour de 90 % voire de 95 % peut néanmoins être choisi dans le cas d’activités peu répandues (faible nombre d’enzymes récupérées lors de la première étape) ou de projet visant des variabilités faibles comme des stéréospécificités différentes sur un même substrat.

Enfin, une ou plusieurs enzymes de chaque cluster/singleton sont choisies comme représentantes pour être ciblées. Ce choix s’effectue en fonction de la disponibilité de l’ADN de la souche microbienne correspondante dans la collection de la plateforme (environ 1100 souches), mais aussi du % GC de la séquence en vue du clonage. Nous obtenons alors une liste finale d’enzymes dites « candidates » à l’activité, qui vont être produites puis ciblées (Figure 13, étapes 4-5).

Grâce à ce procédé, des enzymes catalysant le même type de transformation chimique mais suffisamment différentes pour répondre à la problématique du projet (spectre de substrats différent, tolérance aux solvants ou à des températures non usuelles etc) sont sélectionnées au sein de la biodiversité séquencée.

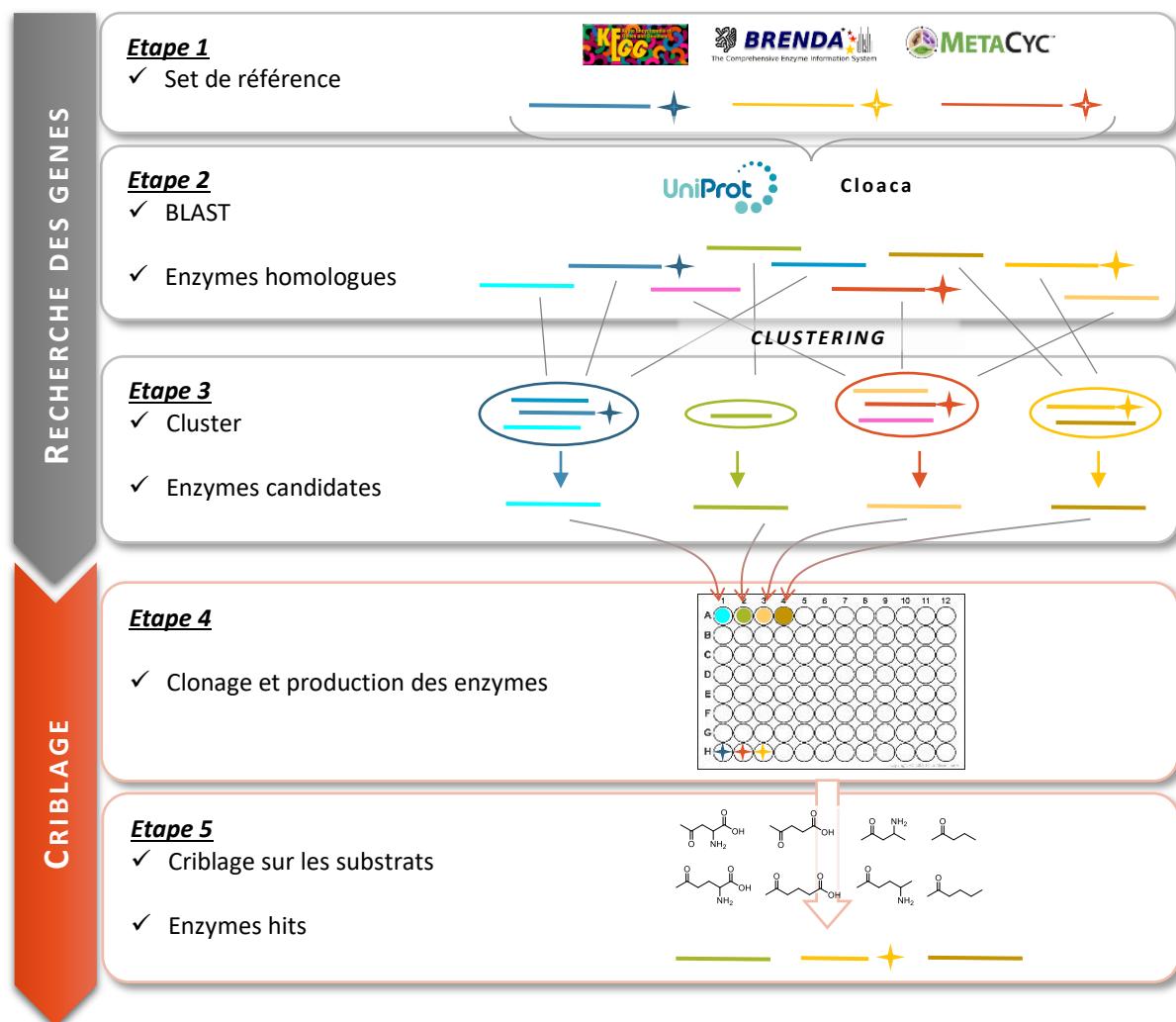


Figure 13 : Approche génomique pour la recherche de nouvelles activités enzymatiques mis en place par la plateforme.

1.1.2. Production des enzymes et criblage

1.1.2.1. Production des enzymes

La production des enzymes est faite par voie microbiologique. Elle débute par une étape de clonage du gène codant pour la protéine d’intérêt dans un vecteur, suivant le protocole LIC (Ligation Independent Cloning). Cette méthode permet de créer des extrémités cohésives sur le plasmide et le gène sans passer par l’utilisation d’enzymes de restriction, dont les sites de coupures peuvent parfois être retrouvés à l’intérieur de la séquence nucléotidique à cloner.

Le LIC fait intervenir la T4 polymérase (T4pol) pour créer les extrémités cohésives. Cette enzyme a la particularité de posséder à la fois une activité exonucléase dans le sens 3' – 5' et une activité polymérase dans le sens 5' – 3'. En absence du matériel nécessaire pour la polymérisation, seule l’activité exonucléase de la T4pol va pouvoir s’exprimer.

A la suite de la PCR (Polymerase Chain Reaction), le gène amplifié est mis en présence de la T4pol et de désoxycytidine phosphate (dCTP), unique base dans le milieu. Grâce à des amores choisies lors de l’amplification PCR, la T4pol va digérer une partie du gène (action d’exonucléase) jusqu’à ce qu’elle rencontre une cytosine où son activité polymérase va alors pouvoir reprendre (Schéma 49A). Les extrémités cohésives sont ainsi créées. La même méthode est appliquée sur le plasmide, au préalable linéarisé par l’action de EcoRV (Schéma 49B).

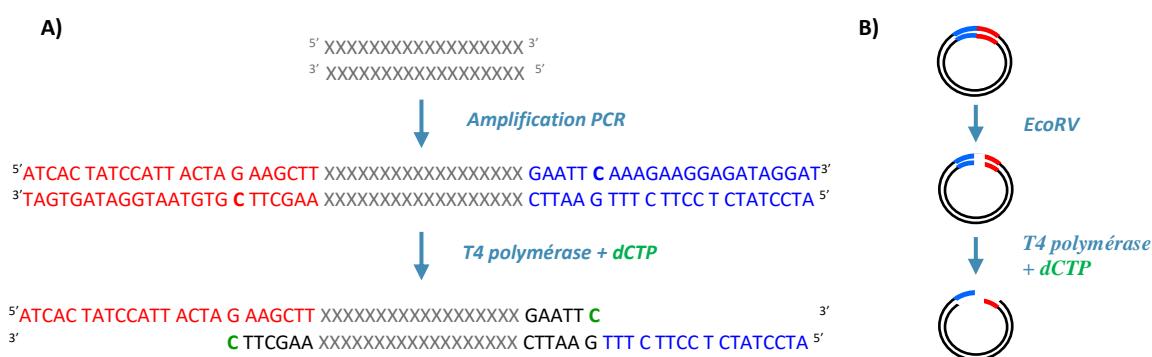


Schéma 49 : Création des extrémités cohésives sur A) le gène à cloner. B) le plasmide.

Le plasmide et le gène sont ensuite mis en contact. Les brins complémentaires créés s’hybrident, le plasmide redevient circulaire en intégrant la nouvelle séquence nucléotidique.

Il est ensuite introduit dans une bactérie hôte (cellules compétentes Novablue®) qui est mise en culture pour permettre sa multiplication (Schéma 50). A la suite de la lyse chimique des cellules, les plasmides sont récupérés et séquencés afin de vérifier l’intégration du gène. Ils sont ensuite insérés dans

des souches *E.coli* compétentes (BL21). Après culture, induction puis lyse, la protéine surexprimée est récupérée sous forme de lysat clarifié. Une analyse par électrophorèse permet de confirmer la présence majoritaire de l’enzyme d’intérêt. Dans certains cas, un HisTag composé de 6 histidines est ajouté à la séquence protéique au cours de l’amplification PCR précédente. Il permet une purification des enzymes par chromatographie d’affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC), réalisée dans certains projets, lorsque le lysat risque d’interférer dans le test de criblage.

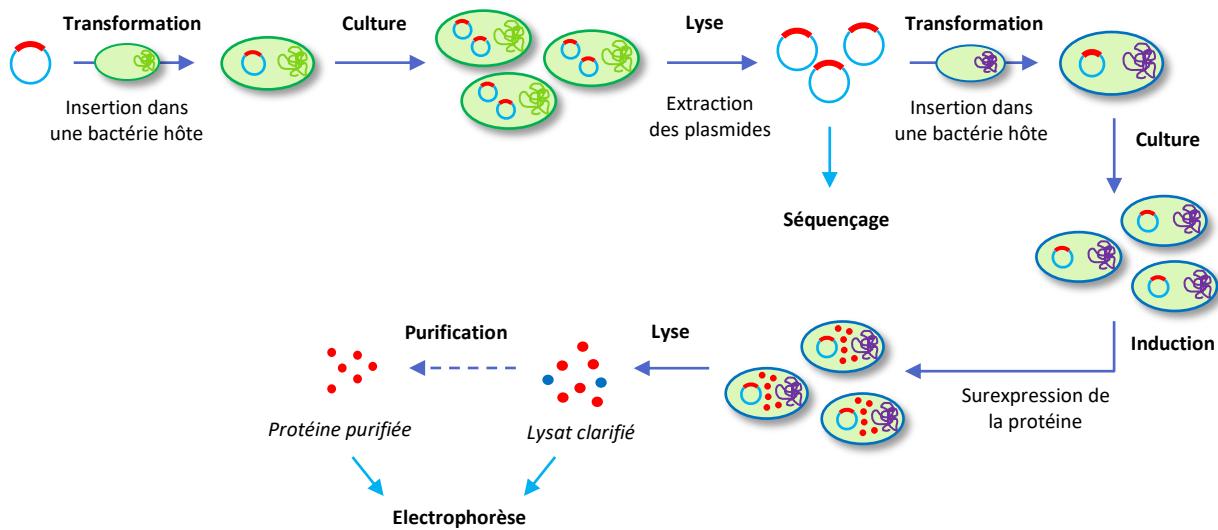


Schéma 50 : Production des enzymes sous forme de lysat clarifié ou purifiée.

Toutes ces étapes sont réalisées en plaques 96 puits, dans lesquelles chaque puit contient une enzyme candidate, identifiée lors de l’étape de sélection des enzymes, vue précédemment.

1.1.2.2. Criblage

Quelle que soit l’activité recherchée, il est nécessaire de disposer d’un test de détection. A chaque fois que cela s’avère possible un test simple, rapide et peu coûteux est mis en place dans le but d’identifier aisément les candidats positifs. La plupart du temps, il s’agit de tests spectrophotométriques ou fluorimétriques car ces technologies sont facilement applicables au format 96 puits. Il convient alors de déterminer un observable, produit ou substrat de la réaction étudiée, ou quand cela n’est pas possible, d’introduire cet observable via un test couplé. Lorsque ces méthodes de détection sont inapplicables, l’unité de recherche a recours à la détection par spectrophotométrie de masse.

A l’issue du criblage des enzymes candidates sur différents substrats, toutes ou une partie de celles répondant positivement sont produites et purifiées isolément et en plus grande quantité, afin de valider ou non l’activité. La même méthode de production est alors appliquée sur un plus grand volume de culture bactérienne.

Le projet AmDH a donc commencé par l’utilisation de cette plateforme pour la recherche d’enzymes catalysant la réaction d’intérêt. Ces travaux jusqu’au choix de l’enzyme d’étude, ont été réalisés avant mon arrivée au laboratoire par les équipes LCAB/LCOB et Sylvain David, étudiant de Master 2. Néanmoins, pour la compréhension du sujet et de la suite des expériences, ils vont être résumés dans les paragraphes suivants (1.2 à 2.2 inclus).

1.2. SET DE REFERENCE ET ENZYMES CANDIDATES

Comme vu dans les chapitres précédents, la réaction d’amination réductrice se caractérise par la transformation d’une fonction cétone en amine avec l’ammoniac en tant que source d’azote et un réducteur. Dans le métabolisme, les enzymes les plus connues pour catalyser cette réaction sont les acides aminés déshydrogénases (AADHs) (Cf. I.2.6.2). D’après la littérature, le spectre de substrats des AADHs se limite généralement aux α -céto-acides, c’est pourquoi ces enzymes n’ont pas été retenues pour constituer le set de référence. Une recherche de l’activité amination réductrice a alors été réalisée dans les bases de données métaboliques avec les paramètres suivants (Schéma 51) :

- Transformation d’une fonction cétone en amine
- Utilisation d’un cofacteur nicotinamide NADH ou NADPH
- Pas de fonction acide carboxylique sur le carbone α afin d’éviter de rapatrier des AADHs

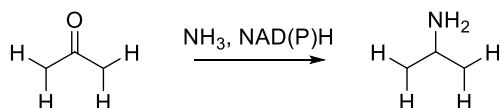


Schéma 51 : Réaction d’amination réductrice recherchée dans les bases de données métaboliques en imposant l’absence de fonction sur le carbone α .

Seulement deux enzymes sont ressorties de cette recherche : la L-érythro-diaminohexanoate déshydrogénase (Kdd – E3PRJ9), retrouvée dans la voie de la fermentation de la lysine chez *Clostridium sticklandii*, et la 2,4-diaminopentanoate déshydrogénase (2,4-DAPDH – E3PY99) retrouvée dans la voie de fermentation de l’ornithine, également chez *Clostridium sticklandii* (Schéma 52) (Fonknechten *et al.*, 2009, 2010). La première catalyse la déamination oxydative d’un β -céto-acide, alors que la deuxième agit sur un acide α -aminé, en transformant la fonction amine de la chaîne latérale en cétone. Ces réactions étant réversibles, ces deux enzymes ont donc été sélectionnées pour leur capacité à réaliser l’amination réductrice, activité recherchée.

Kdd et la 2,4-DAPDH, partageant seulement 16 % d’identité de séquence, ont constitué le set de référence pour le criblage *in silico* de la biodiversité. 334 protéines homologues ont été identifiées lors du BLAST contre Uniprot et Cloaca, 165 issues de Kdd et 169 de la 2,4-DAPDH. Après clustering à

80 %, seulement 43 candidates ont été retenues pour le criblage. Le clustering a alors été fixé à 95 %, portant à 62 le nombre d'enzymes à cloner, en incluant Kdd et la 2,4-DAPDH de *Clostridium sticklandii*. Elles ont été produites sous forme d'extrait cellulaire clarifié en plaque 96 puits, puis criblées sur un ensemble de substrats définis.

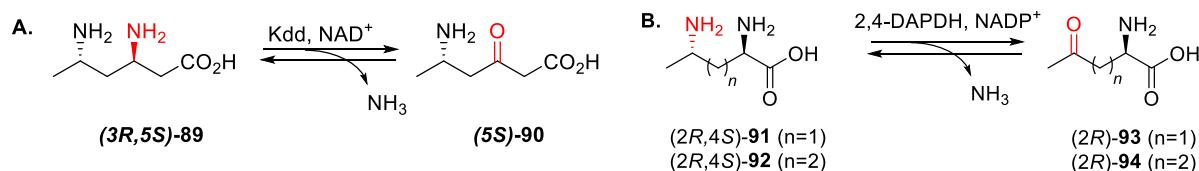


Schéma 52 : A. Réaction catalysée par Kdd. B. Réaction catalysée par la 2,4-DAPDH. n = 1 : substrat métabolique.

1.3. CRIBLAGE ET ANALYSE DES RESULTATS

1.3.1. Test de criblage

Nous recherchons des enzymes catalysant la réaction d'amination réductrice et utilisant le cofacteur NAD(P)H comme source d'électrons. La forme réduite de ce cofacteur (NAD(P)H) absorbe dans l'UV-visible à 340 nm contrairement à sa forme oxydée NAD(P)⁺. Il est donc possible de suivre directement l'évolution de la réaction par spectrophotométrie UV-visible : l'amination réductrice provoque une décroissance de l'absorbance (consommation du NAD(P)H dans le milieu) tandis que la déamination oxydative provoque une augmentation de l'absorbance (apparition de NAD(P)H dans le milieu) (Schéma 53). Ce test n'est pas spécifique des AmDHs et s'applique aux activités de toute enzyme à cofacteur nicotinamide.

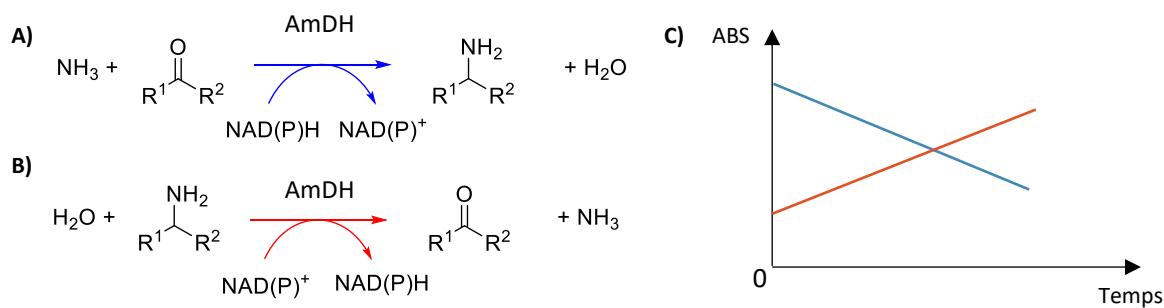


Schéma 53 : A) Réaction d'amination réductrice. B) Réation de déamination oxydative. C) Suivi spectrophotométrique de la consommation du NAD(P)H (bleu) ou de l'apparition du NAD(P)H (rouge). ABS = Absorbance.

Lorsque la pente de la courbe observée est plus forte que celle des témoins négatifs (sans substrat et sans enzyme surexprimée), l'enzyme est considérée comme active.

1.3.2. Choix des substrats

Le choix des substrats à cribler n'a pas été guidé par une application précise, notre approche étant seulement exploratoire. Pour répondre à la problématique de recherche d'AmDHs, enzymes actives sur des cétones si possible non fonctionalisées, les substrats ont été choisis comme variants structuraux de ceux métaboliques (**90** et **93**) de Kdd et 2,4-DAPDH : absence des fonctions acide carboxylique et amine séparément, puis simultanément (Tableau 3). La 2,4-DAPDH ayant une activité secondaire sur **94**, ce dernier a également été inclus dans la liste des substrats. Le test de criblage permettant aussi bien de suivre l'amination réductrice que la déamination, nous avons envisagé de tester les deux sens réactionnels.

Tableau 3 : Définition du spectre de substrats pour le criblage des enzymes candidates à l'activité AmDH. Bleu : substrats criblés.

SUBSTRATS CETONE (<i>amination réductrice</i>)				SUBSTRATS AMINE (<i>déamination oxydative</i>)			
Naturel	-NH ₂	-COOH	-NH ₂ /COOH	Naturel	-NH ₂	-COOH	-NH ₂ /COOH

Les 24 substrats ainsi sélectionnés n'ont pas tous été testés, certains n'étant pas commerciaux ou trop coûteux. Le criblage des 62 enzymes candidates s'est effectué sur les cétones **60**, **72**, **95**, **96**, **100**, **105**, **107** et les amines **89**, **91**, **99**.

1.3.3. Résultat du criblage

A l'issue du criblage sur extraits cellulaires clarifiés, trois composés différents des substrats métaboliques (**89** et **91**) se sont révélés être substrats de 26 enzymes : l'acide 4-oxopentanoïque (**95**), l'acide 5-oxohexanoïque (**100**) et l'acide 3-oxohexanoïque (**105**). Cependant, la différence d'activité entre les témoins négatifs (bruit de fond) et les extraits cellulaires contenant la protéine surexprimée sont faibles. Ces résultats ont alors été vérifiés en UHPLC-MS après réaction sur **95**, **100** et **105** sur enzymes purifiées ; une activité a été confirmée pour seulement 9 d'entre elles (Annexe 3).

Dans la suite du manuscrit, les enzymes testées sont nommées par leur position sur la plaque, soit DH2[ligne][colonne], dans le cas de cette plaque DH2. Les enzymes du set de référence sont identifiées par *.

Ces 9 enzymes, incluant E3PY99 (2,4-DAPDH, DH2B8*) du set de référence, sont toutes actives sur l’acide 4-oxopentanoïque (**95**), substrat non aminé (Tableau 4). A l’exception de DH2D4 et DH2D9, elles transforment également l’acide 2,4-diaminopentanoïque (**91**), substrat métabolique des 2,4-DAPDHs. De plus, deux enzymes, DH2C10 et DH2C11 ont été confirmées pour être actives sur les acides 5-oxohexanoïque (**100**) et 3-oxohexanoïque (**105**). La cétone réduite ne se trouvant ni sur le C- α ni sur le C- β , 9 enzymes de type AmDH ont bien été découvertes.

Tableau 4 : Enzymes ressorties hits lors du criblage de la plaque DH2. + : activité/amine détectée. ++ : amine plus fortement détectée. - amine/activité non détectée. nd : non déterminé.

Nom	Identifiant UniprotKB	Organisme	91		95		100		105	
			UV	MS	UV	MS	UV	MS	UV	MS
DH2A8	A7HNJ8	<i>Fervidobacterium nodosum</i>	+	+	++	-	-	-	-	+
DH2A9	A8F7T4	<i>Thermotoga lettingae</i>	+	+	+	-	nd	-	-	nd
DH2B1	A9BHL2	<i>Petrotoga mobilis</i>	+	+	++	-	-	-	-	nd
DH2B8*	E3PY99	<i>Clostridium sticklandii</i>	+	+	++	-	-	-	-	nd
DH2C10	D2Z5Z0	<i>Dethiosulfovibrio peptidovorans</i>	+	+	++	+	+	+	+	+
DH2C11	D7DCF5	<i>Staphylothermus hellenicus</i>	+	+	++	+	+	+	+	+
DH2C12	D9RY14	<i>Thermosediminibacter oceanii</i>	+	+	++	+	-	+	-	nd
DH2D4	Q8RAI4	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	-	+	+	-	nd	-	-	nd
DH2D9	C1B6H2	<i>Rhodococcus opacus</i>	-	+	+	-	nd	-	-	nd

Les 6 enzymes dont les activités sont ressorties les plus fortes par suivi en spectrométrie de masse ont alors été étudiées de manière plus approfondie sur le substrat **95**, commun à toutes.

Il est cependant à noter que plusieurs autres enzymes, homologues à Kdd du set de référence, étaient ressorties positives sur **89** et **105** mais une publication étant parue sur leur application potentielle en biocatalyse pendant ces travaux (Zhang *et al.*, 2015), elles n’ont pas été prises en considération.

2. ETUDES PRELIMINAIRES DES ENZYMES SELECTIONNEES

Ces études visent à choisir l’enzyme la plus performante parmi celles ressorties lors du criblage afin d’optimiser par la suite les conditions réactionnelles pour la synthèse stéréosélective de l’acide 4-aminopentanoïque (97).

L’activité des enzymes a tout d’abord été quantifiée par calcul de leur activité spécifique grâce à un suivi spectrophotométrique effectué sur les premières minutes de la catalyse (0-10 min). Dans un second temps, les enzymes ont été mises en réaction pendant 24-48 h afin d’estimer les conversions et leur énantiosélectivité, critère prééminent pour leur utilisation en synthèse. Ceci a nécessité la mise en place d’un suivi analytique, effectué par UHPLC-UV. Ces deux types d’analyses sont réalisés pour chaque enzyme hit purifiée issue du criblage.

2.1. METHODES ANALYTIQUES

2.1.1. Activité spécifique

L’activité spécifique est définie comme le nombre de μ moles de substrat transformé par minute et par milligramme d’enzyme. Elle quantifie l’activité d’une enzyme dans des conditions données sur les premiers temps réactionnels (conditions de vitesse initiale). Dans le cas des AmDHs, elle peut être mesurée par un test spectrophotométrique similaire à celui du criblage. De la même façon, la réaction enzymatique est suivie par mesure de l’absorbance du NAD(P)H pendant 10 min et la pente de la courbe obtenue est déterminée (Figure 14).

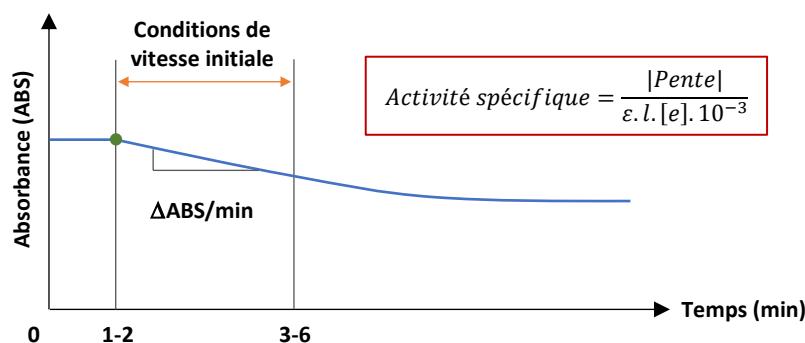


Figure 14 : Mesure de l’activité spécifique des enzymes par spectrophotométrie. Cas du suivi de la réaction d’amination réductrice. Vert : déclenchement de la réaction par l’ajout de l’enzyme ou du substrat. Activité spécifique ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ d’enzyme ou $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ d’enzyme), pente = pente de la courbe obtenue au spectrophotomètre (min^{-1}), ϵ = coefficient d’extinction molaire du NAD(P)H = $6220 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, l = trajet optique (cm), $[e]$ = concentration de l’enzyme dans le milieu ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

A partir de la loi de Beer-Lambert reliant l’absorbance à la concentration de la solution (ici [NAD(P)H]), et connaissant la stoechiométrie de la réaction, il est possible de calculer l’activité spécifique de l’enzyme.

2.1.2. Suivi de la conversion

La conversion après 24-48 h de réaction a été suivie en UHPLC-UV, après dérivatisation d’un échantillon de milieu réactionnel au 2,4-dinitrofluorobenzène (DNFB) (Schéma 54). Cet agent dérivatisant réagit avec les amines primaires par un mécanisme de substitution nucléophile, pour former un composé avec un maximum d’absorption à 360 nm. Cette étape est nécessaire afin de faciliter le suivi de la réaction : le composé dérivatisé devient détectable en UV.

Les conversions ont été estimées grâce à des gammes de calibration réalisées dans les mêmes conditions que les paramètres testés. La limite de détection de l’UHPLC-UV pour **97** dérivatisé (**111**) a été estimée à 0,1 mM ce qui correspond à une conversion de 1 % dans les conditions standards (10 mM de substrat).

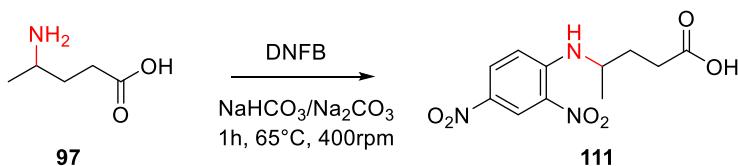


Schéma 54 : Réaction de dérivatisation de l’acide 4-aminopentanoïque (97) par l’agent dérivatisant DNFB.

2.1.3. Excès énantiomérique

L'*ee* a été mesuré de façon similaire à la conversion, cependant l’agent dérivatisant utilisé dans ce cas-là est le 1-fluoro-2,4-dinitrophényl-5-L-alanine amide (FDAA) (Schéma 55). Ce dernier comporte, à la différence du DNFB, un centre chiral. Après réaction avec l’amine **97**, nous obtenons donc deux diastéréoisomères, séparables et observables en UHPLC-UV. La limite de détection du produit dérivatisé au FDAA dans les conditions testées est de 0,025 mM, correspondant à 0,25 % de conversion dans les conditions standards (10 mM en substrat).

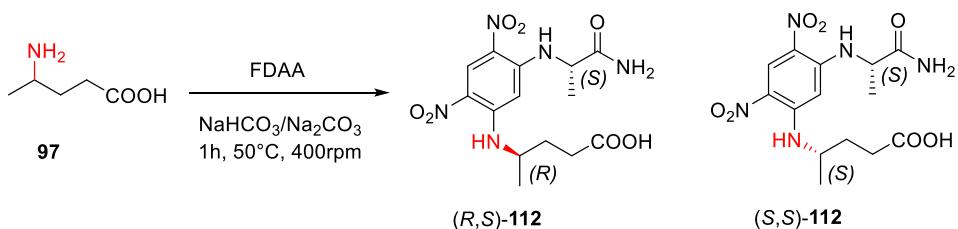


Schéma 55 : Réaction de dérivatisation de l’acide 4-aminopentanoïque (97) par l’agent dérivatisant FDAA.

2.2. CHOIX DE L’ENZYME D’ETUDE

Comme évoqué précédemment, l’énanriosélectivité d’une enzyme est souvent primordiale pour son utilisation en biocatalyse ce qui en fait donc le critère principal pour sa sélection. La conversion est également importante en vue d’une synthèse. Elle reste tout de même le second critère car, même si faible dans les premiers essais, le travail d’optimisation des conditions réactionnelles fait par la suite, permet son amélioration.

La mesure de l’activité spécifique des enzymes issues du criblage a confirmé les résultats observés : les hits identifiés sont bien actifs sur l’acide 4-oxopentanoïque (**95**) (Tableau 5). Les meilleures activités sont obtenues avec DH2A8, DH2B1, DH2B8*. Cette dernière est tout de même 10^3 fois moins active sur **95** que sur son substrat métabolique **93**.

Tableau 5 : Activité spécifique des enzymes hits sur les substrats **93** et **95**.

Nom	Activité spécifique sur 95 (mU.mg ⁻¹ prot)	Activité spécifique sur 93 (mU.mg ⁻¹ prot)
DH2A8	70,9 ± 15,6	
DH2B1	51,9 ± 4,8	
DH2B8*	34,1 ± 2,6	65 000
DH2C10	2,9 ± 0,1	
DH2C11	2,9 ± 0,6	
DH2C12	3,1 ± 0,2	

Afin d’optimiser la conversion pour une détermination plus précise de l’*ee*, des réactions à échelle analytique sur 24-48 h ont été effectuées et suivies en UHPLC-UV. Après avoir conclu sur le cofacteur préférentiel de chaque enzyme, un système de recyclage du NAD(P)H a été introduit pour déplacer l’équilibre de la réaction et minimiser la quantité introduite du cofacteur. Certaines enzymes étant issues d’organismes thermophiles, des réactions à température plus élevée (50 °C au lieu de 30 °C) ont été réalisées. Des conversions comprises entre 18 % et 43 % ont été obtenues pour chaque enzyme. Une dérivatisation des milieux au FDAA a montré une forte énanriosélectivité (> 95 %) pour toutes les enzymes étudiées (Tableau 6).

Une dernière étude sur la faisabilité d’une purification par choc thermique a conclu ces premiers tests ; le choix s’est finalement porté sur DH2B1 pour l’optimisation de la synthèse de l’acide 4-aminopentanoïque (**97**). Outre le très bon *ee* obtenu, la meilleure conversion a été observée. Par ailleurs, DH2B1 utilise le cofacteur NADH pour lequel plus de systèmes de recyclage sont envisageables que pour le NADPH. De plus, cette enzyme fonctionne à 50 °C, ce qui peut présager une plus grande stabilité. Enfin, sa purification par choc thermique permet une production plus rapide, en plus grande quantité et à plus faible coût.

Tableau 6 : Tableau récapitulatif de l’étude préliminaire des enzymes hits issues du criblage de la plaque DH2. FPLC = Fast Protein Liquid Chromatography.

	DH2A8	DH2B1	DH2B8*	DH2C10	DH2C11	DH2C12
Organisme						
Thermophile	Oui	Oui	Non	Non	Oui (hyper)	Oui
Cofacteur	NADH	NADH	NADPH	NADPH	NADH	NADPH
Conversion (%)	31	43	31	25	18	24
ee (%)	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95
Purification	Choc thermique		FPLC		Choc thermique	

Lors du début de mes travaux de thèse, j’ai approfondi l’optimisation des conditions de synthèse de l’amine **97** et caractérisé biochimiquement l’enzyme d’étude choisie, DH2B1.

3. CARACTERISATIONS BIOCHIMIQUES DE DH2B1

3.1. SOUCHE ET CONTEXTE GENOMIQUE

DH2B1 est issue de la bactérie *Petrotoga mobilis*. Cet organisme a été découvert dans les eaux de la mer du Nord, autour d’une plateforme pétrolière en Norvège (Lien *et al.*, 1998). C’est une bactérie fermentative, Gram négative, anaérobre stricte et thermophile. Sa température de croissance optimale est de 58-60 °C, à un pH de 6,5-7 et elle tolère des concentrations élevées en sel. Les informations sur la bactérie peuvent nous orienter sur les conditions d’utilisation de l’enzyme, comme cela a été le cas pour la température lors de l’étude préliminaire.

DH2B1 est annotée dans Uniprot comme étant une dihydridipicolinate réductase (DHDPR). Cette annotation, automatique, n’a pas été prouvée expérimentalement. Les DHDPRs catalysent la réduction du (S)-2,3-dihydropyridine-2,6-dicarboxylate (DHDP) en (S)-2,3,4,5-tétrahydropyridine-2,6-dicarboxylate (THDP) et sont retrouvées dans la voie de biosynthèse de la L-lysine (Schéma 56).

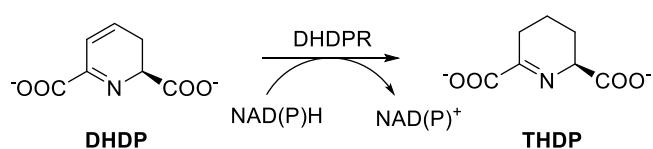


Schéma 56 : Réduction du DHDP en THDP catalysée par la dihydridipicolinate réductase.

Au vu des résultats précédemment obtenus sur cette enzyme, cette annotation ne semble pas correspondre à sa réelle fonctionnalité, mais paraît plutôt avoir été attribuée à cause de la signature du domaine NAD. De plus, l'étude du contexte génomique de cette enzyme montre que le gène codant pour DH2B1 se trouve en synténie et dans un locus similaire à celui de DH2B8* du set de référence (Figure 15). Ceci suggère donc une activité métabolique 2,4-DAPDH plutôt que DHDPR de DH2B1.

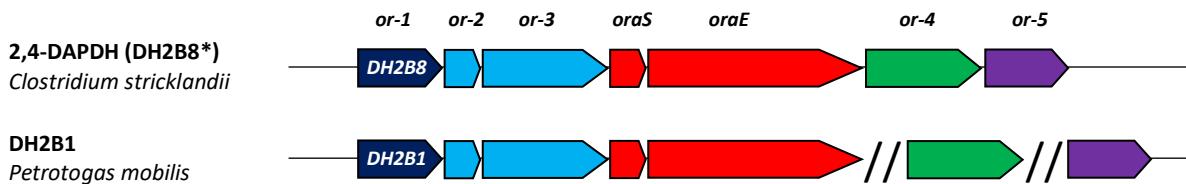


Figure 15 : Comparaison du contexte génomique entre DH2B8* du set de référence et DH2B1. or-1 à 5, oraS et oraE = gènes impliqués dans la voie de fermentation de l’ornithine. or-1 = gène codant pour les 2,4-DAPDHs impliquées dans cette voie. Adaptée de Fonknechten et al., 2009.

Afin de mieux caractériser cette enzyme, ses paramètres cinétiques ont été déterminés et son spectre de substrats réalisé. Compte tenu de son activité à 50 °C, son profil d’activité en fonction de la température ainsi que sa thermostabilité ont également été étudiés.

3.2. SPECTRE DE SUBSTRATS

L’activité spécifique de DH2B1 a été testée sur divers types de substrats selon le protocole décrit en paragraphe 2.1.1 : l’homologue carboné supérieur **100**, le β-céto-acide **105**, des substrats aliphatiques linéaires (**72**, **107**), cyclique (**61**) ou encore aromatique (**59**), en plus du substrat métabolique **93** (Figure 16). Certaines de ces molécules avaient déjà été testées lors du criblage, mais aucune n’était sortie positive. La spécificité de l’enzyme a finalement été confirmée lors de cette expérience puisque seul le substrat **100**, homologue supérieur de l’acide 4-oxopentanoïque (**95**), est ressorti positif avec une activité spécifique de 5,61 mU.mL⁻¹, soit 100 fois plus faible que sur le substrat **95**. Ce dernier est donc resté notre substrat d’étude.

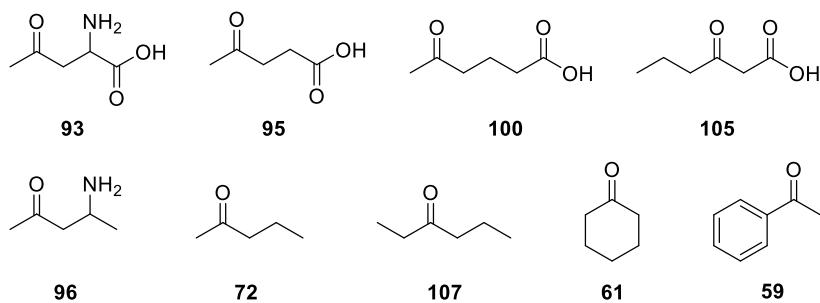


Figure 16 : Cétones testées pour l’établissement du spectre de substrats de DH2B1.

3.3. THERMOACTIVITE

Le profil d’activité de DH2B1 en fonction de la température a été étudié par spectrophotométrie pour la réaction d’amination réductrice sur l’acide 4-oxopentanoïque (**95**), substrat cible pour l’optimisation de la synthèse.

Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux observés avant mon arrivée. DH2B1 est faiblement active pour des températures en dessous de 40 °C (Figure 17). Elle commence à avoir une activité notable aux alentours de 60 °C (autour de 448 mU.mg⁻¹), son maximum étant atteint à 90 °C, limite expérimentale de mesure. A une telle température, son activité est de 658 mU.mg⁻¹, soit 8 fois supérieure à celle obtenue à 20 °C (78 mU.mg⁻¹). Une étude de thermostabilité a ensuite été menée pour savoir si l’enzyme pouvait réellement être utilisée à de telles températures pendant des temps plus longs, de l’ordre de 6-48 h, temps réactionnel en général.

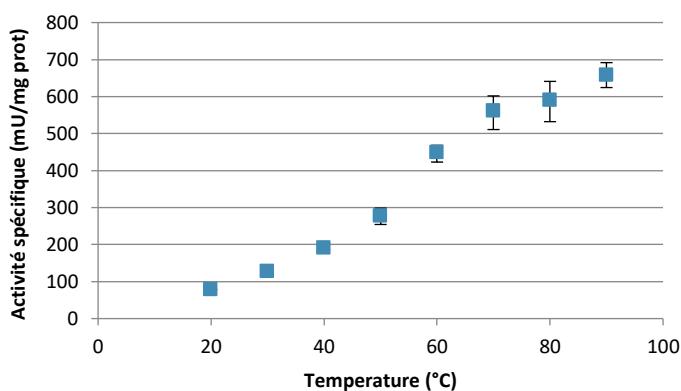


Figure 17 : Activité spécifique de DH2B1 en fonction de la température.

3.4. THERMOSTABILITE

Pour étudier sa thermostabilité, DH2B1 a été incubée à plusieurs températures (30, 50, 60, 70 et 80 °C) pendant différents temps puis son activité résiduelle a été mesurée par spectrophotométrie à 50 °C sur l’acide 4-oxopentanoïque (**95**).

Les résultats obtenus montrent une grande stabilité de l’enzyme à 30 °C où une diminution de l’activité semble seulement commencer qu’au bout de 120 h d’incubation (Figure 18). A 50 °C, DH2B1 conserve 70-80 % de son activité même après un long temps d’incubation, la diminution observée s’opérant majoritairement dans les 4 premières heures. La perte d’activité à 60 °C est plus linéaire. A cette température, le temps de demi-vie de DH2B1 est estimé aux alentours de 65 h, contre 24 h et 30 min respectivement pour 70 °C et 80 °C. A ces hautes températures, l’enzyme n’est plus stable et se

dégrade rapidement. Cette étude montre donc que DH2B1 est bien thermostable et peut aisément être utilisée à 50-60 °C sur une période de 24 à 70 h.

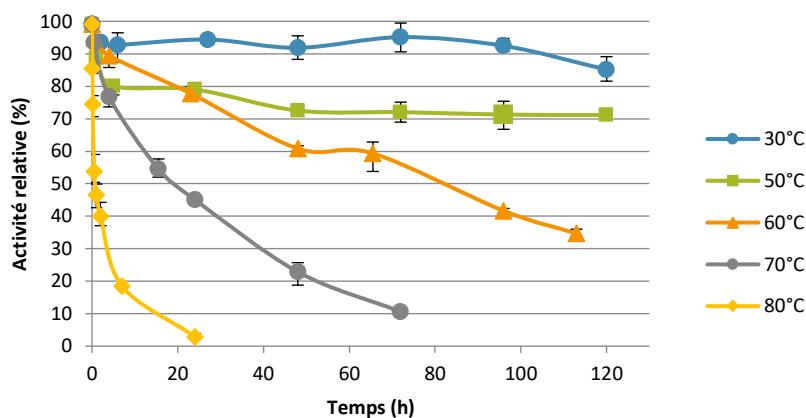


Figure 18 : Profil de thermostabilité de DH2B1

3.5. PARAMETRES CINETIQUES

Déterminer les paramètres cinétiques d'une enzyme est important pour sa caractérisation. Ces derniers nous renseignent sur sa spécificité, sa vitesse et son efficacité. Il existe deux types distincts de cinétiques enzymatiques : michaelienne et allostérique (Annexes 4 et 5). Une même enzyme peut avoir un comportement allostérique avec un substrat et suivre une cinétique michaelienne avec un second (Aghaie *et al.*, 2008).

Les paramètres cinétiques de DH2B1 ont été déterminés avec l’acide 2-amino-4-oxopentanoïque (**93**) à 21 °C et l’acide 4-oxopentanoïque (**95**) à 50 °C.

L’hypothèse faite antérieurement sur l’activité métabolique DAPDH de DH2B1 *via* le contexte génomique se confirme ici. En effet, l’efficacité catalytique obtenue sur le substrat **95** ($1,77 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) est cohérente avec des valeurs attendues pour un substrat métabolique (Tableau 7) (Bar-Even *et al.*, 2011). Par ailleurs, la constante catalytique k_{cat} chute d’un facteur 100 entre **93** et **95**, en dépit d’une activité plus importante de DH2B1 à 50 °C. Ceci renforce donc l’idée que l’activité AmDH est une activité secondaire de cette enzyme.

Nous pouvons également noter, au regard des K_M , que l’affinité envers le NH₃ est beaucoup plus faible que pour les deux autres substrats. Il est donc nécessaire d’en apporter une grande quantité pour être à saturation. Ces résultats sont cohérents avec les paramètres cinétiques des AADHs mutées en AmDHs décrites dans la littérature ($K_M(\text{NH}_3) = 350 \text{ mM}$ pour chLF-AmDH) (Bommarius *et al.*, 2014).

Malgré le changement de température entre les expériences avec le substrat **93** et l’acide 4-oxopentanoïque (**95**), nous remarquons que les K_M de NADH et NH₃ ne varient pas.

Tableau 7 : Paramètres cinétiques de DH2B1.

Entrée	Substrat	T (°C)	$K_M (S_{50})$ (mM)	$k_{cat} (V_{max})$ (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ .M ⁻¹)	Coefficient de Hill
1	NADH (NH ₃ , 93)	21	0,025	35.1	1,40E+06	/
2	NH ₃ (NADH, 93)	21	320	34.3	1,07E+02	/
3	93 (NH ₃ , NADH)	21	0,235	41.5	1,77E+05	/
4	NADH (NH ₃ , 95)	50	0,026	4,34	1,68E+05	/
5	NH ₃ (NADH, 95)	50	300	4,26	1,42E+01	/
6	95 (NH ₃ , NADH)	50	(295)	(5,32)	/	1,86

Par ailleurs, alors que DH2B1 a une cinétique michaelienne avec son substrat métabolique **93**, les données obtenues révèlent une allostérie avec **95**, avec un coefficient de Hill de 1,86, et confirmée par la représentation d’Eadie-Hofstee (Figure 19).

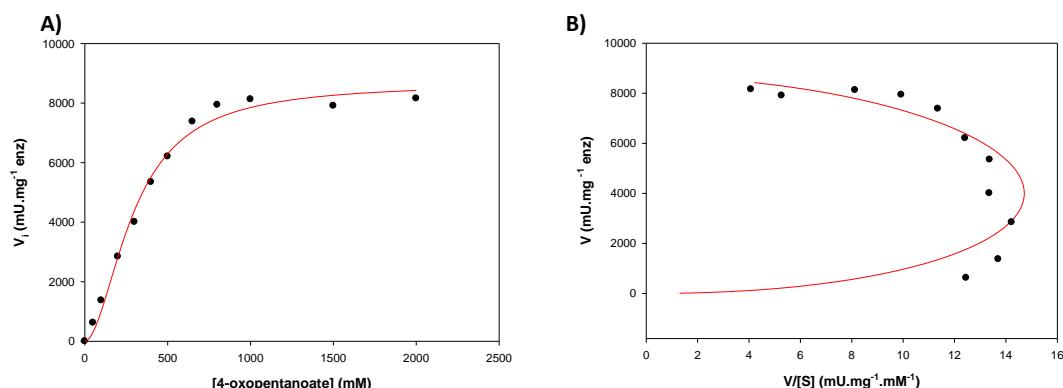


Figure 19 : A. Cinétique allostérique de DH2B1 avec le 4-oxopentanoate (95). B. Représentation d’Eadie-Hofstee en forme de virgule, caractéristique d’une allostérie. (Courbes rouges : modélisation SigmaPlot des données expérimentales (noires)).

Il est finalement difficile de comparer les substrats **93** et **95**, mais il peut être néanmoins noté que la constante de demi-saturation pour l’acide 4-oxopentanoïque (**95**) est 1000 fois plus importante que celle de **93** (250 mM contre 0,2 mM), ce qui traduit donc une affinité plus faible. Il est intéressant de remarquer que les fortes concentrations en **95** ne semblent pas inhiber l’enzyme, ce qui suggère que des concentrations importantes en **95** pourront être utilisées lors de la synthèse.

4. SYNTHESE BIOCATALYSEE DE L’ACIDE (4S)-4-AMINOPENTANOIQUE

4.1. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE SYNTHESE

L’optimisation des conditions de réaction est nécessaire pour déterminer les meilleurs paramètres en vue d’une synthèse à plus grande échelle. La composition du milieu et l’environnement dans lequel se trouve l’enzyme jouent un rôle primordial pour son efficacité. Ainsi, la température, la nature du tampon et sa concentration, le système de recyclage du cofacteur ou encore la concentration en tampon, substrat et enzymes, ont une influence importante sur la conversion et donc le rendement de la réaction. Chacun de ces paramètres a alors été modifié l’un après l’autre, le meilleur résultat d’une expérience étant conservé pour la suivante. Contrairement aux caractérisations biochimiques qui sont déterminées *via* la vitesse initiale des enzymes, les réactions à objectif de synthèse s’intéressent elles à la quantité de produit final formé. Dans ce cas là alors, nous ne regardons plus l’activité spécifique de l’enzyme mais la conversion en fin de réaction.

Toutes les réactions d’optimisation ont été réalisées dans un volume total de 100 µL, et suivies sur 24-48 h par UHPLC-UV après dérivatisation du milieu réactionnel (cf. 2.1.2 et 2.1.3). Les conditions utilisées en début d’optimisation ont été choisies en s’appuyant sur les travaux effectués par le groupe de Bommarius, seuls résultats publiés à ce moment du projet (Abrahamson *et al.*, 2012, 2013; Bommarius *et al.*, 2014). Nous sommes alors partis d’un milieu contenant 10 mM d’acide 4-oxopentanoïque (**95**), 200 mM NH₄Cl/NH₄OH, 1 eq. NAD(P)H, 100 mM tampon NaHCO₃/Na₂CO₃ pH 9,5, 0,1 mg.mL⁻¹ DH2B1, 30 °C, 400 rpm. Les conversions obtenues ont été déduites de courbes de calibration réalisées dans les mêmes conditions que la réaction analysée.

L’objectif fixé pour cette optimisation était d’obtenir une conversion quasi-totale en 24h, avec une concentration élevée en substrat afin de maximiser le STY.

4.1.1. Cofacteur

Alors qu’aucun produit n’a été détecté avec le NADPH, une conversion de seulement 2 % a été obtenue avec un équivalent de cofacteur NADH. Ceci confirme tout d’abord les résultats déjà observés lors de l’étude préliminaire, qui avaient permis de déterminer que DH2B1 était NADH dépendante. Par ailleurs, la faible conversion n’est pas non plus surprenante et s’explique par la température de 30 °C de la réaction. Nous savons d’après les travaux précédents, que DH2B1 est plus active à des températures élevées, c’est pourquoi ce paramètre a été modifié.

4.1.2. Température

Une gamme de températures allant de 30 à 70 °C a été testée avec un équivalent de NADH sur 24h. Cette expérience révèle un maximum de conversion à 50 °C pour la réaction biocatalysée, ce qui diffère de la température maximale d’activité (> 90 °C) de l’enzyme, observée lors de sa caractérisation (Figure 20). Si la dégradation de DH2B1 peut expliquer une conversion plus faible à 70 °C, ce n’est pas le cas pour 60 °C. En effet, son profil de thermostabilité montre que sur une période de 24 h, la perte d’activité est comparable entre 50 et 60 °C (cf. 3.4). Le facteur le plus probable pour expliquer cette diminution de conversion est la décomposition du cofacteur nicotinamide qui est accélérée avec la température.

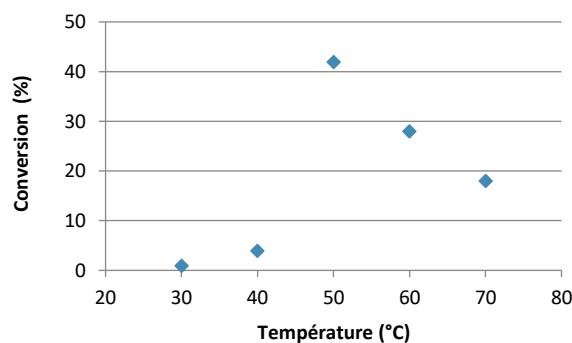


Figure 20 : Conversion (24 h) en fonction de la température pour la réaction d’amination réductrice sur 95 biocatalysée par DH2B1.

4.1.3. Système de recyclage

Le cofacteur nicotinamide NADH est un des cofacteurs pour lesquels il existe le plus de systèmes de régénération (Zhao and van der Donk, 2003). Les 5 systèmes enzymatiques suivants ont été testés (Schéma 57) :

- Deux glucose déshydrogénases (GDHs), nommées GDH105 et CDX901 fournies gratuitement par Codexis, la CDX901 étant évoluée pour être plus tolérante à la température. Les GDHs transforment le glucose en D-gluconolactone. Elles ne sont pas spécifiques d’un cofacteur, et utilisent aussi bien le NAD que le NADP.
- La glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). L’enzyme commerciale utilisée ici est décrite pour régénérer à la fois le NAD et le NADP, en transformant le glucose 6-phosphate en 6-phospho-D-gluconate.
- La phosphite déshydrogénase (PTDH). Elle n’est pas non plus spécifique et transforme le phosphite en phosphate. Cette enzyme n’est pas commerciale et nous a été gracieusement fournie par le professeur Marco Fraaije.

- La formate déshydrogénase (FDH). Elle produit du CO₂ à partir du formate, et est NAD dépendante et disponible commercialement.

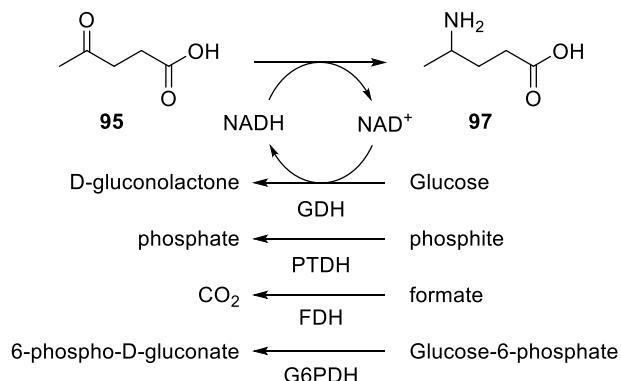


Schéma 57 : Systèmes de régénération du cofacteur NADH couplés à la réaction catalysée par DH2B1.

Les alcools déshydrogénases (ADHs) peuvent aussi être utilisées pour le recyclage du NADH, mais elles n’ont pas été testées ici, puisque susceptibles d’avoir une activité résiduelle sur nos substrats.

Si les systèmes GDH, PTDH, FDH et G6PDH sont bien décrits à température ambiante, peu ou pas de données sont disponibles sur leur activité à des températures plus élevées. Ils ont donc été testés sur la gamme de température de 30 °C à 60 °C, sur la transformation cible.

A 30-40 °C, la formation de l’amine souhaitée n’est pas réellement améliorée par rapport à la réaction avec un équivalent de NADH (Figure 21). En revanche, à 50 °C, deux systèmes se dégagent nettement : celui faisant intervenir la FDH et celui avec la GDH105. De plus, cette dernière permet toujours d’obtenir de bonnes conversions à 60 °C (80 % en 24 h). Ce résultat conforte l’hypothèse que la décomposition du NADH dans l’expérience précédente est à l’origine de la chute de conversion observée à 60 °C. L’introduction du recyclage du cofacteur induit un système dynamique, où le NADH formé est rapidement utilisé dans la réaction principale. Son temps de présence en solution est donc diminué ce qui limite ainsi sa décomposition.

La réaction avec GDH 105 a dans un second temps été testée à 70 et 80 °C, mais la conversion n’a pas été amélioré. L’enzyme de recyclage perd probablement la majorité de son activité à de telles températures.

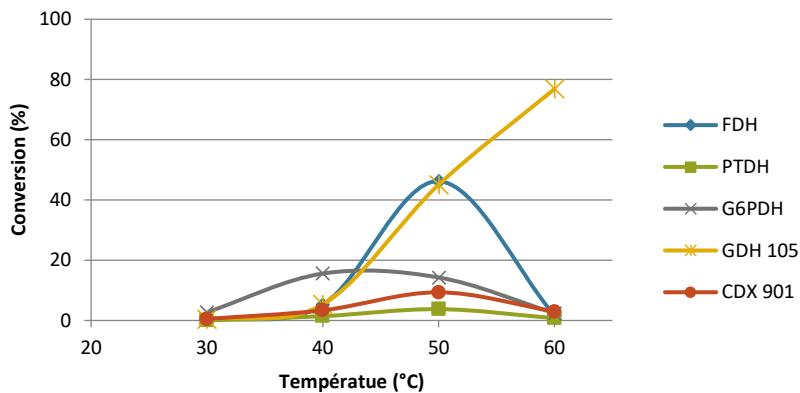


Figure 21 : Conversion (24 h) en fonction de la température pour la réaction d’amination réductrice sur 95 biocatalysée par DH2B1 couplée à diverses enzymes de recyclage.

Etonnamment, l’enzyme CDX901 décrite pour mieux tolérer des fortes températures ne fonctionne pas mieux que GDH105 dans notre cas. Les autres systèmes semblent également être sensibles à la température et/ou diminuer l’activité de DH2B1 par l’apport des substrats/produits secondaires nécessaires.

Les deux enzymes FDH et GDH ont été retenues pour la suite de l’étude : FDH à 50 °C, présentant l’avantage de former un sous-produit gazeux et GDH105, à 60 °C permettant d’atteindre à ce stade des conversions de l’ordre de 80 %.

4.1.4. Tampon et pH

4.1.4.1. Nature du tampon et pH

L’étape suivante d’optimisation a été de trouver le tampon et le pH les plus adaptés pour chaque couple DH2B1/FDH, DH2B1/GDH. Ceux classiquement utilisés pour la réaction d’amination réductrice catalysée par les AmDHs sont NH₄Cl/NH₄OH et NH₄COOH/NH₃ puisque, malgré leur faible pouvoir tampon, ils sont source d’ammoniac. NaHCO₃/Na₂CO₃, plutôt utilisé dans le sens inverse d’oxydation, a également été étudié. Les autres tampons basiques tels que Glycyl-glycine ou trishydroxyméthylaminométhane (TRIS) souvent employés lors d’études d’enzymes, ont été évités ici, car ils ajoutent des composés carbonés dans le milieu, compliquant souvent la purification du produit cible.

Les tampons choisis ont été testés sur une gamme de pH allant de 7 à 10 même si leur pouvoir tampon ne couvre en réalité pas toute cette gamme de pH. Le substrat étant acide, il entraîne une légère diminution du pH réel du milieu réactionnel, c’est pourquoi ce dernier est présenté plutôt que celui du tampon. Par la suite, le substrat a été préalablement basifié pour éviter ce problème.

Afin de conserver une quantité en NH₃ égale dans tous les tests, les tampons NH₄Cl/NH₄OH et NH₄COOH/NH₃ ont été introduits à une concentration de 200 mM, concentration choisie dans un premier temps pour la source d’ammoniac NH₄Cl avec le tampon carbonate. Le pH du milieu réactionnel est vérifié avant et après réaction pour contrôler l’absence de variation. Par ailleurs, NH₄COOH/NH₃ n’a été testé que pour FDH où, dans ce cas, le tampon a l’avantage d’apporter le substrat formate de la FDH.

Résultats DH2B1/FDH :

A 48 h, les réactions avec les différents tampons suivent une même tendance ; les conversions maximales sont atteintes pour un pH compris autour de 8 (Figure 22A). A pH plus acide, moins d’amine est formée dans le milieu et au-delà de pH 8,5, les conversions chutent fortement, excepté avec le tampon NH₄COOH/NH₄OH où la baisse n’est constatée qu’après pH 9,2. Comme ce dernier apporte également le substrat de FDH, il a finalement été retenu pour la suite de l’étude. Les pH basiques affectant plus la réaction que les pH acides, nous nous sommes placés à pH 8,5.

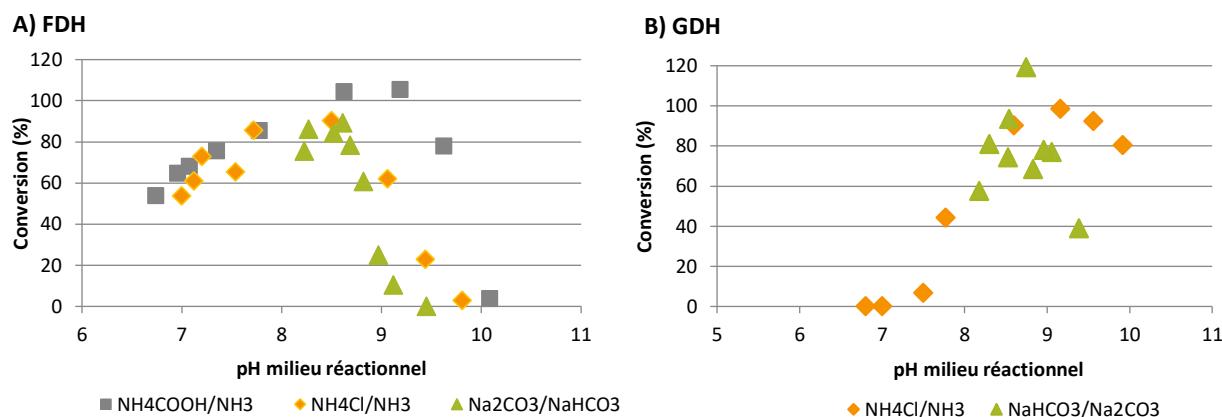


Figure 22 : A) Conversion (48 h) en fonction de la nature du tampon et du pH pour la réaction d’amination réductrice sur 95 biocatalysée par le système couplé A. DH2B1/FDH. B) DH2B1/GDH.

Résultats DH2B1/GDH :

Les résultats obtenus avec GDH et le tampon carbonate sont très hétérogènes, il est donc difficile de conclure sur cette expérience (Figure 22B). Le choix s’est porté sur NH₄Cl/NH₄OH, dont le maximum d’activité se trouve à pH 9, soit au pK_A du tampon.

Une différence notable apparaît entre les deux systèmes. En effet, pour des pH autour de 7, le couplage DH2B1/FDH fonctionne alors qu’aucune conversion n’est obtenue avec la GDH. Inversement, pour des pH plus basiques entre 9 et 10, la conversion avec FDH chute, alors que le système GDH/ DH2B1 reste actif. De plus, la mesure du pH final n’a montré aucune variation de celui-ci par rapport à celui initial.

Ces valeurs retenues de pH restent dans la gamme de pH classiquement utilisées avec les AmDHs.

4.1.4.2. Concentration en tampon

Les tampons choisis apportant à la fois la source d’azote et dans le cas de FDH le substrat pour l’enzyme de recyclage, il est d’autant plus important de regarder l’effet de leur concentration, qui par conséquent joue aussi sur le nombre d’équivalent en NH₃.

La concentration en DH2B1 pour le système GDH a été diminuée pour cette expérience, la réaction avec 0,1 mg.mL⁻¹ de DH2B1 étant totale à 24 h, aucune évolution entre les concentrations en tampon n’avait été observée. C’est pourquoi les conversions sont plus faibles que celles présentées jusqu’à maintenant.

Alors que l’augmentation de la concentration en tampon de 100 mM à 5 M est bénéfique pour la réaction avec FDH, ce n’est pas le cas pour celle avec la GDH, qui se trouve ralentie pour des concentrations supérieures à 1 M (Figure 23). Dans les deux cas, les valeurs les plus élevées sont maintenues en vue de l’augmentation de la quantité de substrat, soit 5 M pour FDH et 1 M pour GDH.

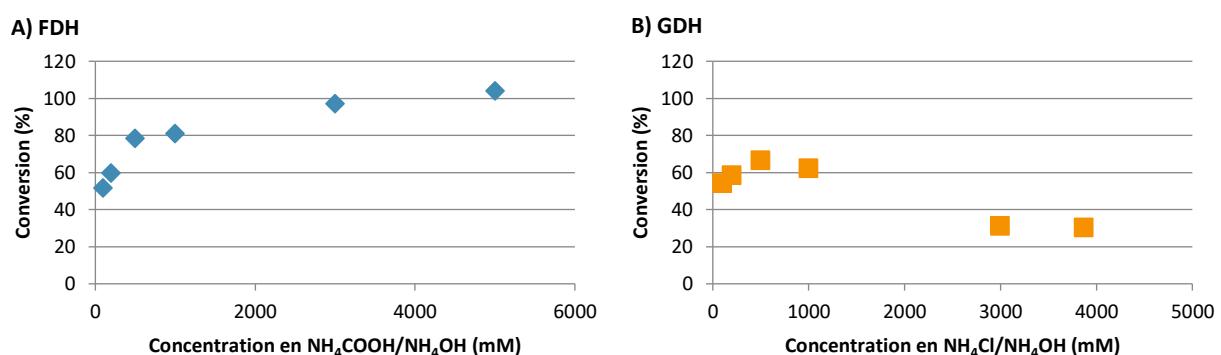


Figure 23 : Conversion (24h) en fonction de la concentration en tampon pour la réaction d’amination réductrice sur 95 biocatalysée par le système couplé A) DH2B1/FDH. B) DH2B1/GDH.

4.1.5. Concentration en substrat

La concentration en substrat de 10 mM utilisée jusque-là n’a que peu d’intérêt d’un point de vue synthèse. Les concentrations requises pour qu’un procédé soit envisageable industriellement sont de l’ordre de 50 g.L⁻¹, soit environ 450 mM pour le substrat **95** (Sheldon and Brady, 2018). Même si l’objectif de ce projet n’est pas la synthèse pré-industrielle d’amines, il est intéressant de maximiser la concentration en substrat pour connaître la potentialité de l’enzyme. De plus, d’après les constantes cinétiques de DH2B1 pour l’acide 4-oxopentanoïque (**95**) ($S_{50} = 295$ mM), il est possible, d’un point de vue théorique, d’augmenter la quantité de **95** au moins d’un facteur 30 dans la réaction, sous réserve que les enzymes de recyclage ne soient pas affectées.

Dans le cas de GDH, l’augmentation en substrat s’avère plus compliquée que pour FDH. En effet, la réaction de recyclage du cofacteur nicotinamide nécessite l’apport d’au moins un équivalent de glucose. Après 24 h de réaction et pour une concentration de 300 mM de cétone initiale, il y a apparition d’un précipité orangé dans les expériences, dû à la caramélisation du glucose à cette température. Ce système a donc été abandonné à ce stade de l’optimisation.

En ce qui concerne FDH, le tampon apportant à la fois le substrat pour l’enzyme de recyclage et la source d’azote, et au vu de la concentration utilisée de 5 M, des quantités de substrat allant de 10 mM à 0,5 M ont pu être testées.

L’augmentation de la concentration en cétone **95** fait chuter la conversion à 48 h, mais il est intéressant de noter que la quantité d’amine formée, elle, continue de progresser (Figure 24). Un palier semble cependant se dessiner à partir de 300 mM, ce qui suggère que le système atteint la saturation. Cette enzyme est donc très intéressante d’un point de vue application en synthèse puisque des concentrations en substrat de l’ordre de 300-500 mM sont tout à fait supportées. Afin d’améliorer la conversion de 40 % obtenue pour 0,5 M de **95**, et par-delà le rendement de la synthèse, la concentration en enzyme doit être ajustée.

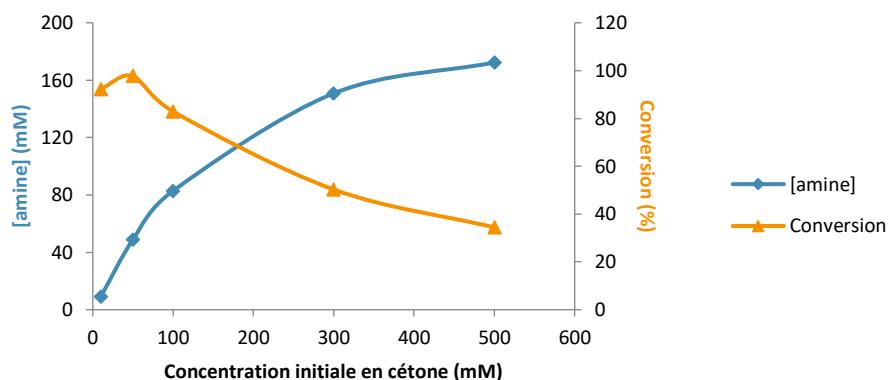


Figure 24 : Conversion (48h) et concentration en amine dans le milieu en fonction de la concentration initiale en cétone dans la réaction d’amination réductrice sur **95** biocatalysée par DH2B1.

4.1.6. Concentration en enzymes

Comme indiqué précédemment, l’objectif est d’atteindre une conversion quasi-totale en 24 h de réaction afin d’être dans des conditions acceptables de synthèse. L’augmentation de la quantité en DH2B1 nous permet d’atteindre ce but. En effet, 92 % des 0,5 M de cétone **95** engagée dans la réaction sont convertis en 24 h avec 1 mg.mL⁻¹ de DH2B1 (Figure 25A). Une plus grande quantité de DH2B1 ne nous permet cependant pas d’avoir une réaction totale.

Cette concentration relativement importante de DH2B1 (1 mg.mL^{-1}) reste tout de même en dessous des prérequis industriels ($< 10 \text{ g.L}^{-1}$). De plus, sa purification par choc thermique permet de réduire le coût de sa production sous forme d’enzyme pure. Cependant afin d’éviter cette étape, les cellules lyophylisées *E.coli* possédant DH2B1 surexprimée ont été testées pour la réaction d’amination réductrice sur **95**, dans les mêmes conditions. Une conversion maximale de 43% en 24h a été obtenue avec 5 mg de cellules, ce qui reste tout de même plus faible qu’avec les enzymes purifiées.

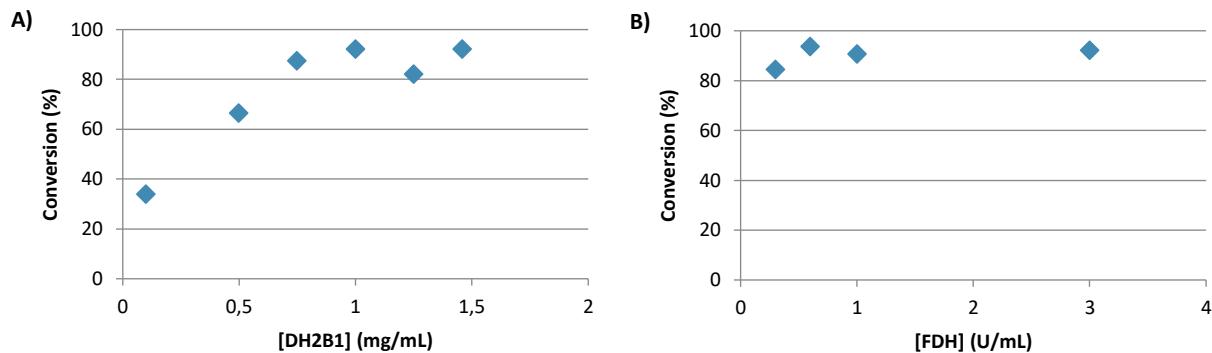


Figure 25 : Conversion (24h) en fonction A) de la concentration en DH2B1, B) de la concentration en FDH, pour la réaction d’amination réductrice sur **95** biocatalysée par DH2B1.

En dernier lieu, nous avons minimisé la quantité de FDH introduite dans le milieu (Figure 25B). Il s’est avéré qu’une concentration de $0,5 \text{ U.mL}^{-1}$ est suffisante, soit six fois moins que celle utilisée jusqu’à présent (3 U.mL^{-1}).

Enfin, un suivi cinétique de la synthèse du 4-aminpentanoate (**97**) dans les conditions ainsi optimisées en triplicata sur un volume de $200 \mu\text{L}$, a confirmé la forte conversion en 24 h (Figure 26).

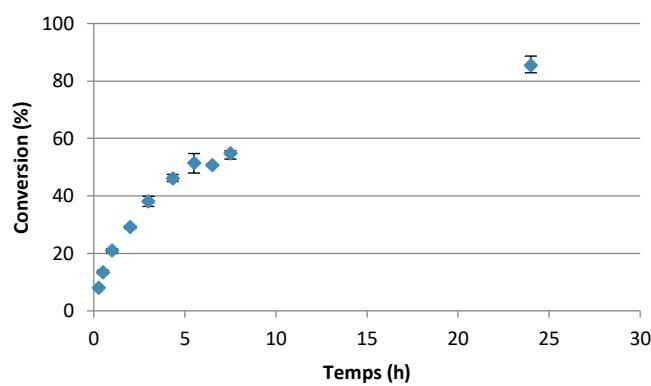


Figure 26 : Suivi de la conversion de la réaction catalysée par DH2B1 dans les conditions optimisées.

4.1.7. Conclusion de l’optimisation

Finalement, après avoir déterminé le cofacteur préférentiel de l’enzyme, l’augmentation de la température de 30 à 50 °C a permis d’atteindre d’une conversion de 42 %. A la suite de l’intégration d’un système de recyclage du cofacteur, les variations de la nature du tampon, de sa concentration et de son pH, ont permis d’obtenir une réaction totale en 24 h. Les deux derniers paramètres modifiés ont été la concentration en substrat puis en enzymes, afin de pouvoir réaliser une montée en échelle viable en synthèse (Figure 27). Les conditions finales retenues sont : 5 M de tampon NH₄COOH/NH₄OH pH 8,5, 0,5 M de substrat, 0,4 mM de NADH, 0,5 U.mL⁻¹ de FDH et 1 mg.mL⁻¹ de DH2B1, agitation 400 rpm, 50 °C, 24 h.

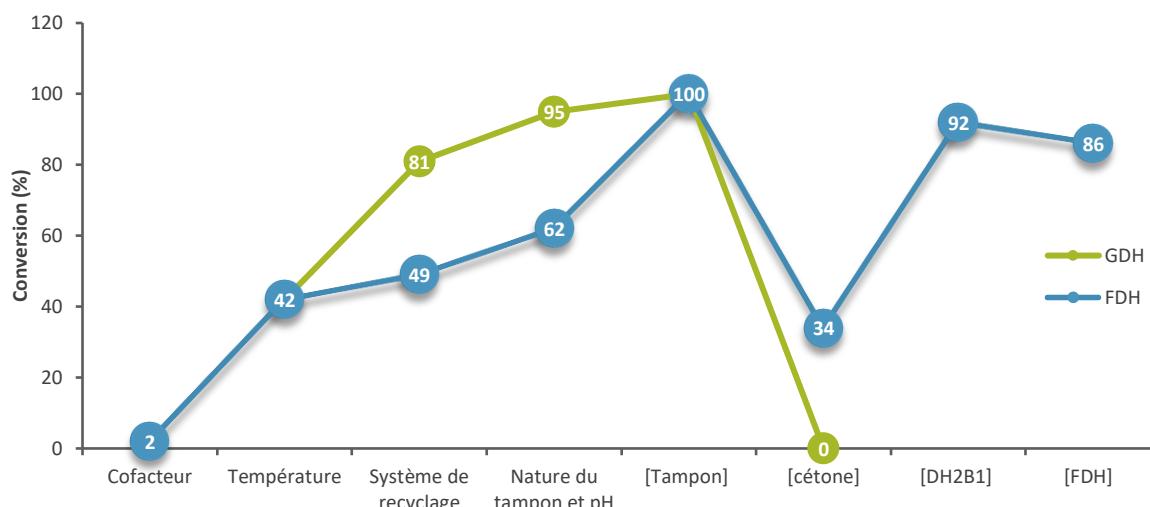


Figure 27 : Evolution de la conversion au cours des différentes étapes d’optimisation de la réaction d’amination réductrice sur 95 biocatalysée par DH2B1.

4.2. SYNTHÈSE A L’ECHELLE SEMI-PREPARATIVE

En utilisant les conditions déterminées précédemment, plusieurs réactions effectuées sur 58 mg de réactif **95** (volume réactionnel de 1 mL) ont permis de vérifier le comportement du système à plus grande échelle et de mettre au point la purification du produit. Cette dernière a été effectuée par simple traitement acide puis purification sur résine échangeuse d’ions. L’analyse de ces essais préliminaires par UHPLC-UV (dérivatisation avec l’agent chiral FDAA) a confirmé un *ee* > 99.5 % de l’amine formée **97** et l’analyse RMN ¹H a montré que le produit est pur (pureté > 95 %) validant ainsi le mode traitement/purification choisi.

Une réaction sur 523 mg de cétone (volume réactionnel de 9 mL) a alors été effectuée (Schéma 58). Un rendement de 88 % a été obtenu (465 mg), ce qui nous a permis une mesure du pouvoir rotatoire du produit et de confirmer ainsi la stéréochimie *S* au niveau de l’amine **97**, stéréochimie préférentielle de la 2,4-DAPDH de *Clostridium stickandii* sur son substrat métabolique **93** (Fonknechten *et al.*, 2009). Le dosage enzymatique du NH₄Cl, contenu dans le produit synthétisé a montré seulement une présence de 0,03 % massique de ce dernier (voire partie expérimentale 3.5). Cette vérification a été réalisée à cause de l’importante molarité en NH₄OH utilisée lors de la purification pouvant entraîner la présence de sel, mais aussi en vue de l’étude d’évolution dirigée de DH2B1, pour laquelle l’absence de NH₃ dans le produit est indispensable (cf. 7).

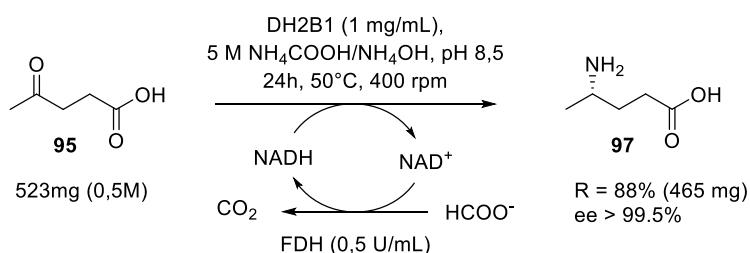


Schéma 58 : Synthèse semi-préparative biocatalysée par DH2B1 de l’acide (4*S*)-4-aminopentanoïque (**97**).

Cette synthèse est finalement compétitive par rapport aux procédés biocatalytiques, avec un STY de 51,6 g.L⁻¹.d⁻¹, comparable à celui obtenu par Pushpanath *et al.* lors de la synthèse du (*R*)-**81** avec des cellules entières surexprimant CtF-AmDH et GDH (STY = 60 g.L⁻¹.d⁻¹) (cf. I.2.7.2.2) (Pushpanath *et al.*, 2017). Le « total turn over number » (TTN) peut également être calculé et reflète la quantité de produit formé par rapport à la quantité de catalyseur employé. Plus ce rapport est important, moins la synthèse est coûteuse en enzyme. Dans notre cas, un TTN de plus de 27000 est obtenu, comparable à celui déterminé pour les RedAms (32000 environ) pour la réaction d’amination réductrice entre la méthylamine et la cyclohexanone.

Ces travaux de découverte de DH2B1 puis d’optimisation et de synthèse ont fait l’objet d’une première publication en juin 2016, dans Catalysis, Science and Technology (Mayol *et al.*, 2016).

5. ACTIVITE EN PRESENCE DE COSOLVANTS

Malgré son spectre de substrats restreint, des travaux de modification du site actif de l’enzyme pourraient être envisagés afin que DH2B1 accepte des molécules plus hydrophobes, peu ou pas solubles dans l’eau. DH2B1 pourrait également être utilisée en cascade (chemo)-enzymatique pouvant nécessiter des cosolvants. Une étude sur la tolérance du système enzymatique à leur présence dans le milieu a alors

été réalisée, en s’appuyant sur des travaux similaires effectués par Cainelli *et al.* sur une AADH (Cainelli *et al.*, 2005).

5.1. SOLVANTS MISCIBLES A L’EAU

La réaction biocatalysée a été testée en présence d’éthanol (EtOH), de diméthylformamide (DMF) et d’acetonitrile (ACN) de 0 à 40 % v/v, à la fois en absence de système de recyclage avec un équivalent de NADH, et avec les deux systèmes de recyclage FDH et GDH. Les graphiques présentent les résultats en conversion relative, celle sans cosolvant étant fixée à 100 % (Figure 28).

DH2B1 seule en réaction montre une certaine tolérance aux cosolvants. Jusqu’à 20 %, la perte de conversion ne dépasse pas 50 %. Au-delà, la réaction n’a pas lieu, sauf en présence de DMF, où 20% de conversion relative sont maintenus.

En présence du système de recyclage FDH, les conversions relatives obtenues sont plus faibles que sans système de recyclage, respectivement dès 10 et 20 % de DMF et EtOH ou ACN. La tolérance limitée de FDH à ces cosolvants restreint donc leur utilisation à des rapports v/v de 10 % avec EtOH et ACN et 5-10 % avec DMF. Des pourcentages supérieurs (20 % en EtOH) sont par contre possibles avec DH2B1 couplée à la GDH105.

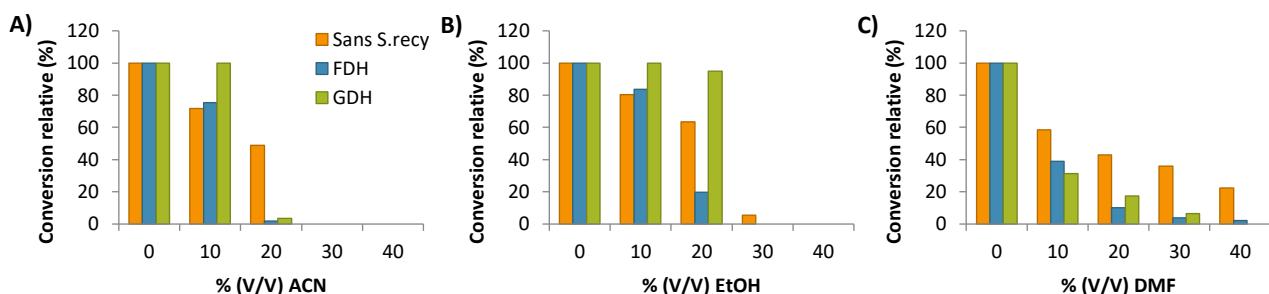


Figure 28 : Conversion relative en 97 en fonction du % (v/v) de cosolvant dans la réaction en présence A) d’ACN, B) d’EtOH, C) de DMF, avec ou sans système de recyclage.

5.2. SOLVANTS NON MISCIBLES A L’EAU

De la même façon que pour les solvants miscibles à l’eau, l’acétate d’éthyle (AcOEt), le n-heptane et le toluène ont été testés en réaction avec DH2B1, avec et sans système de recyclage (FDH uniquement) dans une proportion de 25 % v/v.

Avec ou sans système de recyclage, la conversion n'est quasiment pas affectée par la présence de toluène ou de n-heptane (Figure 29). En revanche, la conversion chute d'au moins 50 % dans le cas de 25 % d'AcOEt.

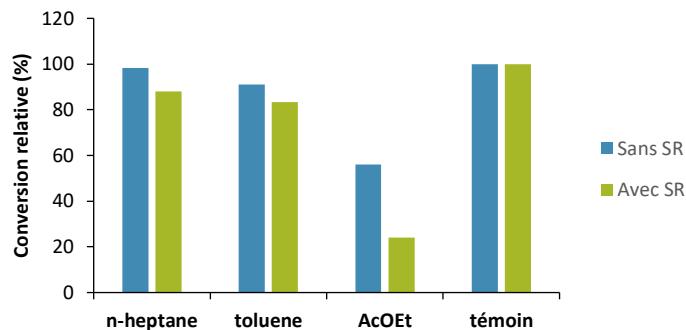


Figure 29 : Conversion relative en 97 en fonction du cosolvant dans la réaction avec ou sans système de recyclage.

6. ANALYSE STRUCTURALE

La connaissance de la structure 3D d'une enzyme présente de multiples avantages, en particulier pour des applications en biocatalyse. Elle permet en premier lieu de définir le site actif. A partir de là, des études mécanistiques peuvent être menées afin d'identifier les résidus impliqués dans la catalyse et dans la fixation du substrat. Outre le fait d'apporter un savoir supplémentaire, ces études ouvrent de nouvelles perspectives de travail. En effet, il est possible par exemple d'élargir le spectre de substrats par mutagénèse dirigée ou encore de rechercher *in silico* de nouvelles enzymes par motif 3D (Zaparucha *et al.*, 2018).

Aucune structure de 2,4-DAPDHs, activité métabolique de DH2B1, n'est à ce jour connue. De plus, il n'existe pas dans la PDB, d'enzymes ayant une séquence suffisamment similaire pour obtenir des résultats fiables par modélisation. Une collaboration avec l'équipe « Structural and applied enzymology » du Pr. Gideon Grogan de l'Université de York a alors été initiée afin d'obtenir la structure cristallographique de DH2B1. J'ai pu, à cette occasion, me rendre sur place une semaine afin de découvrir le processus de résolution structurale par cristallisation (Annexe 6). Parallèlement, un travail de modélisation à l'aide des logiciels iTASSER et ROBETTA (Song *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015) a été mené par Dr Karine Bastard du Laboratoire d'Analyses Bio-informatiques pour la Génomique Et le Métabolisme (LABGeM) de l'unité GM, afin d'aider à la résolution de la structure de DH2B1.

6.1. STRUCTURE GLOBALE

A cause de son faible pourcentage d’identité de séquence avec les autres enzymes de la PDB, la résolution structurale de DH2B1 n’a pas été évidente et des expériences demandant une forte diffraction des cristaux ont été nécessaires. Les modèles générés par le LABGeM ainsi qu’une analyse par gel filtration indiquant le caractère dimérique de la protéine ont également aidé à sa résolution structurale.

Chacun des deux monomères de DH2B1 est constitué d’un domaine Rossman en N-ter (résidus 1-100), et d’un domaine C-ter (résidus 150-335) composé notamment d’un feuillet β de 6 brins (Figure 30). Les deux monomères sont reliés entre eux par l’interaction d’une de leurs hélices α (résidus 141-151) et de leur feuillet β .

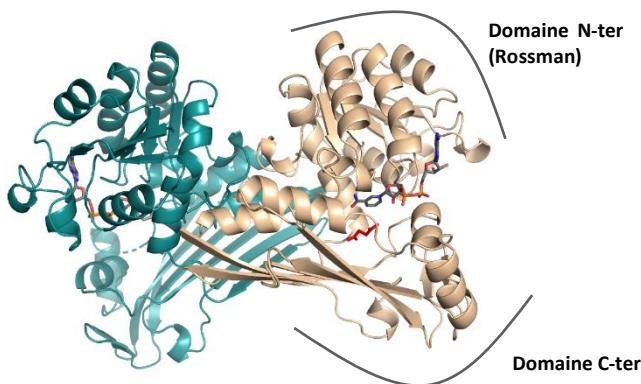


Figure 30 : Structure dimérique de DH2B1.

La structure globale de DH2B1 ressemble fortement à celle des dihydrodipicolinate réductases, annotation automatique de DH2B1 dans UniProt. Même si les domaines Rossman de ces deux familles d’enzymes se superposent effectivement bien, nous remarquons que DH2B1 possède une boucle supplémentaire (résidus 167-195, 226-243) située à proximité du site actif (défini ultérieurement) (Figure 31A).

Une recherche *via* le serveur DALI⁷ (Holm and Laakso, 2016) montre également une similitude de structure entre DH2B1 et les diaminopimelate déshydrogénases (DPDHs), enzymes catalysant la déamination oxydative sélective du méso-2,6-diaminoheptanedioate en L-2-amino-6-oxoheptanedioate (3WYB, 3WB9, 1F06, 3DAP). Les domaines NAD entre ces deux protéines sont plutôt bien conservés, cependant les déviations côté C-ter sont plus importantes, notamment au niveau des régions reliant les brins des feuillets β .

⁷ Le serveur DALI permet de comparer entre elles des structures de protéines cristallisées.

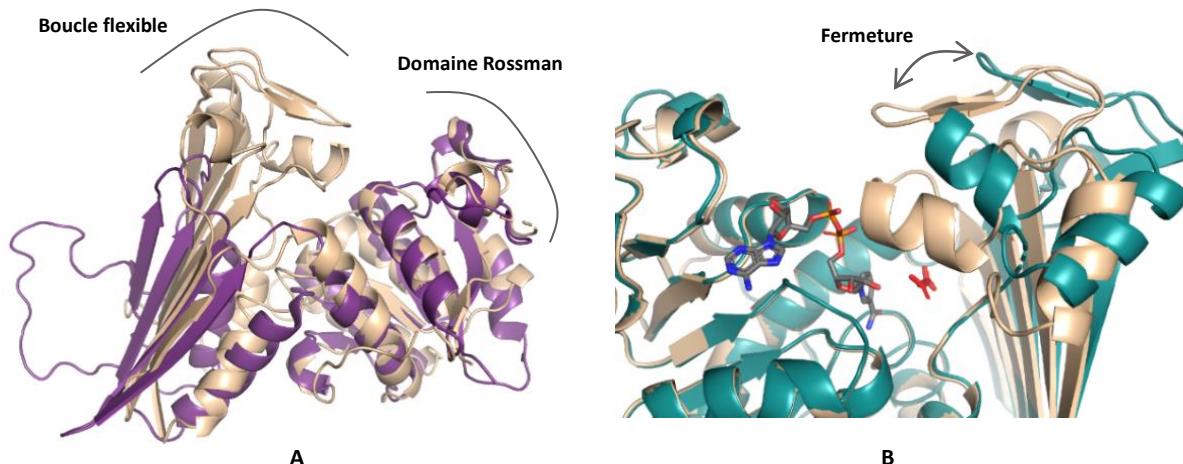


Figure 31 : A) Superposition de la dihydropicollinate réductase 5kt0 (violet) et de DH2B1 (sable). B) Superposition du monomère ouvert (cyan) et du monomère fermé (sable) de DH2B1 co-cristallisée avec le NAD (gris) et l’acide 4-oxopentanoïque (orange) ; rmsd = 2,63 Å.

Par ailleurs, la superposition des deux monomères de DH2B1 montre l’existence de deux conformations : une ouverte et une fermée, dans laquelle la boucle identifiée précédemment est significativement plus proche du site actif (Figure 31B). Une analyse *via* le serveur DynDom⁸ (Girdlestone and Hayward, 2015) montre effectivement une déviation de 29° de cette région et un mouvement de la boucle, qui permettrait alors la fermeture du site actif. Cette hypothèse s’appuie également sur le fait que la conformation fermée est obtenue co-cristallisée avec le substrat. Il est intéressant de noter qu’une telle fermeture a déjà été observée par Liu *et al.* chez les DPDHs. La structure de DH2B1 a été publiée dans la PDB sous les codes 6G1H (monomère ouvert) et 6G1M (monomère fermé).

6.2. SITE ACTIF ET MECANISME REACTIONNEL

Grâce à la co-cristallisation de l’enzyme en présence du cofacteur NAD, il a été possible d’identifier aisément le site actif de DH2B1. Celui-ci est formé par les résidus Glu102, Asn135, Arg161, Asn163, Leu165, Phe168, Val172, Thr175, Gln176, His197, Ile198, His264, Gln266, Gly299 (Figure 32A). Une densité électronique supplémentaire dans la poche catalytique est également visible dans les données de diffraction des rayons X (DRX), mais elle n’est pas suffisante pour déterminer avec exactitude la position du substrat **95**, utilisé lors de la cristallisation. Un placement a tout de même été proposé après docking du substrat métabolique **93** *via* Autodock (Figure 32B) (Morris *et al.*, 2009) et comparaison avec le site actif des DPDHs (Figure 32C) (Liu *et al.*, 2014).

⁸ Le serveur DynDom permet de déterminer les domaines, les axes et les résidus flexibles d’une même protéine lorsque deux conformations existent.

Une première analyse des distances entre résidus et substrat a indiqué que l’His197 et la Gln266 seraient en interaction avec la cétone réactive par l’intermédiaire de liaisons hydrogène (respectivement à 2,8 et 3,4 Å). Les résidus Arg161, Asn163 et His264 stabiliseraient eux la fonction acide carboxylique et Asn135 la fonction amine dans le cas du substrat métabolique **93**, fixant ainsi le substrat dans la poche.

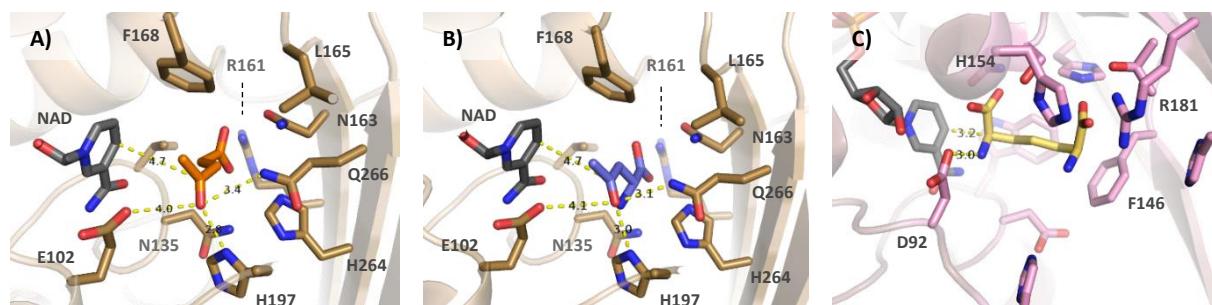


Figure 32 : A) Site actif de DH2B1 contenant l’acide 4-oxopentanoïque (95). B) Site actif de DH2B1 contenant le substrat naturel 93 (docking). C) Site actif des diaminopimelate déshydrogénases (3WBF) contenant l’acide 2,6-diaminoheptanedioïque.

Par analogie avec les DPDHs, nous remarquons que le résidu Asp92 des DPDHs, en interaction avec l’amine de l’acide 2,6-diaminoheptanedioïque, est remplacé dans la structure de DH2B1 par le Glu102. Ce dernier se trouve cependant à une distance de 4,1 Å de la cétone (3,0 Å dans les DPDHs), et ne peut donc pas former de liaison avec elle. Par contre, il pourrait permettre la fixation du NH₃ dans le site actif et ainsi provoquer un rapprochement entre le substrat et le H réactif du NADH, distant de 4,7 Å dans la position actuelle, et donc trop éloigné pour qu’il y ait réaction (3,2 Å dans les DPDHs).

Afin de confirmer ces hypothèses, les trois résidus intervenant potentiellement dans la catalyse puisqu’en interaction avec la cétone réactive (Glu102, His197 et Gln266) ont été mutés en alanine, acide aminé neutre. Ceux probablement impliqués dans la fixation du substrat (Asn135, Arg161, Asn163 et His264) ont quant à eux été remplacés par leur homologue non chargé et de taille équivalente afin de perturber un minimum la forme globale de la poche. Après production et purification de ces mutants par le LCAB, leur activité spécifique a été mesurée pour la réaction d’amination réductrice avec le substrat **93** à température ambiante (Tableau 8).

Tableau 8 : Activité relative des mutants de DH2B1 pour la réaction d’amination réductrice de **93**. Résultats normalisés par rapport à la réaction de DH2B1. rt = température ambiante ; - : activité non détectée.

Activité relative	T (°C)	DH2B1	E102A	H197A	Q266A	N163V	R161M	H264L	N135V
2-amino-4-oxopentanoate (93)	rt	100	0,26	0,05	0,36	0,02	-	0,31	0,04

Les résultats des activités spécifiques confirment l’importance de ces résidus dans la poche catalytique. En effet, toutes chutent considérablement par rapport à DH2B1, avec moins de 0,5 %

d’activité restante. Le mutant R161M ne manifeste même aucune activité résiduelle, ce qui suggère son importance dans la reconnaissance du substrat, comme ce qui a été observé dans les DPDHs.

Pour permettre de proposer un mécanisme réactionnel, les paramètres cinétiques des deux mutants correspondant aux résidus supposés catalytiques, G102A et H197A ont été déterminés (Tableau 9). Q266A ayant été obtenu plus tard, ses paramètres cinétiques n’ont pas été réalisés.

Tableau 9 : Paramètres cinétiques de DH2B1 et des mutants E102A et H197A sur NH₃ et 93.

	DH2B1		E102A		H197A	
	NH ₃	93	NH ₃	93	NH ₃	93
V _{max} (U.mg ⁻¹)	55,8	67,6	4,51	4,01	nc	3,79
k _{cat} (s ⁻¹)	34,3	41,5	2,77	2,46	nc	2,33
K _M (mM)	319,7	0,235	4925,5	0,895	nc	0,0584
k _{cat} /K _M (s ⁻¹ .mM ⁻¹)	0,107	177,0	0,0006	2,75	nc	39,90

Les vitesses maximales obtenues confirment les mesures des activités spécifiques précédemment décrites, avec une chute de plus d’un facteur 15 pour chaque mutant par rapport à DH2B1. Les constantes catalytiques se retrouvent par conséquent elles aussi impactées passant de 41,5 s⁻¹ pour l’enzyme sauvage à 2,5 s⁻¹ environ pour les variants.

Par ailleurs, nous remarquons que les paramètres cinétiques pour le NH₃ sont dans les deux cas les plus impactés. En effet, si pour E102A la saturation en NH₃ est quasiment atteinte et permet d’estimer une efficacité catalytique 170 fois plus faible que pour DH2B1, ce n’est pas le cas pour H197A, pour qui il n’a pas été possible de déterminer les constantes.

Ces résultats appuient l’hypothèse que le résidu Glu102 intervient bien dans la fixation du NH₃ dans le site actif. Au vu de l’impact de la mutation de l’His197 en alanine sur l’affinité du substrat NH₃, cette dernière ne doit probablement pas seulement interagir avec la cétone du substrat, mais plutôt avoir un rôle clé dans la catalyse liée à l’attaque nucléophile de NH₃.

D’autre part, nous constatons que la constante cinétique pour 93 n’est que faiblement affectée par ces mutations, ce qui suggère bien que ces résidus sont plus impliqués dans la catalyse que dans la stabilisation du substrat au sein de la poche.

Ainsi, grâce à ces données cinétiques, aux données cristallographiques et aux mécanismes décrits dans la littérature pour ce type de réaction (AADHs, DPDHs, RedAms), le mécanisme ci-dessous a été proposé pour l’amination réductrice de 93 par DH2B1 (Schéma 59). L’ordre de fixation entre les trois substrats ne peut cependant pas être défini et nécessiterait des études complémentaires.

Le substrat entre dans le site actif et se fixerait en formant des liaisons hydrogènes avec l’Arg161 principalement, mais aussi avec l’His264, Asn163 (acide carboxylique) et l’Asn135 (amine) (étape 1). La Gln266 stabiliserait quant à elle la cétone. Le Glu102 et le NH₄⁺ formeraient entre eux une liaison ionique. Le NH₄⁺ se positionnerait entre le substrat, le Glu102 et l’His197, ce qui permettrait à cette dernière de déprotoner l’ammonium qui réagirait avec le carbonyle du substrat par addition nucléophile (étape 2). L’oxyanion intermédiaire (I) serait protoné par prototropie, l’hémiaminal ainsi formé (II) se déhydraterait par expulsion de l’hydroxyde qui se reprotone en arrachant le proton de l’His197 (étape 3). L’iminium obtenu (III) serait stabilisé par un pont salin avec le Glu102, ce qui provoquerait son léger décalage dans le site actif et permettrait la réduction par le NADH sur la face *ré* de l’iminium, pour former le produit de stéréochimie *S* (étape 4). Le mouvement de la boucle flexible identifié précédemment est supposé avoir lieu lors de la première étape afin de refermer le site actif et se rouvrir lors de la quatrième, mais des expériences complémentaires seraient nécessaires à la validation de cette hypothèse.

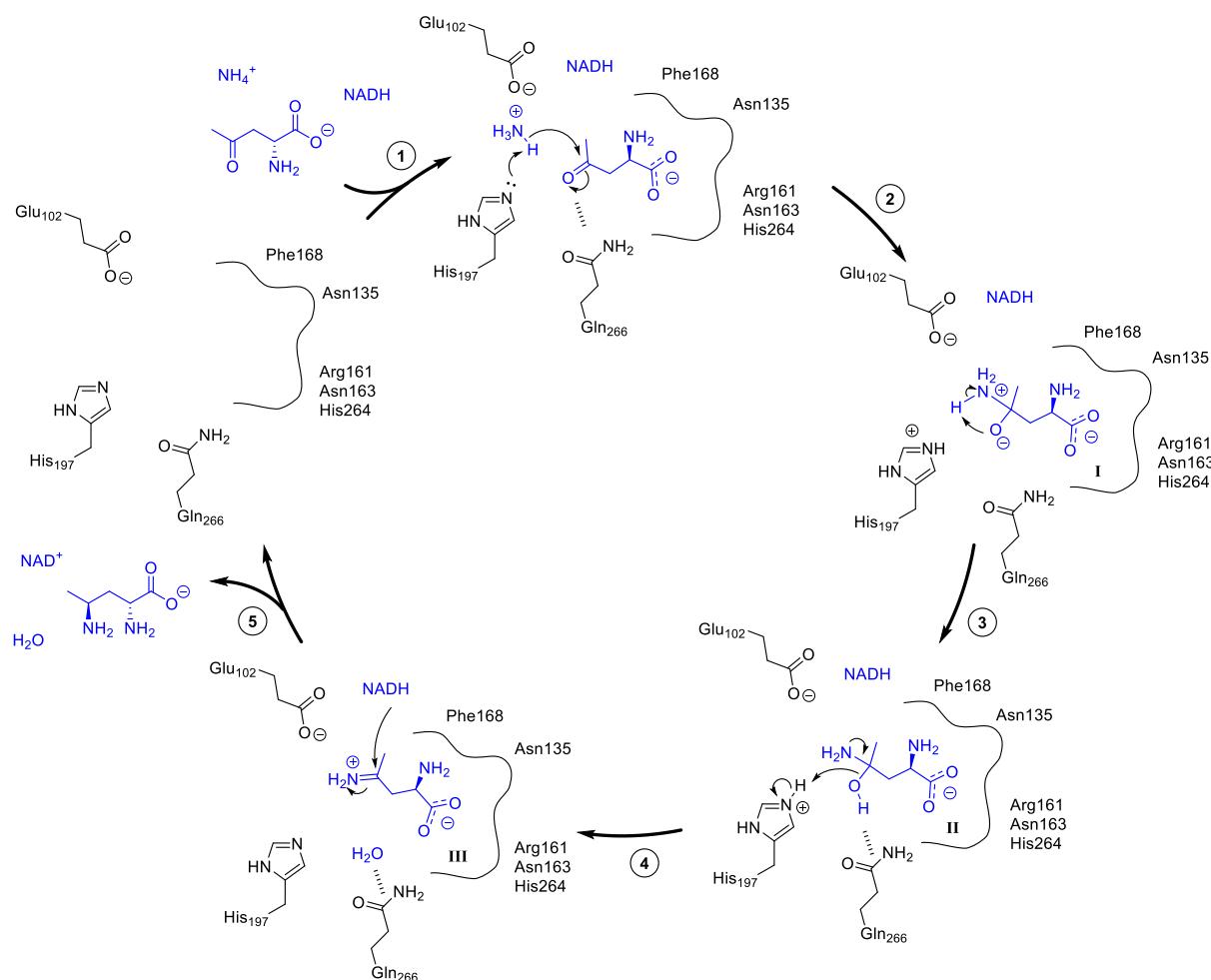


Schéma 59 : Proposition de mécanisme réactionnel pour l’amination réductrice de 93 biocatalysée par DH2B1.

6.3. TRAVAUX PRELIMINAIRES D’INGENIERIE PROTEIQUE

La connaissance du site actif nous a donc permis d’identifier les acides aminés importants pour la catalyse mais aussi ceux intervenant dans la fixation du substrat. Il a alors été possible d’envisager par approche rationnelle, la construction de variants acceptant des substrats à chaîne aliphatique dépourvue de fonction carboxylate, prérequis structural des substrats de DH2B1 (cf. 3.2). Ce travail s’est effectué en parallèle de celui sur l’étude mécanistique, le raisonnement entrepris était donc basé uniquement sur la structure cristallographique de DH2B1 sans donnée d’activité spécifique et de paramètres cinétiques. Le substrat type choisi pour ces premiers travaux d’ingénierie protéique a été la pentan-2-one (**72**), soit l’équivalent structural de **95** sans –CO₂H. Lors du criblage, aucune enzyme n’avait montré d’activité sur ce composé.

Afin de rendre la poche catalytique hydrophobe, les différents résidus supposés impliqués dans des interactions avec la fonction carboxylate ont été mutés isolément ou en combinaison. En plus de ceux exposés précédemment, trois mutants supplémentaires ont été pensés et obtenus par combinaison de ceux déjà produits. D’après la structure cristallographique et les dockings de **93** et **95** (Figure 32), l’Asn163 et l’Arg161 ont été identifiés comme les résidus potentiellement les plus en interaction avec l’acide carboxylique. Le variant contenant cette double mutation a donc été produit, ainsi que le triple mutant N163V/R161M/H264L et le quadruple N135V/N163V/R161M/H264L où les résidus His264 et Asn135 hypothétiquement impliqués dans des interactions avec la partie carboxylate/aminée s’ajoutent successivement.

L’activité de l’enzyme sauvage étant trop faible à TA sur le 4-oxopentanoate (**95**), les activités spécifiques ont été déterminées à 50 °C pour ce substrat et la pentan-2-one (**72**) (Tableau 10).

Tableau 10 : Activité relative des mutants et DH2B1 pour les réactions d’amination réductrice sur **95** et **72**. Pour **95** : activité normalisée par rapport à celle de DH2B1. Pour **72** : activité normalisée par rapport à celle du mutant le plus actif N135V/N163V/R161M/H264L.

Activité relative (mU.mg ⁻¹ enz)	T (°C)	DH2B1	N163V	R161M	H264L	N135V	N163V R161M	N163V, R161M H264L	N135V, N163V R161M, H264L
4-oxopentanone (95)	50	100	17.48	0.32	93.24	1.41	2.01	0.6	0.66
pentan-2-one (72)	50	-	-	23.38	-	-	11.64	14.69	100

Il est intéressant de noter que les mutants multiples ne présentent que peu d’activité sur le substrat **95** contenant une fonction acide. En revanche, une activité devient mesurable à 50 °C sur la pentan-2-one (**72**), avec un maximum pour le quadruple mutant de 105 mU.mg⁻¹. Nous constatons aussi que la seule mutation de l’Arg161 en Met permet d’avoir une activité sur la pentan-2-one (**72**), ce qui confirme l’implication importante de l’Arg161 dans la reconnaissance d’un substrat possédant une fonction carboxylate.

Une modélisation *in silico* du quadruple mutant puis un docking de la pentan-2-one (**72**) ont alors été réalisés par Dr Karine Bastard et montrent un positionnement de ce substrat similaire à ceux précédents (Figure 33). De plus, nous voyons que les mutations réalisées libèrent de l'espace dans la poche catalytique. Il serait donc intéressant de tester des substrats de plus grande taille (chaine carbonée plus longue et/ou substituée).

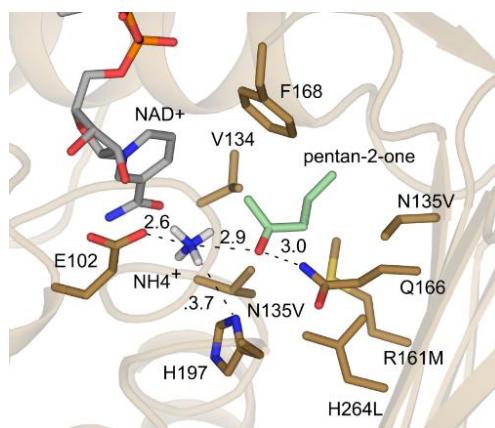


Figure 33 : Site actif du mutant N135V/N163V/R161M/H264L après mutation *in silico* et docking

Afin de confirmer la formation de la pentan-2-amine (**99**), une réaction avec système de recyclage a été réalisée sur la pentan-2-one (**72**) avec le quadruple mutant purifié N135V/N163V/R161M/H264L. Les analyses UHPLC-UV et GC-FID chirale à 48h (détaillées par la suite, cf. III 1.1.1 et 1.1.2.2) ont confirmé la formation stéréosélective de la (2S)-pentan-2-amine (**99**).

Il a donc été possible par approche rationnelle et grâce à la structure cristallographique, de modifier la spécificité de l'enzyme pour les substrats acides, en créant une poche hydrophobe *via* les mutations simultanées N135V/N163V/R161M/H264L, sans altérer la stéréospécificité de l'enzyme. Cependant ce mutant n'est sûrement pas le plus actif, mais constitue sans nul doute un bon point de départ pour de plus amples études.

6.4. MODELISATION

A partir de la structure de DH2B1, et en collaboration avec Dr Karine Bastard, une tentative de modélisation de l'ensemble des enzymes de la plaque DH2 a été réalisée avec Modeller. Seulement environ la moitié des enzymes ont pu être modélisées et se sont avérées être celles ramenées par l'enzyme DH2B8* du set de référence (code Uniprot E3PY99). Les autres protéines de la plaque, sélectionnées dans la biodiversité à partir de l'enzyme Kdd (code Uniprot E3PRJ9) ont des séquences protéiques trop éloignées de DH2B1 pour être modélisées.

Par alignement de séquence, il a été mis en évidence que toutes ces enzymes conservent les deux résidus catalytiques Glu102 et His197 (Tableau 11). A l’exception de DH2C11, les enzymes dont une activité a été détectée lors du criblage sur **93** et/ou **95** possèdent en plus les résidus de fixation du substrat. Par ailleurs, il est apparu que d’autres protéines de la plaque ont également tous les acides aminés identifiés comme importants dans le site actif mais n’étaient pourtant pas ressorties positives sur le 4-oxopentanoate (**95**) (Annexe 3). En superposant leur site actif avec celui de DH2B1 grâce aux modèles générés, nous avons remarqué que 8 d’entre eux étaient parfaitement identiques. Nous avons alors émis l’hypothèse que ces enzymes devaient être actives sur les substrats **93** et **95**. Afin de le confirmer, j’ai effectué la production de l’ensemble de ces enzymes ainsi que leur purification. L’activité de 6 d’entre elles a été mesurée sur **93** et **95**, les deux autres ayant échouées à l’étape de clonage.

Tableau 11 : Comparaison des sites actifs des enzymes modélisées de la plaque DH2 à ceux de DH2B1 cristallisée. Rouge : AmDHs ressorties et confirmées positives lors du criblage spectrophotométrique. Bleu : enzymes possédant tous les résidus importants du site actif identiques à ceux de DH2B1.

Code plaque	Code Uniprot	Résidus DH2B1					
		Glu 102	His 197	Gln 266	Asn 135	Arg 161	Asn 163
DH_2_A5	A3DKP5	98	193	A262	131	157	L 159
DH_2_A7	A6LLG5	114	209	278	147	173	175
DH_2_A8	A7HNJ8	100	195	264	133	159	161
DH_2_A10	A8MGL6	107	202	271	140	166	168
DH_2_B2	B2A1K9	104	199	268	137	163	165
DH_2_B5	D6BCX0	107	202	271	140	166	168
DH_2_B8*	E3PY99	105	200	270	138	164	166
DH_2_B9	H2J4B2	100	195	264	133	159	161
DH_2_B10	J8VJ32	107	202	271	140	166	168
DH_2_C1	A1HNV4	105	199	A 268	138	164	Q 166
DH_2_C5	B8D005	101	196	265	134	160	162
DH_2_C7	C5CDJ7	103	198	267	136	162	164
DH_2_C9	D2RES1	93	184	A 239	126	152	V 154
DH_2_C10	D2Z5Z0	107	202	271	140	166	168
DH_2_C11	D7DCF5	100	195	A 264	133	159	L 161
DH_2_C12	D9RY14	104	199	268	137	163	165
DH_2_D2	F7NI02	106	201	270	139	165	167
DH_2_D4	Q8RAI4	104	199	268	137	163	165
DH_2_D7	A7NN21	103	197	M 266	136	162	V 164
DH_2_D8	B9KZJ1	107	201	M 270	140	166	Q 168
DH_2_D9	C1B6H2	101	195	F 266	134	160	T 162
DH_2_D12	Q5ZOC1	100	194	H 265	133	159	T 161
DH_2_E1	Q6A5I1	107	202	271	140	166	168
DH_2_E10	F2RIU2	101	195	F266	134	160	T 162
DH_2_F2	Q2S1R9	108	202	M271	141	167	V 169
							I 264
							I 264
							I 263
							I 263
							I 269

Comme attendu, toutes ces enzymes se sont révélées être actives sur le 2-amino-4-oxopentanoate (**93**) (Tableau 12). Les fortes activités mesurées (1-18 U.mg⁻¹) ainsi que leur structure 3D très similaire suggèrent que ce sont elles aussi des 2,4-DAPDHs et non des dihydroadipicolinate réductases. De plus, la présence des autres gènes impliqués dans la voie de dégradation de l’ornithine mis en évidence pour *Clostridium sticklandii* ont également été retrouvés en synténie pour ces enzymes, validant alors

l’hypothèse d’une activité DAPDH de ces enzymes (Annexe 7). Comme discutée précédemment, leur mauvaise annotation provient de leur forte similarité au niveau du domaine NAD, et cette erreur semble s’être propagée dans cette famille dans Uniprot. D’autre part, elles sont également toutes actives sur le 4-oxopentanoate (**95**). Cette modélisation et ces tests expérimentaux laissent donc penser que l’ensemble des 2,4-DAPDHs possèdent une activité secondaire sur **95**.

Tableau 12 : Activité spécifique (mU.mg⁻¹ enz) des enzymes modélisées homologues 3D à DH2B1 cristallisée.

Nom usuel	Code Uniprot	Organisme	Annotation	93	95
DH2B1	A9BHL2	<i>Petrotoga mobilis</i>	Dihydrodipicolinate reductase	27 608,0	506,4
DH2A7	A6LLG5	<i>Thermosiphon melanesiensis</i>	Dihydrodipicolinate reductase	2 193,6	258,1
DH2A10	A8MGL6	<i>Alkaliphilus oremlandii</i>	Dihydrodipicolinate reductase	18 542,9	116,3
DH2B9	H2J4B2	<i>Marinitoga piezophila</i>	Uncharacterized protein	3 260,3	311,9
DH2C5	B8D005	<i>Halothermothrix orenii</i>	Dihydrodipicolinate reductase	3 936,4	296,2
DH2C7	C5CDJ7	<i>Kosmotoga oleari</i>	Dihydrodipicolinate reductase	3 289,9	833,7
DH2D2	F7NI02	<i>Acetonema longum</i>	Dihydrodipicolinate reductase	943,3	8,7

7. EVOLUTION DIRIGEE IN VIVO

Afin d’améliorer l’activité AmDH des enzymes issues de ce premier criblage, une évolution dirigée *in vivo* a été envisagée, en collaboration avec Dr Volker Döring et Dr Madeleine Bouzon de L’équipe des Applications (LA) du LBMS de l’unité GM. Cette équipe est spécialisée dans la sélection et construction de microorganismes doués de nouvelles capacités métaboliques.

L’évolution *in vivo* repose sur le principe de l’évolution darwinienne et l’apparition de mutations spontanées dans une population bactérienne. Mise en culture dans des conditions données, cette population est soumise à une pression de sélection par dilutions successives. Ainsi, les cellules ayant acquis des mutations favorisant leur développement dans le milieu se retrouvent majoritaires.

En introduisant une contrainte dans le milieu de culture, il est possible de diriger l’évolution des bactéries, qui vont alors développer des résistances afin de s’adapter au mieux à ce nouvel environnement. Cette stratégie d’évolution peut être appliquée pour améliorer l’activité d’une enzyme cible : en modifiant génétiquement une souche pour rendre sa croissance dépendante de cette activité enzymatique, la bactérie pourra, pour s’adapter, exprimer et évoluer le gène introduit. Une des expériences menées au LA a consisté par exemple à perfectionner des dioxygénases à α-cétoglutarate et fer-dépendantes (α-KAO) (Souterre, 2017). Pour ce faire, une souche d’*E.coli* a été rendue strictement dépendante à l’activité des α-KAO et soumise à des protocoles d’évolution *in vivo*, afin de sélectionner des variants d’expression optimisée sur le substrat naturel mais aussi sur des analogues structuraux.

7.1. PRINCIPE D’EVOLUTION DIRIGEE *IN VIVO* DANS LE GM3

La stratégie d’évolution dirigée *in vivo* au sein du LA s’appuie sur l’utilisation d’un automate de culture, le GM3 (Figure 34), permettant des cultures en continu sur de longues périodes tout en évitant la formation de biofilm, grâce à un système de double chambre (Mutzel *et al.*, 2004). A intervalle de temps régulier, la culture est transvasée d’une chambre à l’autre afin de permettre la destruction par du NaOH 5M de tout biofilm potentiellement formé à l’intérieur (Annexe 8).

Plusieurs paramètres de culture (température, agitation, taux d’oxygène) sont également contrôlables. La croissance bactérienne est suivie en temps réel par mesure de la transmittance ($=1/\text{Absorbance}$). Un système de vannes automatisées permet une dilution des milieux, permettant ainsi de réaliser une évolution dirigée *in vivo* en culture continue. Trois régimes de cultures sont possibles : le chemostat, le turbidostat et le medium swap. Toutes les cultures sont effectuées à volume constant : le même volume de dilution introduit et rejeté.



Figure 34 : Automate de culture, GM3.

7.1.1. Régime chemostat

Le régime chemostat consiste à diluer la culture par apport de milieu neuf à intervalle de temps régulier. Le milieu utilisé comporte tous les éléments nutritifs nécessaires à la croissance en excès, à l’exception d’un qui est limité. Plus les bactéries assimileront rapidement le nutriment en défaut, plus la croissance entre deux dilutions sera rapide : une diminution progressive de la transmittance s’observe donc au cours de l’expérience (Figure 35). La population bactérienne résultante sera alors plus performante dans l’incorporation du nutriment en défaut.

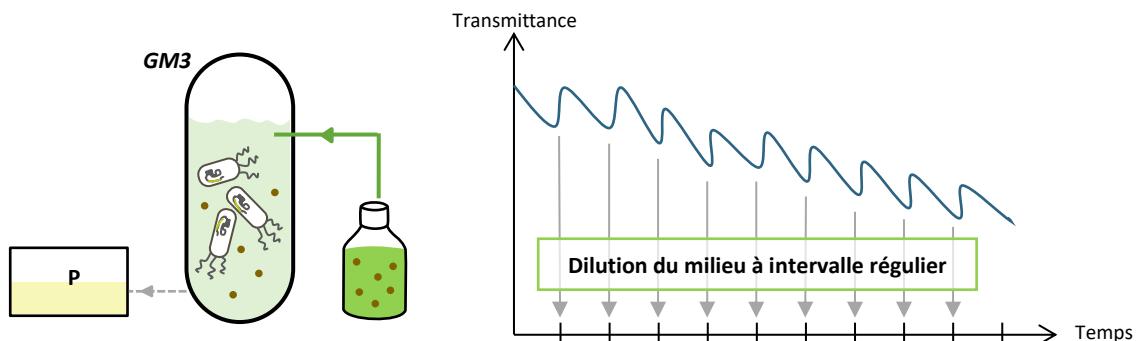


Figure 35 : Principe du régime de culture chemostat dans le GM3. P = poubelle. Adaptée de Souterre 2017, Soutenance de doctorat.

7.1.2. Régime turbidostat

Le turbidostat est plutôt utilisé pour l’adaptation de souches à un milieu de culture donné. Dans ce cas-là, aucun nutriment n’est en défaut et les dilutions s’opèrent en fonction du seuil de croissance fixé par l’expérimentateur : dès que la transmittance mesurée atteint ce seuil, la culture est diluée par l’apport de milieu neuf (Figure 36). Plus les dilutions se rapprochent dans le temps, plus la population bactérienne s’adapte à son milieu de culture.

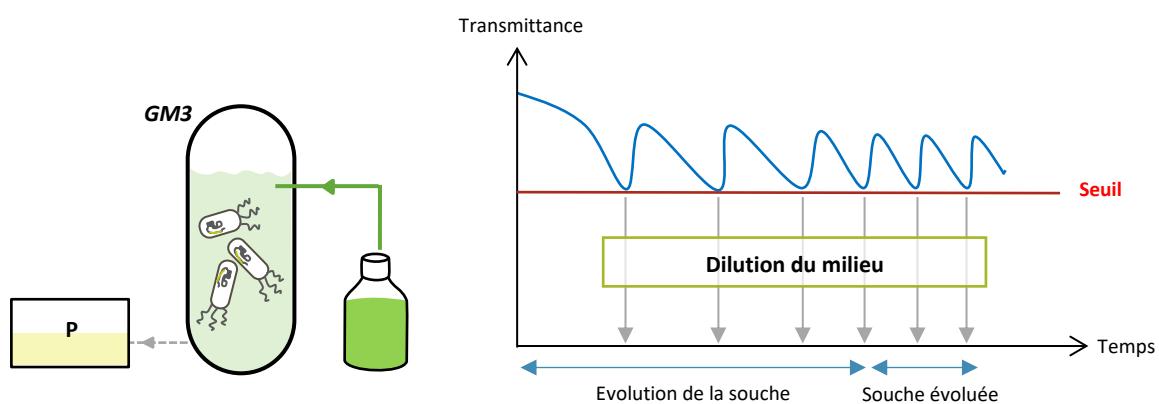


Figure 36 : Principe du régime de culture turbidostat dans le GM3. P = poubelle. Adaptée de Souterre 2017, Soutenance de doctorat.

7.1.3. Régime medium swap

Le régime medium swap est appliqué pour des évolutions plus difficiles et non possible *via* le chemostat ou le turbidostat. Les dilutions se font à intervalle de temps régulier, par alternance de deux milieux :

- Un milieu relaxant permettant une croissance des cellules non adaptées.
- Un milieu stressant introduisant la sélection souhaitée où seules les cellules adaptées peuvent pousser.

Les dilutions ont lieu à intervalle de temps régulier et une valeur seuil de croissance bactérienne est fixée (Figure 37). Si la transmittance mesurée avant la dilution est plus élevée que ce seuil, la culture est diluée par le milieu relaxant. Au contraire, si la transmittance est plus faible, alors la culture est diluée par le milieu stressant. Lorsque la population ne fait plus qu’appel au milieu stressant, cela signifie qu’elle s’est adaptée à ce dernier.

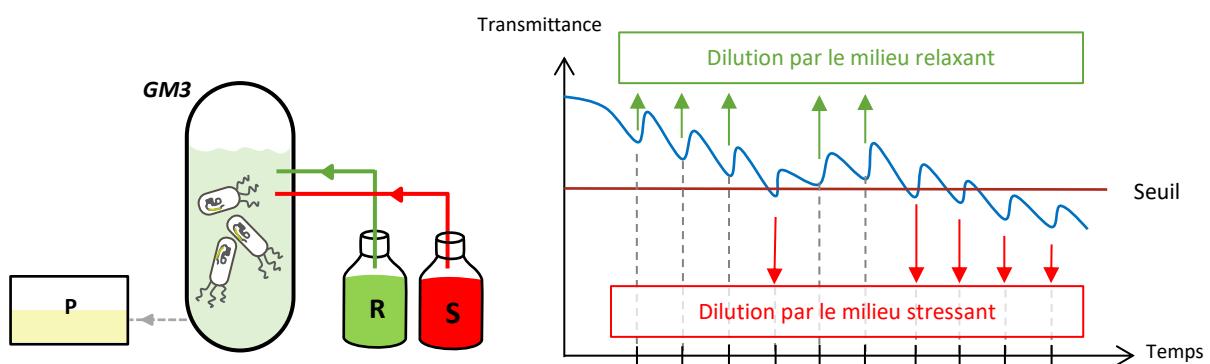


Figure 37 : Principe de culture en régime medium swap dans le GM3. R = milieu relaxant. S = milieu stressant. P = poubelle. Adaptée de Souterre 2017, Soutenance de doctorat.

Généralement, une culture en turbidostat dans le milieu relaxant est réalisée au préalable afin d’habituer la souche et de fixer son temps de génération, duquel va dépendre le volume des dilutions.

Quel que soit le régime appliqué, des prélèvements et sauvegardes de la culture sont effectués dès que cela semble opportun. Des séquençages ADN permettent de repérer les mutations présentes dans les générations prélevées et d’en déduire ainsi les raisons d’adaptation de la souche au milieu de culture imposé.

7.2. MISE EN PLACE DE L’EVOLUTION

Afin d’améliorer l’activité AmDH de nos enzymes par une évolution dirigée *in vivo*, il faut donc rendre une population bactérienne dépendante, pour sa croissance, de cette activité. Après introduction du gène correspondant à une AmDH dans une bactérie *E.coli* adéquate, cette dernière serait ensuite mise en culture dans un milieu sélectif dans lequel elle serait contrainte d’exprimer et de perfectionner l’activité AmDH pour croître.

En considérant la réaction réverse de l’amination réductrice, nous avons alors imaginé un cible de sélection basé sur la libération d’ammoniac, qui serait la seule source d’azote du milieu, nécessaire à la croissance bactérienne (Schéma 60).

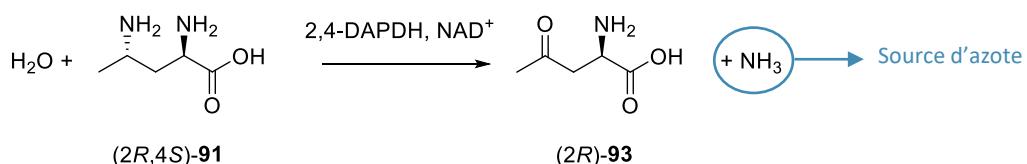


Schéma 60 : Cible de sélection choisi pour la mise en place d’une évolution *in vivo* de l’activité AmDH des 2,4-DAPDHs.

Afin d’avoir une activité suffisante à la température de croissance des bactéries (37°C), cette évolution a été tentée sur l’enzyme DH2B8*, enzyme du set de référence non thermophile.

L’objectif étant d’améliorer l’activité sur le 4-oxopentanoate (**95**), une évolution en régime medium swap a été envisagée, avec une alternance des milieux suivants :

- Milieu relaxant : (2R,4S)-2,4-diaminopentanoate (**91**), substrat naturel de DH2B8*, comme seule source d’azote.
- Milieu stressant : (4S)-aminopentanoate (**97**) comme seule source d’azote.

Comme indiqué précédemment, une première culture en turbidostat dans le milieu relaxant est nécessaire afin que la souche s’acclimate au (2R,4S)-**91** en tant que source d’azote. Par ailleurs, le milieu relaxant doit également contenir le substrat (4S)-**97** cible de l’évolution, pour que la souche s’habitue à la présence de ce dernier.

Des premiers tests microbiologiques portant sur la toxicité des molécules et la viabilité d’une croissance bactérienne avec (2R,4S)-**91** et (4S)-**97** en tant que source d’azote sont indispensables avant de commencer l’évolution à proprement parler. Il a donc fallu synthétiser les substrats (2R,4S)-**91** et (4S)-**97**, ces derniers étant trop chers commercialement. De plus, leur pureté énantiomérique est essentielle, pour ne pas perdre l’énantiosélectivité de l’enzyme au cours de l’expérience.

7.2.1. Synthèse des substrats

Au vu de la grande variabilité du temps d'évolution en fonction des projets, allant de quelques semaines à une année, il est difficile d'estimer la quantité de produit nécessaire à cette expérience. Il a tout de même été évalué, en se basant sur une concentration d'environ 5-10 mM de substrats dans un volume minimal de milieu (2,5-5 L), à 10 g de (4S)-**97** et de 5 g de (2R,4S)-**91**.

7.2.1.1. Synthèse du (4S)-4-aminopentanoate

La synthèse du (4S)-4-aminopentanoate (**97**) a été réalisée grâce à la réaction d'amination réductrice biocatalysée par DH2B1 du 4-oxopentanoate (**95**), dans les conditions optimisées précédemment. En adaptant ces dernières pour une synthèse à plus grande échelle (verreries, agitation ...), 10,6 g de produit pur (4S)-**97** ont été obtenus. Ce travail a été effectué par Aurélie Jouënne, technicienne supérieure dans l'équipe.

7.2.1.2. Synthèse du (2R,4S)-2,4-diaminopentanoate

Le (2R,4S)-**91** a été synthétisé par voie biocatalytique à partir de la D-ornithine (**113**) commerciale en utilisant l'aminomutase PLP et coenzyme B12 dépendante de *Clostridium sticklandii*, découverte au sein de l'unité GM (Fonknechten *et al.*, 2009). Cette enzyme transfère stéréospécifiquement l'amine terminale de l'ornithine (**113**) sur son carbone 4 en créant un centre asymétrique de configuration (*S*) (Schéma 61). Cette synthèse avait déjà été effectuée au laboratoire quelques années auparavant sur une échelle de 52 mg. Elle a alors été réadaptée aux vues des quantités nécessaires ici.

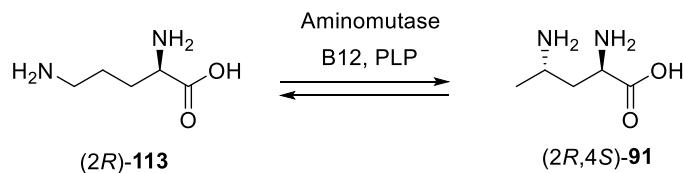


Schéma 61 : Synthèse biocatalysée du (2R,4S)-**91** à partir de la D-ornithine (**113**), par l'aminomutase de *Clostridium sticklandii*.

Cette enzyme fonctionne en condition anaérobre dans le tampon Tris pH 9 contenant du dithiolthréitol (DTT) et de la résazurine (indicateur coloré pour la présence d' O_2). Une rapide optimisation de la synthèse portant sur la concentration initiale en substrat, la température et l'agitation a été réalisée. D'autres tests sur les conditions anaérobies optimales pour la réaction ont révélé qu'une anaérobiose stricte (réaction en boîte à gants) n'était pas obligatoire. Finalement, une conversion maximale de 30 % a été obtenue avec 50 mM de substrat **113**, 50 mM de tampon TRIS contenant 10 mM de DTT et de la résazurine, 3 μ M de vitamine B12, 0,04 mM de PLP et 0,1 mg.mL⁻¹ d'aminomutase, sous atmosphère

d’azote à l’abri de la lumière dans des contenants préalablement mis à l’étuve à 70 °C. La réaction étant équilibrée, une conversion totale n’est pas possible.

Une montée en échelle sur 10 mL de volume réactionnel a permis de mettre au point la méthode de purification du produit puis une réaction sur 792 mg a permis de produire 300 mg de produit, quantité suffisante pour les tests microbiologiques préliminaires. De même que pour le (4S)-4-aminopentanoate (**97**), une production de 3,84 g de produit (2R,4S)-**91** a ensuite été réalisée par Aurélie Jouënné pour la mise en culture dans le GM3.

7.2.2. Tests microbiologiques et mise en culture GM3

Comme évoqué précédemment, il a tout d’abord fallu vérifier la non toxicité des substrats sur *E.coli* sauvage, bactérie hôte pour l’évolution, mais également sur le mutant possédant le gène codant pour DH2B8*, introduit dans *E.coli* via un plasmide (*E.coli* p_{lAmDH}⁺). Un test de toxicité en présence de **91** et **97** de ces deux souches ainsi qu’un test sur leur capacité à utiliser ces substrats en tant que source d’azote ont été réalisés sur culture en milieu riche gélosé MS ou MSN⁻ (milieu déficitaire en source d’azote). Après ensemencement des boîtes de Pétri à partir de préculture liquide et absorption, une perforation circulaire au centre de la gélose est réalisée, puis le produit à tester y est ajouté (Schéma 62). Les boîtes sont mises à l’étuve 48 h puis une lecture visuelle de la formation de colonie permet de conclure l’étude.

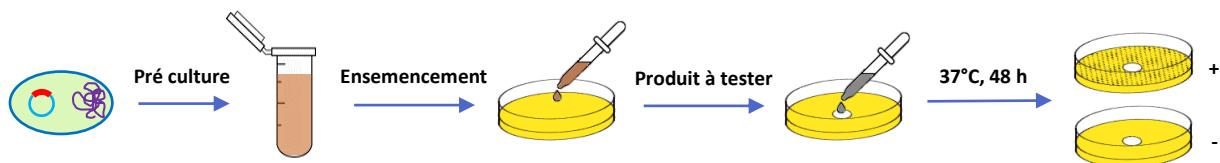


Schéma 62 : Mis en place d’un test microbiologique sur culture solide. + : formation de colonies. - : pas de formation de colonies.

Les tests de toxicité des produits **91** et **97** se sont révélés négatifs, une croissance homogène sur l’ensemble des 4 boîtes est observée. La présence de 0,5 M de (2R,4S)-**91** ou de (4S)-**97** ne perturbe pas la croissance cellulaire (Tableau 13).

Tableau 13 : Résultats des tests de toxicité et de croissance de *E. coli* sauvage et *E.coli* p_{lAmDH}⁺.

	Test de toxicité (milieu MS)		Test de croissance (milieu MSN ⁻)	
	(2R,4S)-91	(4S)-97	(2R,4S)-91	(4S)-97
<i>E.coli</i> sauvage	+	+	-	-
<i>E.coli</i> p _{lAmDH} ⁺	+	+	+	-

Le test de croissance montre quant à lui que le (4S)-**97** n'est source d'azote ni pour le mutant ni pour la souche sauvage. En revanche alors que *E.coli* ne pousse pas avec le (2R,4S)-**91**, le mutant AmDH⁺ lui est capable d'utiliser ce substrat pour fournir l'azote nécessaire à sa croissance. Ce résultat combiné au précédent, montre finalement que l'expérience d'évolution *in vivo* imaginée est alors envisageable.

L'étape suivante, réalisée par le LA, a consisté à identifier dans le métabolisme de *E. coli*, les enzymes susceptibles de muter au cours de l'évolution pour transformer les substrats, au détriment de l'AmDH. Trois gènes ont alors été délétés de la souche sauvage :

- 2 gènes codant pour des transaminases : puuE et gapT
- 1 gène codant pour une diaminoacide oxidase : dadaA

Le gène de DH2B8* a été introduit dans le génome bactérien afin d'éviter la perte éventuelle du plasmide lors de l'évolution.

Enfin, un dernier test de croissance sur boîte de cette nouvelle souche avec le (2R,4S)-**91** a malheureusement révélé que le mutant (G4488) AmDH⁺ ΔpuuE ΔgapT ΔdadaA ne poussait pas. Ceci peut être dû à la différence d'expression entre un gène contenu sur le chromosome et un gène plasmidique. L'expérience a alors été repensée pour conclure finalement à une double évolution :

1. Evolution de la souche G4488 pour qu'elle croisse avec le (2R,4S)-**91** en tant que source d'azote grâce à un régime medium swap dans lequel le milieu relaxant contient du NH₄Cl comme source d'azote, et le milieu stressant le (2R,4S)-**91**.
2. Evolution de la souche obtenue lors de la première étape grâce à un régime medium swap dans lequel le milieu relaxant contient le (2R,4S)-**91** en tant que source d'azote, et le milieu stressant le (4S)-4-aminopentanoate (**97**).

Le principal inconvénient de ce nouveau schéma d'expérience est la nécessité d'une plus grande quantité des deux substrats. L'évolution a tout de même été tentée avec les quantités disponibles (Figure 38). Une courte phase de turbidostat (1 jour) dans le milieu relaxant contenant l'ammoniac comme source d'azote a permis de stabiliser la croissance de la souche G4488. Le régime de culture a ensuite été changé en swap, avec une alternance des dilutions entre le milieu relaxant précédent et le milieu stressant contenant la source d'azote (2R,4S)-**91**. Après 6 jours, l'appel en milieu stressant s'est fait plus fréquent, ce qui suggérait une évolution de la souche. Cependant G4488 ne poussait pas encore totalement avec **91** comme seule source d'azote et des dilutions par le milieu contenant NH₄Cl étaient toujours observées. Les quantités de produit n'étant pas suffisantes pour continuer ce régime d'évolution, un régime turbidostat a été appliqué avec le milieu stressant. Malheureusement, après 2 jours à ce régime, la culture a été perdue.

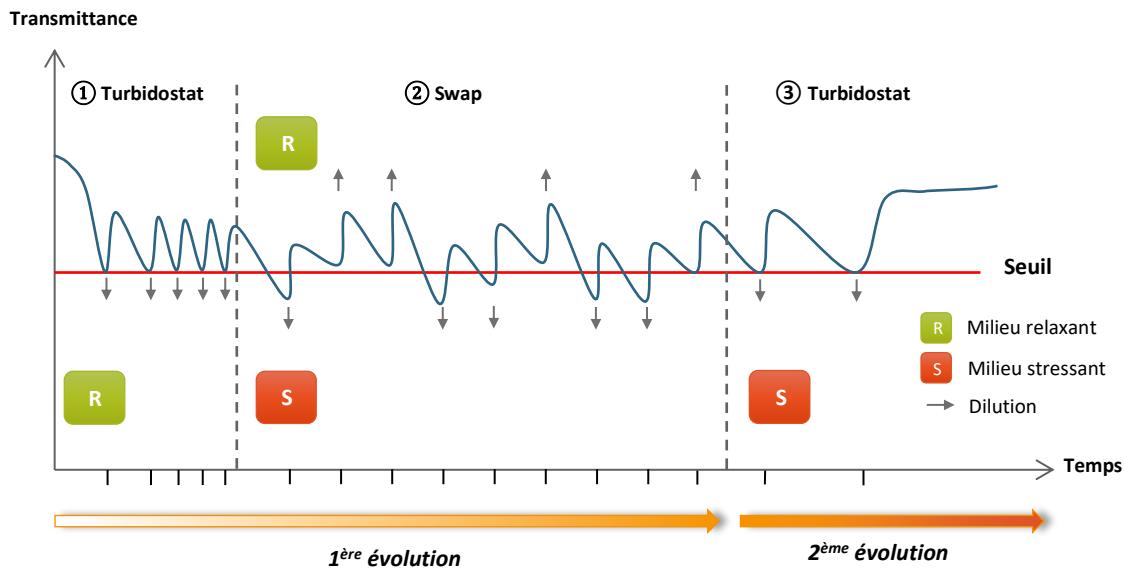


Figure 38 : Evolution de la souche G4488 en culture continue dans le GM3.

Ce volet n'a alors pas été plus développé au cours de ma thèse mais reste néanmoins une approche intéressante qui pourra être poursuivie, particulièrement avec les nouvelles AmDHs découvertes par la suite.

8. CONCLUSION

Le criblage de la biodiversité à partir de seulement deux enzymes de référence a permis d'en découvrir 9 possédant une activité naturelle AmDH. Parmi celles-ci, DH2B1, issue de *Petrotoga mobilis* a été plus amplement étudiée. La détermination des paramètres cinétiques sur **93** et **95** ainsi que l'étude du contexte génomique de cette enzyme nous a permis de mettre en évidence sa fonction métabolique 2,4-DAPDH. Bien que son spectre de substrats se restreigne à des cétones aliphatiques possédant une fonction acide carboxylique, sa tolérance aux fortes concentrations en substrat et ammoniac mais également sa grande stabilité la rendent très intéressante pour des applications biocatalytiques. Après optimisation des conditions réactionnelles, une synthèse de 465 mg de (4S)-4-aminopentanoate (**97**) avec un *ee* > 99,5 %, a permis de prouver l'efficacité du procédé à plus grande échelle.

Grâce aux études cristallographiques de DH2B1, la première structure 2,4-DAPDH a pu être décrite. Un mécanisme réactionnel séquentiel a également été proposé, suite aux mutations des acides aminés catalytiques et de fixation mais aussi par comparaison avec le mécanisme des DPDHs, AADHs et des RedAms. Après des mutations dirigées sur les résidus de positionnement du substrat, des mutants actifs sur la pentan-2-one (**72**) ont été obtenus. Par ailleurs, la modélisation d'une partie des autres protéines

testées lors du criblage a permis d’identifier 6 nouvelles AmDHs. Plusieurs enzymes sont donc désormais disponibles pour des applications en synthèse d’amines chirales.

Chapitre III : Explorations additionnelles de la biodiversité

L'identification et la caractérisation des premières enzymes natives possédant une activité AmDH ont encouragé de nouvelles recherches afin de trouver des AmDHs actives sur des cétones possédant un minimum de contraintes structurales. En effet, comme montré dans le chapitre précédent, les enzymes découvertes sont inactives sur des cétones telles que l'acétophénone (**59**), la cyclohexanone (**61**) ou la pentan-2-one (**72**), un groupement acide carboxylique en position γ ou ω étant un prérequis pour leur activité. Deux stratégies de recherche ont été utilisées : la première fait de nouveau appel à la plateforme du LCAB, en se basant à la fois sur les AmDHs découvertes mais aussi sur d'autres activités répertoriées. La seconde s'effectue par homologie structurale.

Parrallèlement à ces travaux, des nouvelles méthodes analytiques ont été étudiées et/ou développées à la fois pour le suivi de la conversion mais aussi pour la détection des hits lors des criblages.

1. DÉVELOPPEMENTS ANALYTIQUES

1.1. SUIVI DES REACTIONS PAR UHPLC-UV

Les substrats cibles recherchés dans cette deuxième partie étant dépourvus de fonctions acide carboxylique, il a fallu s'assurer que les méthodes utilisées précédemment pour le 4-aminopentanoate (**97**) ou le 2,4-diaminopentanoate (**91**) étaient les plus adaptées. Les premiers essais de dérivation des amines cibles telles que la pentan-2-amine (**99**), la 1-phényléthan-1-amine (**1**) ou la cyclohexylamine (**88**) (Figure 39) avec l'agent DNFB se sont révélés très insatisfaisants. Très peu voire pas d'amine n'était détectée par analyse UHPLC-UV. Il a donc fallu développer de nouvelles méthodes pour le suivi des réactions.

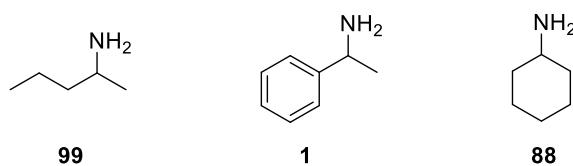


Figure 39 : Structures des substrats cibles pour les nouvelles recherches d'activité AmDH.

1.1.1. Suivi de la conversion

Deux agents de dérivation, le chlorure de fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) et le chlorure de benzoyle (BzCl) ont été testés. Après optimisation des conditions réactionnelles, du protocole et des conditions d'analyses UHPLC-UV sur chacun des substrats (**1**, **88**, **99**), la dérivation au BzCl (**114**)

s'est avérée être la plus appropriée. Comme avec le DNFB, l'amine formée RNH_2 est indirectement détectée *via* l'amide **115** (Schéma 63).

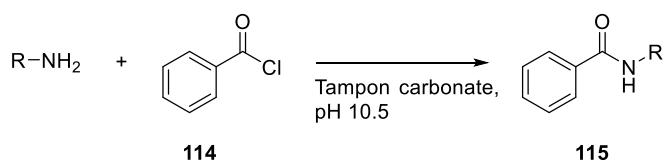


Schéma 63 : Réaction de dérivation au BzCl.

1.1.2. Suivi de l'excès énantiomérique

1.1.2.1. UHPLC-UV

Dans un premier temps, une séparation sur UHPLC après dérivation au FDAA des standards racémiques a été réalisée. Bien qu'une bonne séparation des composés ne soit toujours pas obtenue après optimisation des conditions analytiques, nous avons conservé cette méthode pour une étude rapide des *ee* tout en développant une seconde pour des analyses plus précises.

1.1.2.2. GC-FID chirale

Après recherche dans la littérature, des conditions d'analyse par GC-FID sur colonne chirale ont finalement été choisies. Elles nécessitent une première étape d'extraction de l'amine par un solvant organique et une seconde de dérivation. L'agent de dérivation utilisé dépend de la structure de l'amine à analyser : l'anhydride trifluoroacétique (TFAA) (Richter *et al.*, 2015) et l'anhydride acétique en présence de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) (Knaus, Böhmer, *et al.*, 2017), sont respectivement employés pour les amines cycliques et linéaires (Schéma 64).

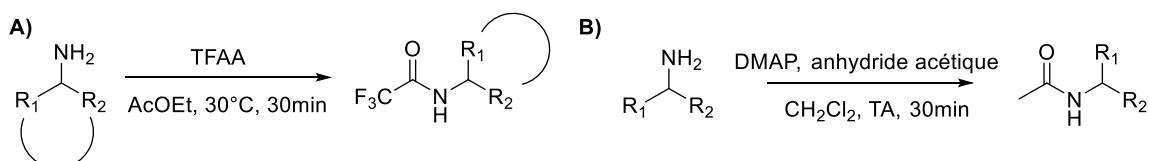


Schéma 64 : A) Réaction de dérivation des amines cycliques au TFAA. B) Réaction de dérivation des amines linéaires à l'anhydride acétique en présence de DMAP.

Certaines amines optiquement pures étant onéreuses ou non disponibles commercialement, l'attribution des énantiomères/diastéréoisomères formés s'est faite par comparaison avec la littérature, la colonne et la méthode utilisées étant identiques.

1.2. TEST DE CRIBLAGE

Au vu de la difficulté d'interprétation des résultats du premier criblage à cause d'un bruit de fond important et des activités relativement faibles, une nouvelle méthode de suivi du criblage a été recherchée. Cette méthode doit être rapide et réalisable en plaque 96 puits. Plusieurs pistes ont été envisagées.

1.2.1. Suivi du NADH par fluorimétrie

Une des solutions considérées a été de suivre la décroissance du NAD(P)H par fluorimétrie, détection potentiellement plus sensible que la spectrophotométrie (Sevillano Cabeza *et al.*, 2003; Lloret *et al.*, 2005). Après avoir mis au point les paramètres du fluorimètre (longueur d'onde d'excitation et d'émission, photomultiplicateur, filtre, bande passante), des essais de réaction ont été effectués sur plaque 96 puits avec l'enzyme DH2C11, active à température ambiante sur le 4-oxopentanoate (**95**). Malheureusement, les résultats obtenus n'ont pas montré une meilleure sensibilité de détection par rapport au suivi spectrophotométrique, les écarts mesurés entre les pentes avec et sans substrat étant faibles (Figure 40). De plus, la méthode développée n'est pas reproductible et n'a donc pas été retenue pour le criblage.

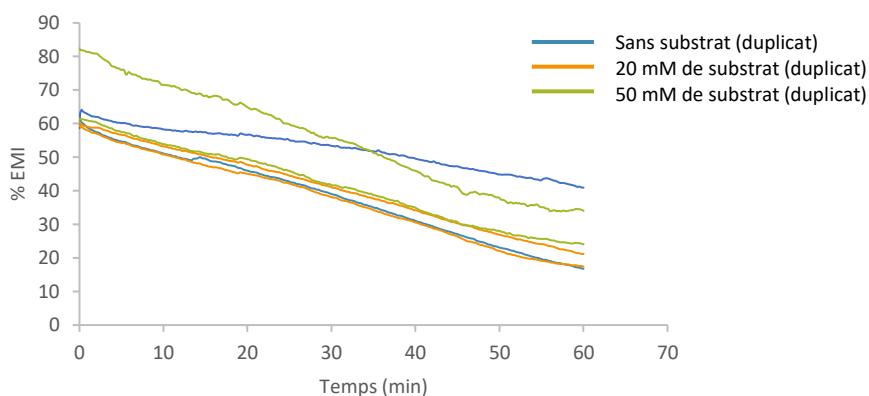


Figure 40 : Suivi spectrofluorimétrique de l'amination réductrice biocatalysée de **95** par DH2C11.

1.2.2. Détection de l'amine formée par fluorimétrie

L'intégration d'un système de recyclage au criblage a également été envisagée, avec une détection de l'amine après des temps de réaction plus long et donc des quantités de produits formés plus importantes.

Après des recherches bibliographiques, la réaction entre l'amine formée et le naphtalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA) (**116**), a été choisie ; le composé **117** étant fluorescent, une

lecture rapide des plaques par fluorimétrie semblait envisageable (Schéma 65) (De Montigny *et al.*, 1987). La détermination d'un hit positif ne se fait pas ici par un suivi cinétique de la réaction, mais par la comparaison de la fluorescence entre une plaque témoin sans substrat et la plaque réactionnelle ($\Delta\%$ EMI), après dérivatisation de chacune au NDA. Cette fluorescence est alors représentative de la quantité d'amine formée.

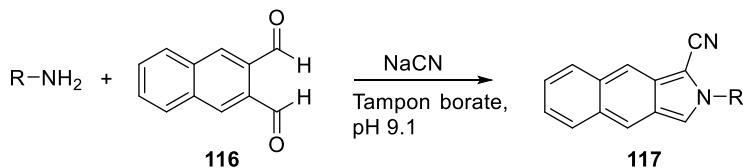


Schéma 65 : Réaction de dérivatisation d'une amine primaire par le NDA (116).

Malgré plusieurs essais portant sur les conditions de dérivatisation et d'analyses plutôt prometteurs avec l'extrait cellulaire clarifié de DH2C11, ($\Delta\%$ EMI = 13 % dans les conditions optimisées), un test sur l'ensemble de la plaque DH2 n'a finalement pas permis la détection des hits. Les composants de l'extrait cellulaire sont certainement en quantité trop inégale pour que les paramètres mis au point conviennent à l'ensemble de la plaque.

Finalement, nous n'avons pas réussi à améliorer la méthode de détection de l'activité cible. Le criblage des nouvelles enzymes candidates a donc été réalisé avec la même méthode que pour la plaque DH2 (cf. II.1.3.1).

2. APPROCHE PAR ANALYSE STRUCTURALE

Une stratégie de recherche de nouvelles AmDHs se basant sur des analyses structurales, a été entamée en collaboration avec Dr Karine Bastard. Au lieu de comparer la séquence primaire d'enzymes références avec celles de la biodiversité, la recherche par « constellation de site actif » prend uniquement en compte leur site catalytique, en définissant un modèle 3D. Ce dernier est ensuite comparé à la base de données New Enzyme Activity Data Base – Known Catalytic and Binding Sites (NEADB-KCBS) créée par le LABGeM et regroupant des sites actifs d'enzymes de fonction connue. Celles possédant ce motif seraient donc susceptibles de posséder l'activité recherchée.

2.1. DEFINITION ET RECHERCHE DU MOTIF 3D

Lorsque nous avons débuté cette étude, la structure de DH2B1 n'était pas encore élucidée. Dans la littérature, les seules enzymes AmDHs étaient obtenues par mutation dirigée des AADHs (Abrahamson

et al., 2012, 2013) dont quelques structures cristallines sont connues. Ces enzymes ont donc constitué le point de départ de la recherche de la constellation du site actif (motif 3D), en supposant une similarité des mécanismes entre AADHs et AmDHs.

A partir des structures cristallographiques des AADHs (code PDB 1LEH, 1OMO, 1BW9, 1C1D)⁹ et par comparaison de leur site actif, il est apparu que les résidus Lys68, Lys80, Asp115, Asp261, Val291 (1LEH) étaient communs à toutes ces enzymes. En s'appuyant sur les travaux de Bommarius, la Lys80 et l'Asp115 ont été identifiés comme les résidus essentiels à l'activité, puisqu'ils interagissent avec le centre réactionnel. La Lys68 et l'Asp261 sont, quant à eux, stabilisateurs de la fonction acide carboxylique. La Val291 est la moins conservée ; la nature du résidu à cette position est enzyme dépendante puisqu'il est en interaction avec la chaîne latérale de l'amino-acide substrat. Cependant, la Val291 a tout de même été incluse dans le motif 3D puisque ce dernier demande un minimum d'acides aminés pour être correctement défini. De plus, Val291 fait partie, comme Lys68 et Asp261, des résidus cibles des mutations dirigées effectuées pour l'obtention de *BsL-AmDH* (Abrahamson *et al.*, 2012).

Grâce au serveur Fit3D¹⁰ (Kaiser *et al.*, 2015, 2016), la constellation du site actif « AADHs » ainsi déterminée a été extraite de la structure de la LeuDH (1LEH) (Figure 41).



Figure 41 : Extraction du motif 3D de la LeuDH (1LEH) via le serveur Fit3D. Les lignes en pointillée représentent les distances entre les résidus en Å.

Une fois le motif extrait, il a été recherché dans la base de données NEADB-KCBS, en imposant certaines contraintes. En effet, pris tel quel, seules des AADHs auraient vraisemblablement été trouvées, alors que notre objectif est d'identifier des AmDHs. Ainsi, les recherches suivantes ont été réalisées :

- Motif « hydrophobe » : le motif 3D est recherché en imposant d'une part la présence de Lys68 et Asp115, résidus catalytiques, mais aussi l'hydrophobicité des résidus non catalytiques en interaction avec la fonction acide carboxylique du substrat (Lys68, Asp261). Ces contraintes éliminent par conséquent la stabilisation de la fonction acide carboxylique tout en conservant celle du centre

⁹ (Baker *et al.*, 1995; Vanhoove *et al.*, 1999; Brunhuber *et al.*, 2000; Seah *et al.*, 2002; Gallagher *et al.*, 2004)

¹⁰ Le serveur Fit3D permet l'extraction de motifs structuraux constitués à partir de résidus clés d'une protéine. (<https://biosciences.hs-mittweida.de/fit3d/home>)

réactionnel. Un filtre sur les enzymes issues de ce premier crible *in silico* est ensuite appliqué afin de conserver uniquement celles possédant un domaine NAD(P). Ainsi, un total de 118 enzymes candidates a été obtenu.

- Motif « catalytique » : pour cette recherche, seule la présence des deux résidus catalytiques est imposée. Lys68, Asp261 et Val291 peuvent donc être substitués par un des 19 autres acides aminés protéinogènes. A la suite du crible de la base de données, deux filtres supplémentaires ont été appliqués aux protéines trouvées. Le premier a permis de sélectionner celles possédant un domaine NAD(P) et le second, de retenir uniquement les enzymes ayant des résidus hydrophobes pour l’ancrage du substrat. Cette recherche a abouti à une liste de 21 protéines, non communes à celles identifiées précédemment.

L’ensemble de ces enzymes sélectionnées (139) a été demandé en production au LCAB et après retrait de celles issues d’organismes eucaryotes, et en fonction de la disponibilité des souches, 51 protéines ont finalement été produites sous forme d’extrait cellulaire clarifié puis criblées par le LCAB.

2.2. CRIBLAGE ET RESULTATS

Les 51 enzymes obtenues ont été criblées sur les substrats présentés en Figure 42, à la fois dans le sens de l’amination réductrice et de la déamination oxydative, lorsque la disponibilité des produits le permettait (cf. II.1.3.1). Cette recherche s’étant basée sur les AADHs et en particulier sur la LeuDH d’où est extrait le motif, la leucine (**69**) et son homologue céto (**70**) ont été intégrés au criblage, ainsi que le substrat 2-méthylpentan-2-amine (**42**) de la *BsL-AmDH* de Bommarius. Deux cétones aliphatiques (**72**, **61**) et un aldéhyde (**118**) classiquement testés pour les activités AmDHs ont également été criblés, avec leur correspondant amine. Enfin, l’absence d’une activité ADHs a été vérifiée sur les trois alcools **120**, **87** et **121**.

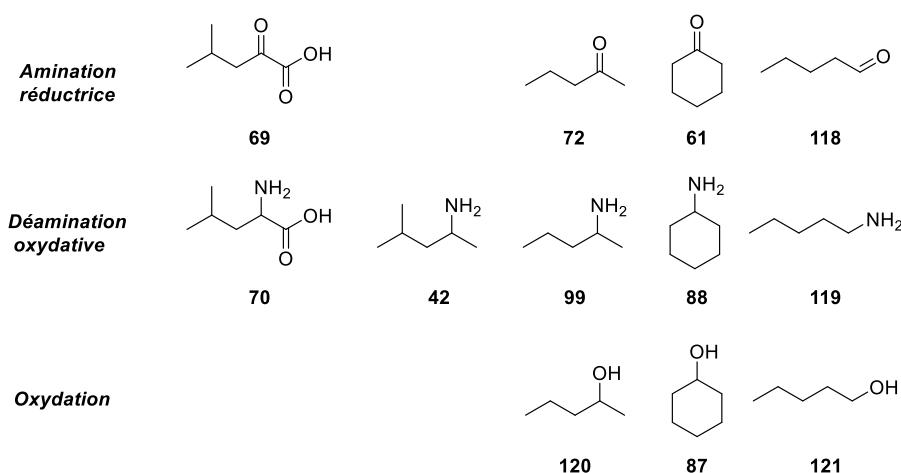


Figure 42 : Substrats criblés sur la plaque générée via une recherche par sous structure 3D.

Cinq enzymes sont ressorties positives de ce criblage : trois d'entre elles sur la pentan-2-one (**72**) et deux sur le pentanal (**118**) dont une active également sur la cyclohexanone (**61**). Il est à noter que les activités mesurées étaient très faibles et absentes sur les amines correspondantes (bruit de fond important dans ce sens réactionnel). Quatre de ces enzymes ont pu être purifiées, mais après vérification de leur activité à la fois par test spectrophotométrique (cf II.2.1.1) et par analyses UHPLC-UV (cf. III.1.1.1) de réactions sur 24-48 h incluant la régénération du cofacteur nicotinamide, aucune des activités n'a été confirmée.

3. APPROCHE PAR COMPARAISON DE SEQUENCES

3.1. ACTIVITE OPINE DESHYDROGENASE

3.1.1. Recherche des gènes des AmDHs naturelles brevetées

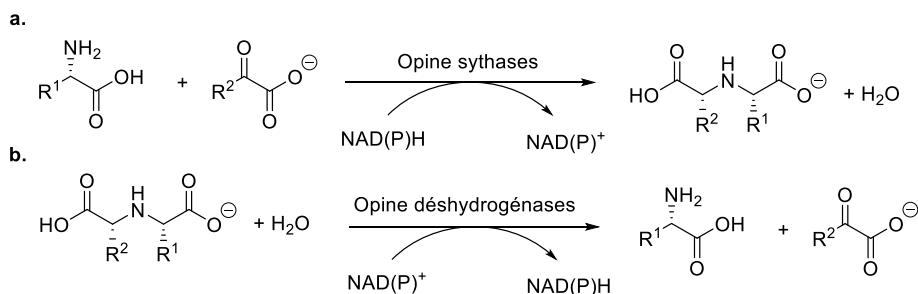
Une des pistes de recherche de nouvelles AmDHs a été l'identification des gènes responsables des activités AmDHs brevetées dans les organismes *Pseudomonas kilonensis* (MCCC¹¹ 1A06062) /*balearica* (CGMCC¹² 8967 B2-9) et *Streptomyces virginiae* (IFO 12827), pour l'instant orphelines de gènes (Itoh *et al.*, 2000; Wang and Fang, 2013; Wang *et al.*, 2016). L'objectif final serait ensuite d'utiliser leur séquence pour explorer de nouveau la biodiversité.

Les génomes des trois souches n'étant pas séquencés, des recherches bibliographiques portant sur des organismes de la même espèce ont été réalisées. Une publication récente du génome partiel de *Pseudomonas kilonensis* (souche 1855-344) décrit notamment la présence d'un cluster de gènes lié au catabolisme de l'octopine, avec l'identification de deux gènes caractéristiques de cette voie, ooxA et ooxB, codant pour des octopines déshydrogénases (Eng *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2015).

Les octopines déshydrogénases font partie de la famille des opine déshydrogénases/synthases (OpDHs/OpSTs). Les OpSTs catalysent l'amination réductrice entre l'amine d'un acide aminé et la cétone d'un céto-acide (pyruvate ou α -cétoglutarate) (Schéma 69). Les OpDHs réalisent, elles, la réaction inverse, soit la déamination oxidative. Il est important de noter que dans cette nomenclature, les opines dites déshydrogénases réalisent en fait le clivage oxydatif du substrat. Bien qu'*in vitro* les OpDHs/OpSTs peuvent catalyser les deux sens réactionnels (Asano *et al.*, 1989), les enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse et de dégradation des opines sont différentes, et une distinction est faite entre les OpSTs et les OpDHs (Watanabe *et al.*, 2015).

¹¹ MCCC = Marine Culture Collection of China

¹² CGMCC = Chinese General Microbiological Culture Collection

Schéma 66 : Réactions catalysées par les opine synthases/déshydrogénases. R² = CH₃ : pyruvate, R² = CH₂CH₂COOH = α-cétoglutamate.

Des OpSTs modifiées par ingénierie protéique ont été utilisées en biocatalyse pour la synthèse d'amines secondaires (Kato *et al.*, 1996). Ces changements ont permis d'étendre l'application à la réaction avec des cétones dépourvues de fonction acide carboxylique en position α avec des amines primaires aliphatiques (Schéma 67) (H. Chen *et al.*, 2015).

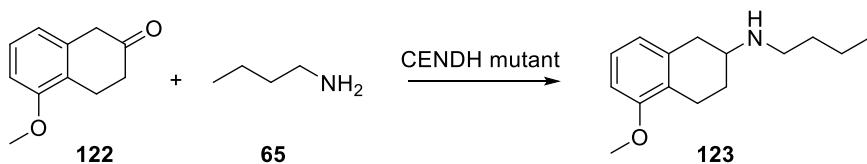


Schéma 67 : Réaction d'amination réductrice biocatalysée par le mutant CENDH.

La présence des gènes ooxA et ooxB dans le génome partiel de *P.kilonensis* (souche 1855-344) ainsi que ces travaux d'ingénierie nous ont fait supposer que l'activité AmDH observée dans les souches brevetées serait une activité secondaire OpST (sens réactionnel d'intérêt).

Nous avons alors recherché dans les bases de données des OpSTs expérimentalement prouvées. Trois enzymes ont ainsi été identifiées, provenant des organismes *Pseudomonas putida*, *Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium vitis*. La comparaison de leur séquence protéique (BLAST) sur le génome partiellement séquencé de *P.kilonensis* (souche 1855-344) mais aussi sur l'ensemble des séquences d'Uniprot n'a finalement montré aucun homologue chez les espèces cibles, *P.kilonensis* et *S. virginiae*.

Les OpDHs décrites pour catalyser la réaction de déamination oxydative ont alors été recherchées dans la littérature. Une seule enzyme expérimentalement prouvée, issue d'*Arthrobacter sp IC* a permis de trouver, après un BLAST sur l'ensemble d'UniProt, 5 enzymes potentielles chez le genre *Pseudomonas*, mais aucune dans l'espèce *kilonensis* considérée ni dans la partie séquencée du génome de *P.kilonensis* (souche 1855-344).

Cette recherche n'ayant finalement pas aboutie, une seconde basée sur l'annotation a été entreprise.

En regardant les annotations des enzymes issues des recherches précédentes par BLAST sans se limiter aux organismes d'intérêt, il est apparu que la majorité des protéines homologues sont référencées en tant que 6-phosphogluconate déshydrogénases, soit de la même manière que la plupart des IREDs. D'autre part, les 5 enzymes repérées dans le genre *Pseudomonas* et similaires en séquence à l'OpDH d'*Arthrobacter sp 1C*, sont elles annotées glycérol-3-phosphate déshydrogénases, annotation de l'IRED active sur NH₃, caractérisée par Weltz *et al* (cf. I.2.6.3.1).

Ces deux annotations ont donc été recherchées dans Uniprot pour les organismes *P.kilonensis* et *S.virginiae*. Un total de 11 enzymes candidates a été trouvé, 9 dans les espèces *P.kilonensis* et 2 pour *S.virginiae*. Leur production a été demandée à la plateforme du LCAB et après clonage et purification de ces enzymes, seules 3 ont pu être obtenues :

- Une glycérol-3-phosphate déshydrogénase (A0A0L8M195) et une 6-phosphogluconate déshydrogénase (A0A0L8N6M2) chez *S.virginiae* (souche DSM 40094).
- Une glycérol-3-phosphate déshydrogénase (A0A0F4XNA3) chez *P.kilonensis* (souche DSM 13647).

Nous avons ensuite testé leur activité sur l'acétophénone (**59**), la pentan-2-one (**72**) et la 3-hexanone (**107**), substrats décrits dans les brevets, avec un suivi spectrophotométrique dans les deux sens de réaction, mais aucune activité n'a été observée. Des réactions sur 48 h suivies en UHPLC-UV sur la pentan-2-one (**72**) et l'acétophénone (**69**) avec différents tampons et systèmes de recyclage n'ont pas non plus conduit à la détection des amines correspondantes.

Notre hypothèse émise pour la recherche des gènes codant pour l'activité AmDH dans les souches brevetées n'ayant pu être vérifiée, une collaboration a été initiée avec S.Wang, co-auteur des brevets sur *P.kilonensis* et *P.balearica*. Diverses souches de *Pseudomonas* incluant celles des brevets mais également des souches très proches ne possédant pas l'activité AmDH, ont été séquencées par le laboratoire de séquençage du Genoscope. Une recherche par approche de génomique comparative est actuellement en cours et pourrait alors permettre de cibler des gènes responsables de l'activité AmDH observée.

3.1.2. Criblage des Opine Déshydrogénases

Pour donner suite au travail de bibliographie effectué, les OpDHs/OpSTs identifiées précédemment ont tout de même été utilisées comme set de référence pour cibler la biodiversité grâce au programme de la plateforme (cf. II.1.1). Une plaque 96 puits de candidats à l'activité, nommée DH14, a été générée avec 89 enzymes qui ont été clonées puis criblées sous forme d'extraits cellulaires clarifiés par spectrophotométrie (cf II.1.3.1) sur les substrats listés en Figure 43.

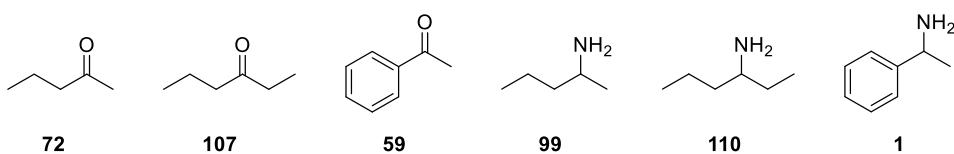


Figure 43 : Substrats choisis pour le criblage des OpDHs.

19 enzymes semblaient ressortir positives sur la 2-pentanamine (**99**) dont 7 également sur la 1-phénylethan-1-amine (**1**), mais les activités observées sont tout de même proche du bruit de fond. Après contrôle des gels lysat et intensité des hits, 8 enzymes ont été purifiées, mais malheureusement, après vérification de l'activité sur **1** et **99** par spectrophotométrie ainsi qu'en réaction dans différentes conditions (tampon et système de recyclage du cofacteur) sur 48 h suivie par UHPLC-UV, aucune n'a été confirmée active.

3.2. CRIBLAGE ACTUALISE DES 2,4-DIAMINOPENTANOATE DESHYDROGENASES

En parallèle de la recherche précédente, une seconde approche génomique basée sur la comparaison de séquences a été menée avec les 2,4-DAPDHs. En effet, nos travaux ayant montré une activité de ces enzymes sur des substrats non α -aminés, utiliser ces dernières dans un nouveau set de référence pourrait permettre d'en découvrir de nouvelles, actives sur des cétones sans pré-requis d'une fonction acide carboxylique dans la structure.

Les 9 enzymes validées lors du premier criblage ont donc été utilisées comme set de référence dans le programme de la plateforme du LCAB. Précisons qu'au moment de cette recherche, les travaux sur l'homologie de sites actifs n'avaient pas été réalisés (cf. II.6.4), la structure de DH2B1 n'ayant pas encore été résolue ; les 6 enzymes découvertes lors de cette étude ne pouvaient donc pas être incluses dans le set de référence.

Après clustering et retrait des protéines ayant déjà été ciblées, une liste de 35 nouvelles enzymes a été établie. Au vu de ce faible nombre de candidats, il a été décidé d'inclure dans le set de référence, les douze 2,4-DAPDHs annotées comme tel dans la base Uniprot, même sans confirmation expérimentale. Après cette seconde recherche et clustering des résultats, un total de 177 enzymes candidates a finalement été produit sous forme d'extraits cellulaires clarifiés en plaques 96 puits (nommées DH12 et DH13) et ciblé sur les substrats listés en Figure 44, incluant **1**, **88**, et **99** pour couvrir une plus grande diversité structurale. Par ailleurs, les criblages précédents ayant montré un bruit de fond trop important dans le sens de l'amination réductrice, celui-ci n'a été réalisé que dans le sens de la déamination oxydative.

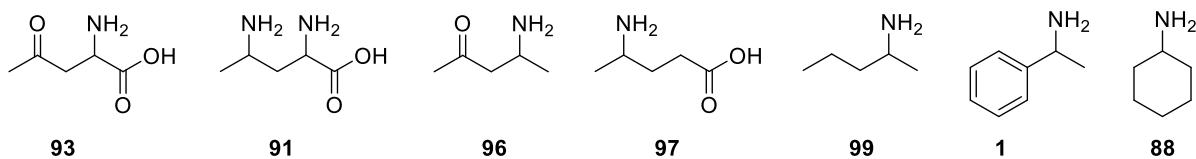


Figure 44 : Substrats choisis pour le criblage des 2,4-DAPDHs.

Sept enzymes ont été identifiées comme actives sur **1**, **99** et **88**, avec pour deux d'entre elles, DH13B5 et DH13F8, des activités ressortant nettement du bruit de fond (Tableau 14). Nous pouvons également noter que seulement trois enzymes ont montré une activité sur les substrats des DAPDHs **93** et **97**.

Tableau 14 : Enzymes et substrats hits du criblage spectrophotométrique des 2,4-DAPDHs. Bleu ciel :hit < 1 mU.mg⁻¹ enz. Bleu foncé : hit > 1 mU.mg⁻¹.

Position	Gene	Fonction	99	1	88
DH12C7	A0A0A5HZK0	Ornithine cyclodeaminase	Light blue bar	Light blue bar	Light blue bar
DH12C12	A0A0E3SJU6	Alanine dehydrogenase	Light blue bar	Medium blue bar	Light blue bar
DH12F3	D2RES0	Alanine dehydrogenase	Light blue bar	Medium blue bar	Light blue bar
DH12G10	G7V7P9	Ornithine cyclodeaminase	Light blue bar	Light blue bar	Light blue bar
DH13B5	A0A0D6I8P6	Dihydrodipicolinate reductase	Light blue bar	Dark blue bar	Dark blue bar
DH13D7	D3R5W5	Dihydrodipicolinate reductase	Light blue bar	Light blue bar	Dark blue bar
DH13F8	S9Q235	Uncharacterized protein	Dark blue bar	Dark blue bar	Dark blue bar

Ces 7 enzymes (à l'exception de DH12C7) ont été purifiées, et l'activité de chacune a été vérifiée dans le sens de l'amination réductrice, par suivi de la cinétique en spectrophotométrie sur chaque substrat cétone correspondant aux hits obtenus lors du criblage. Des réactions sur 48 h avec système de recyclage et suivi UHPLC-UV ont également été réalisées pour contrôler la formation de l'amine. Seules DH13B5 sur **61** et DH13F8 sur **61** et **72** ont été confirmées, soit les hits identifiés comme « forts ». L'absence d'activité sur le 2,4-DAP (**93**) et sur le 4-OP (**95**) de ces deux enzymes suggère que ces AmDHs sont, à l'inverse des 2,4-DAPDHs, hors du contexte de la dégradation de l'ornithine. Ceci s'est confirmé par l'étude de leur contexte génomique, qui n'est pas caractéristique d'une voie métabolique identifiée.

Une rapide étude de ces enzymes a alors été réalisée afin d'ébaucher leur spectre de substrats mais aussi d'établir leur stéréosélectivité. Les cétones testées, présentées Figure 45, se trouvent être toutes substrats. Un suivi UHPLC-UV après dérivatisation au FDAA des réactions avec les cétones prochirales **72**, **107**, **124**, **62**, **126**, **59** a permis de déterminer la forte énantiomériesélectivité de ces deux enzymes. Des conditions GC-FID chirales ont été par la suite mises au point pour les amines correspondantes de **72**, **124** et **62** et ont montré la formation du centre chiral de configuration (*S*). Cette stéréosélectivité différencie donc DH13B5 et DH13F8 des enzymes décrites jusqu'à présent dans la littérature.

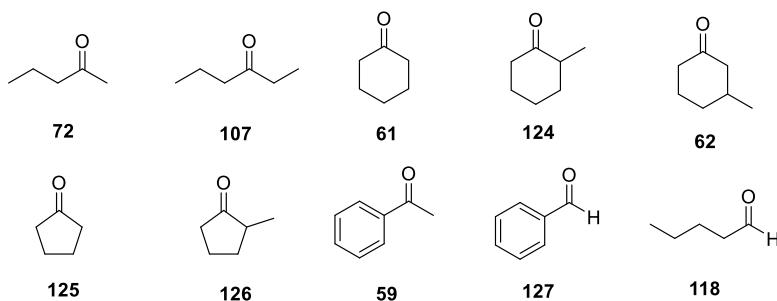


Figure 45 : Substrats testés sur DH13B5 et DH13F8 pour une étude rapide du spectre de substrats de ces enzymes

3.3. HOMOLOGUES AUX AMDHS DECOUVERTES

Afin d'avoir un aperçu rapide de la présence de cette activité AmDH au sein de la biodiversité, des homologues assez proches en séquence ont été listés et testés. Pour cela, un BLAST des séquences protéiques de DH13B5 et DH13F8 sur l'ensemble de la base Uniprot a été réalisé. Etonnamment, cette recherche a montré que nos deux enzymes étaient assez isolées, le pourcentage d'homologie chutant très rapidement. Quatre protéines, nommées dans la suite par leur identifiant Uniprot, ont alors été sélectionnées, purifiées et testées sur la cyclohexanone (**61**) et la pentan-2-one (**72**) (Tableau 15).

Tableau 15 : Identité de séquence des enzymes par rapport à l'homologue et activité spécifique (en $\text{mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ enz) des enzymes homologues de DH13B5 et DH13F8 trouvées après leur BLAST dans Uniprot.

Entrée UniProt	Annotation	Organisme	Homologue	Id. seq. (%)	Activité spécifique	
					61	72
KOUKT5	Dihydrodipicolinate réductase	<i>Mycobacterium vaccae</i>	DH13B5	89,9	75,6	4,4
AOA101AWU7	Dihydrodipicolinate réductase	<i>Mycobacterium sp.</i>	DH13B5	75,6	15,5	nd
C3UMY1	Dihydrodipicolinate réductase	<i>Microbacterium sp.</i>	DH13B5	66,6	59,5	24,5
E3CZE3	Dihydrodipicolinate réductase	<i>Aminomonas paucivorans</i>	DH13F8	58	5,6	nd

K0UKT5 et C3UMY1 ont montré une activité pour les deux substrats testés, avec une préférence marquée pour la cyclohexanone (**61**) et des activités spécifiques respectives de 75,6 et 59,5 mU.mg⁻¹. A0A101AWU7 et E3CZE3 ne transforment quant à elles que la cyclohexanone (**61**).

Au vu de ces résultats, ces 4 enzymes ainsi que DH13B5 et DH13F8 ont fait l'objet d'un dépôt de brevet en juillet 2017 et ont été plus amplement étudiées au laboratoire.

Mes travaux se sont portés plus spécifiquement sur DH13B5 et DH13F8, mais certains ont également concerné C3UMY1, E3CZE3 et K0UKT5 et seront présentés dans la suite de ce manuscrit. A0A101AWU7 a été obtenue plus tardivement et n'a donc pas été incluse dans ces études.

Chapitre IV : Caractérisation et utilisation en synthèse des Amine Déshydrogénases découvertes

Comme évoqué précédemment, DH13B5 et DH13F8 ne possèdent pas de proche homologue dans la biodiversité. Cet « isolement protéique » combiné à l'absence de contexte génomique probant ne nous permet donc pas pour l'instant de présumer de leur fonction métabolique. Une matrice d'identités de séquences entre DH13B5 et DH13F8 avec les AmDHs précédemment trouvées ainsi que les IREDs, RedAms et AADHs, suggère que ces AmDHs découvertes forment un nouveau groupe (Figure 46).

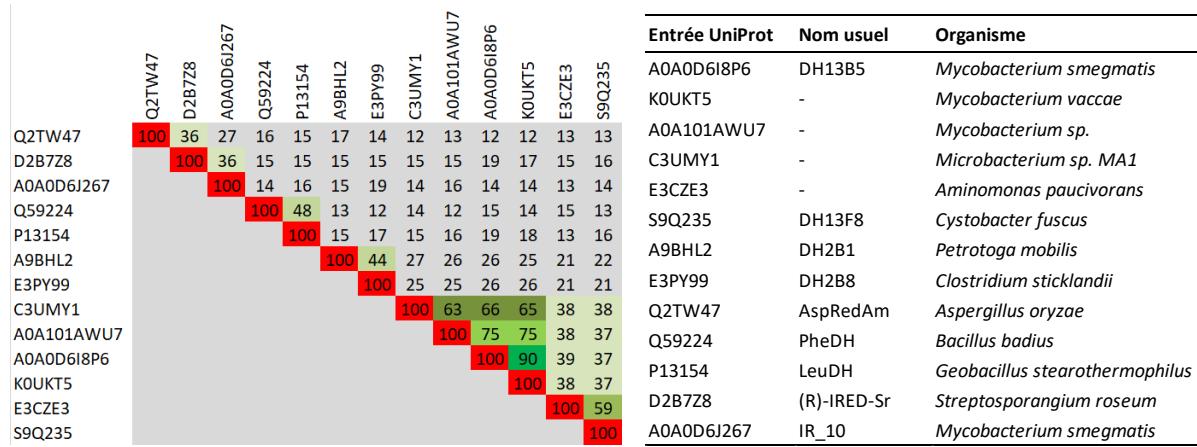


Figure 46 : Matrice d'identités de séquences comprenant les enzymes issues du premier criblage, celles du criblage des 2,4-DAPDHs (DH13) et leurs homologues, deux AADHs et deux IREDs.

Les premiers travaux ont consisté à caractériser ces enzymes à la fois par le calcul de leurs constantes cinétiques mais aussi par la détermination de leur spectre de substrats. Leur utilisation dans des synthèses biocatalysées d'amines chirales a ensuite été optimisée avant une montée en échelle. Dans la continuité de notre collaboration avec Pr Gideon Grogan, la cristallisation de ces enzymes a également été réalisée, permettant alors d'identifier leur site actif et de le comparer à celui de DH2B1.

1. CARACTERISATIONS BIOCHIMIQUES

1.1. SPECTRE DE SUBSTRATS

La caractérisation de ces enzymes a débuté par la détermination de leur profil de substrats carbonylés (cétones et aldéhydes) et aminés. Rappelons que le terme « AmDH » est classiquement employé lorsque l'ammoniac est utilisé comme source d'amine, tandis que le terme RedAm est destiné aux enzymes plutôt actives avec des amines primaires et secondaires.

Ces études ont été faites sur DH13B5, DH13F8, C3UMY1 et E3CZE3, enzymes produites en plus grande quantité (58-113 mg) et purifiées par FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) par la

plateforme de purification du Laboratoire de Génomique et Biochimie du Métabolisme (LGBM) de l'unité GM. A noter que la production de K0UKT5 n'a pas été suffisante pour l'inclure dans ces études.

1.1.1. Substrats carbonylés

Le spectre de substrats carbonylés a été réalisé sur un ensemble de cétones et d'aldéhydes couvrant la plus grande diversité structurale possible, dans la limite des produits disponibles au laboratoire ou aisément accessibles commercialement (Figure 47). Les activités spécifiques ont été calculées par suivi spectrophotométrique sur 42 composés pour la réaction d'amination réductrice avec l'ammoniac. Les deux cofacteurs NADPH et NADH ont été testés dans chaque cas. Les résultats sont présentés dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Activité spécifique ($\text{mU} \cdot \text{mg}^{-1} \text{enz}$) et spectre de substrats de DH13B5, DH13F8, C3UMY1 et E3CZE3 en fonction du cofacteur utilisé.

0  >200 ($\text{mU} \cdot \text{mg}^{-1} \text{enz}$)	Substrat	DH13B5		DH13F8		C3UMY1		E3CZE3	
		NADH	NADPH	NADH	NADPH	NADH	NADPH	NADH	NADPH
Cétones cycliques	61	196	25	136	35	614	389	10	
	124	37	175	11	15	337	253		
	62	38	161	20	37	161	207		
	128	10	85	11	20	60	170		
	129		10						62
	125	2	6	23	24	15			61
	126		63	5	9	32			90
	130		8	8	14				23
	131								
	132		2						64
Cétones à chaîne aliphatique	133		48	2	3			192	
	107		7						28
	72		9	3	6				51
	134								
	73	19	129	70	64	54	246		
Cétones α - β insaturées	135							37	
	136	2	7	2	2	34			
	137	3	8						
Cétones aromatiques	59							12	
	54								
	138								
	139								
Céto indène	140							324	
Cétones aliphatiques fonctionnalisées	96								
	141		178	25	42				
	142		4	3	5				58
	143		10	2	4				11
Cétone acide	144							11	
	145								
	95								
Céto esters	93							89	
	146								
	147		1						
Aldéhydes linéaires	148							130	
	118		27	50	73	0	58		
	149	16	75	232	77	159	98		
	150	119	88	557	43	541	270		51
Aldéhydes aromatiques	151							6	
	127		3						
	152								
	153								

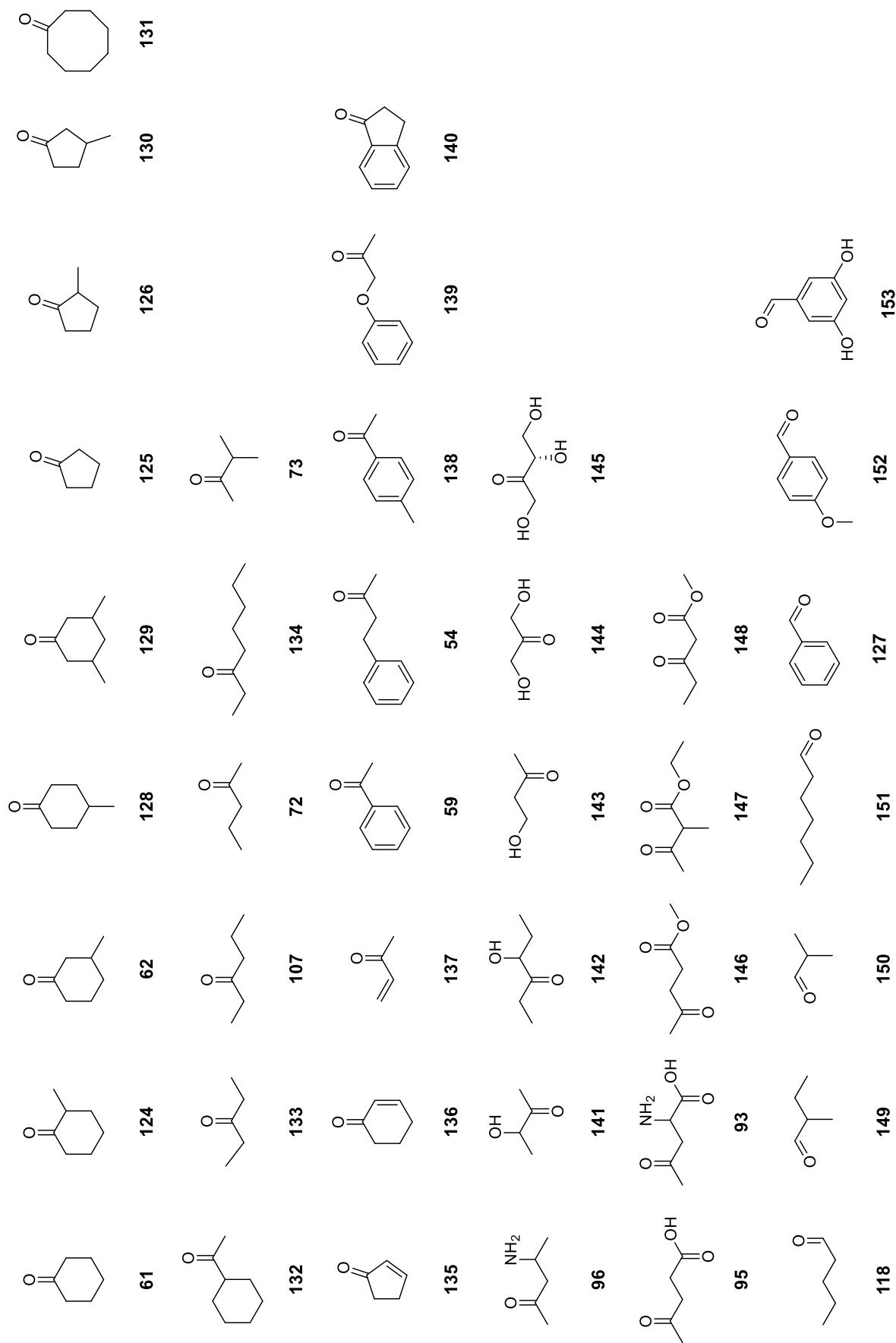


Figure 47 : Substrats testés pour la réaction d'amination réductrice biocatalysée par DH13B5, DH13F8, C3UMY1 ou E3CZE3.

De manière générale, les résultats obtenus montrent que DH13B5, DH13F8 et C3UMY1 possèdent un spectre de substrats similaire, et beaucoup plus étendu que celui de DH2B1. E3CZE3, quant à elle, se distingue des trois autres enzymes, car seulement active sur les aldéhydes (**118**, **149**, **150**) à l'exception de la cyclohexanone (**61**). De plus, alors que DH13B5, DH13F8 et C3UMY1 acceptent les deux cofacteurs nicotinamides, E3CZE3 est exclusivement NADH-dépendante.

Bien que DH13B5 et son homologue C3UMY1 montrent une préférence pour le NADPH, leur activité, ainsi que celle de DH13F8, avec les deux cofacteurs les différencient de celles décrites jusqu'à présent. En effet, les RedAms et les AmDHs obtenues par ingénierie protéique n'acceptent qu'un seul cofacteur. Ceci renforce donc l'idée de la découverte d'une nouvelle classe d'AmDHs. Cette hypothèse s'appuie également sur le fait que les substrats **93** et **95** des 2,4-DAPDHs ne sont plus pris en charge par ces trois nouvelles enzymes.

Parmi les différents substrats testés, les cétones cycliques et les aldéhydes aliphatiques sont préférentiellement transformés par DH13B5, DH13F8 et C3UMY1. DH13B5 et C3UMY1 présentent un maximum d'activité pour la cyclohexanone (**61**) respectivement de 196 et 614 mU.mg⁻¹, alors que DH13F8 atteint 557 mU.mg⁻¹ pour l'isobutyraldéhyde (**150**). Les meilleures activités sont obtenues sur des molécules de petites tailles telles que **141**, **149**, **150** et **73**. DH13B5, DH13F8 et C3UMY1 catalysent également la réaction sur des cétones acycliques comme la pentan-3-one (**133**) (48, 3 et 192 mU.mg⁻¹ respectivement) et la pentan-2-one (**72**) (9, 6 et 51 mU.mg⁻¹). Ces enzymes ne sont en revanche pas actives sur des céto-esters (**146-148**) ou sur des composés aromatiques (**54**, **138-140**, **127**, **152**, **153**), plus volumineux, ce qui suggère une poche catalytique assez restreinte. L'activité importante sur des aldéhydes, en particulier pour DH13F8 et C3UMY1, donne lieu à des applications potentielles pour l'accès à des amines terminales. Ces cibles, non envisagées à l'origine des travaux, n'en restent pas moins intéressantes puisqu'elles sont produites à haut tonnage en chimie (semi)-lourde.

1.1.2. Source d'amines

En plus de l'ammoniac, DH13B5, DH13F8, C3UMY1, K0UKT5 et E3CZE3 ont été testées sur un ensemble d'amines (méthylamine, éthylamine, benzylamine, cyclopentylamine and 3-pentanamine) avec la cyclohexanone (**61**) et l'isobutyraldéhyde (**150**). Seule la méthylamine s'est révélée être substrat des enzymes, mais les activités semblent plus faibles qu'avec l'ammoniac sur le substrat **61** (Tableau 17). Dans le cas de la réaction avec l'isobutyraldéhyde (**150**), les activités sont du même ordre de grandeur, voire supérieures avec C3UMY1. Cependant, les conditions opératoires n'étant pas exactement identiques à l'étude précédente, il est difficile de faire une comparaison directe de ces résultats.

Tableau 17 : Activité spécifique ($\text{mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ enz) de DH13B5, DH13F8, C3UMY1, KOUKT5 et E3CZE3 pour la réaction d'amination réductrice avec la méthylamine sur la cyclohexanone (**61**) ou l'isobutyraldéhyde (**150**).

	DH13B5	C3UMY1	KOUKT5	DH13F8	E3CZE3
Cyclohexanone	61	10.1	90.4	12.6	nd
Isobutyraldéhyde	150	144.5	851.3	262.6	150.2
					30.3

L'activité de ces 5 enzymes envers la méthylamine les différencie de nos précédentes AmDHs et de celles obtenues par ingénierie protéique, uniquement actives avec l'ammoniac. Cependant, la méthylamine étant la seule autre amine acceptée et les activités restant inférieures à celle des RedAms (100 à 400 $\text{mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ pour **61**), l'appellation AmDH a été conservée.

1.2. CATALYSE DE LA FORMATION DE L'IMINE ?

Afin de vérifier que ces enzymes catalysent à la fois la formation de l'imine et sa réduction, une étude de l'activité de C3UMY1 en fonction du pH a été réalisée de façon similaire à celle effectuée par le groupe de Turner sur les RedAms (Aleku *et al.*, 2017). Cette expérience a été menée avec l'isobutyraldéhyde (**150**) puisque la quantité en solution d'une imine issue d'un aldéhyde est plus pH-dépendante que celle des composés cétoniques (Godoy Alcántar *et al.*, 2005). Ainsi, l'effet du pH sur la catalyse sera plus évident.

La Figure 48 montre que pour des pH compris entre 5,9 et 12,4, C3UMY1 conserve au minimum 70 % de son activité. Ceci suggère que l'enzyme n'est pas dépendante de la pré-formation de l'imine

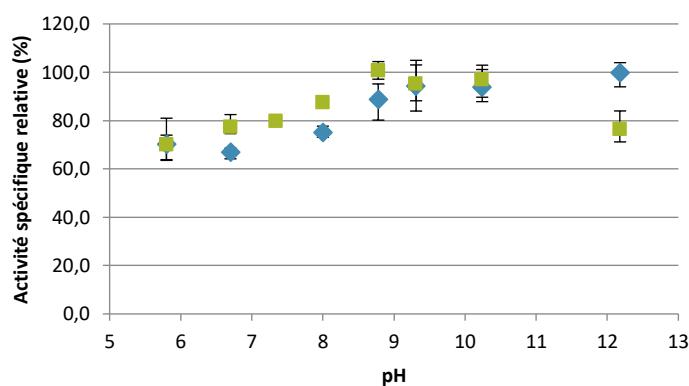


Figure 48 : Activité spécifique relative de C3UMY1 en fonction du pH. Activités spécifiques normalisées par rapport à l'activité la plus forte obtenue. Vert : 2 eq. de MeNH_2 . Bleu : 50 eq. de MeNH_2 .

dans le milieu, favorisée à pH basique. Par ailleurs, l'utilisation de 2 ou 50 équivalents de méthylamine n'affecte pas non plus l'activité de C3UMY1, ce qui renforce l'idée que cette enzyme catalyse à la fois la formation de l'imine et sa réduction. Elle se classe donc bien parmi les AmDHs et non les IREDS.

Par extrapolation et au vu des similarités avec C3UMY1, DH13B5 et DH13F8 ont également été considérées en tant qu'AmDHs.

1.3. PARAMETRES CINETIQUES

Les constantes cinétiques ont été déterminées pour DH13B5, DH13F8 et C3UMY1, pour la réaction d'amination réductrice avec la cyclohexanone (**61**), la 2-méthylcyclohexanone (**124**), ou l'isobutyraldéhyde (**150**) et l'ammoniac ou la méthylamine en tant qu'amine. Comme vu lors de l'étude de leur spectre de substrats carbonylés, les deux cofacteurs sont acceptés par ces enzymes : leurs paramètres cinétiques ont donc été déterminés (Tableau 18).

Les résultats confirment la préférence de DH13B5 et C3UMY1 pour le NADPH et montrent aussi finalement un résultat similaire pour DH13F8, non observée lors de l'établissement du spectre de substrats. Ces trois enzymes possèdent en effet à la fois des K_M plus faibles, traduisant une meilleure affinité, et des efficacités catalytiques plus grandes pour le NADPH. Alors que DH13B5 et DH13F8 sont environ 2,5 fois plus actives avec le NADPH, la différence est encore plus notable pour C3UMY1, où un facteur 4,5 différencie les efficacités catalytiques de ces cofacteurs (NADPH : 27100 s⁻¹.M⁻¹ et NADH : 5920 s⁻¹.M⁻¹). Cependant dans le cas de DH13B5 et DH13F8, le turn over (k_{cat}) est malgré tout plus faible pour le NADPH que pour NADH.

Tableau 18 : Paramètres cinétiques de DH13B5, DH13F8 et C3UMY1. (-) non déterminé ; * Les réactions sont réalisées sur 150 au lieu de 61.

Substrat	DH13B5			DH13F8			C3UMY1		
	k_{cat} (V _{max}) s ⁻¹ (mU.mg ⁻¹ enz)	K_M (S ₅₀) mM	k_{cat}/K_M s ⁻¹ .M ⁻¹	k_{cat} s ⁻¹	K_M mM	k_{cat}/K_M s ⁻¹ .M ⁻¹	k_{cat} s ⁻¹	K_M mM	k_{cat}/K_M s ⁻¹ .M ⁻¹
NADH (61, NH₃)	0,56	0,29	1950	0,093	0,059	1580	2,1*	0,35*	5920*
NH₃ (61, NADH)	(827)	(937)	-	0,097	365	0,26	1,8*	1720*	1,1*
MeNH₂ (150, NADH)	-	-	-	-	-	-	2,86	201	14,2
61 (NADH, NH₃)	(625)	(0,96)	-	0,10	0,54	193	-	-	-
124 (NADH, NH₃)	(343)	(4,1)	-	-	-	-	-	-	-
150 (NADH, NH₃)	(695)	(0,29)	-	0,51	1,76	288	1,5	4,72	308
NADPH (61, NH₃)	0,27	0,056	4740	0,042	0,01	4230	0,59*	0,022*	27100*
NH₃ (61, NADPH)	0,29	392	0,75	0,036	79	0,45	-	-	-
61 (NADPH, NH₃)	0,44	0,23	1930	0,051	0,72	70	-	-	-
124 (NADPH, NH₃)	0,33	0,99	331	-	-	-	-	-	-
150 (NADPH, NH₃)	0,31	0,39	787	(136)	(0,34)	-	-	-	-

Comme constaté avec les autres AmDHs de la littérature, nos trois enzymes possèdent une faible affinité pour l'ammoniac (K_M compris entre 79-1720 mM). Ceci explique la nécessité d'utilisation de fortes concentrations pour employer l'enzyme en conditions saturantes.

Il est également intéressant de noter qu'avec certains substrats, les enzymes suivent une cinétique allostérique plutôt que mickaëlienne, comme observée avec DH2B1. C'est notamment le cas de DH13B5, dès lors que le NADH est utilisé en tant que réducteur.

La détermination des constantes cinétiques nous permet également de comparer les efficacités des enzymes pour les différents substrats testés, et de mettre en évidence les éventuelles inhibitions. Ainsi, nous pouvons par exemple constater que DH13B5 est 5 fois plus efficace sur la cyclohexanone (**61**) que sur son homologue méthylé **124** ($1930 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ contre $331 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$). Par ailleurs, l'augmentation en concentration en substrat **61** et **150** provoque rapidement l'inhibition de DH13B5 (Figure 49).

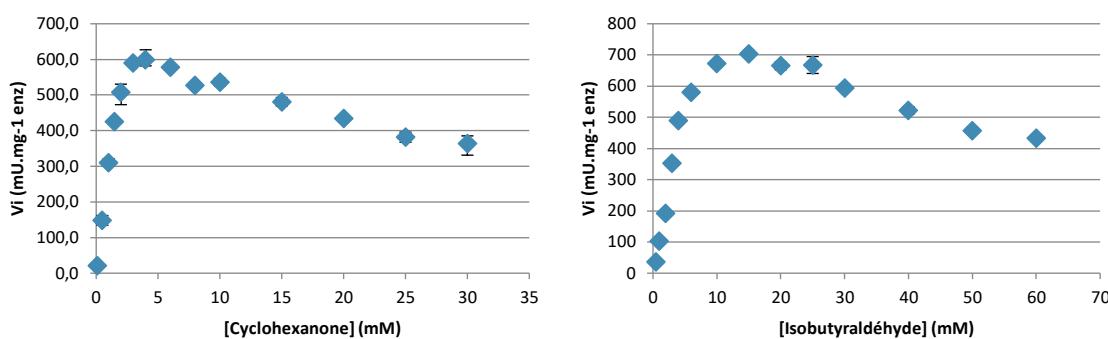


Figure 49 : Inhibition de DH13B5 provoquée par un excès d'isobutyraldéhyde ou de cyclohexanone lors de la réaction d'amination réductrice avec NADPH et NH₃.

Enfin, la détermination des paramètres cinétiques de C3UMY1 confirme la meilleure activité de cette enzyme avec la méthylamine par rapport à l'ammoniac avec des constantes de spécificité respectives de $4,3 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ et $1,1 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. Elle est également plus affine pour ce substrat.

DH13B5, DH13F8 et C3UMY1 n'ont pas des efficacités catalytiques comparables à celles attendues pour une activité métabolique, les valeurs moyennes de k_{cat}/K_M pour les enzymes du métabolisme secondaire étant plutôt de l'ordre de $10^5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ et de 10 s^{-1} pour le k_{cat} (Bar-Even *et al.*, 2011). Nous pouvons donc supposer que les substrats testés ne sont pas métaboliques.

Au vu de ces résultats et de l'éloignement des identités de séquences entre DH13B5/F8 et DH2B1 (respectivement de 26 et 22 %), il nous est apparu intéressant d'essayer d'obtenir les structures de ces deux nouvelles enzymes, elles mêmes peu similaires entre elles (37 %). Comme pour DH2B1, la modélisation de leur structure n'a pas abouti à des résultats concluants, que ce soit par approche *ab initio* ou par comparaison avec des structures connues, dont DH2B1. Dans la continuité de notre collaboration avec Pr Gideon Grogan de l'Université de York, ces enzymes lui ont donc été transmises pour la détermination structurale.

2. STRUCTURES ET MECANISME

La structure de DH13F8 a été obtenue grâce à une expérience aux atomes lourds qui consiste à remplacer les méthionines par des sélénométhionines dans la séquence protéique : en apportant une densité électronique plus importante, elles facilitent ainsi la résolution. DH13B5 a été obtenue dans un second temps, à partir de DH13F8, par remplacement moléculaire. Une co-cristallisation de ces enzymes avec le cofacteur NADP⁺ et la cyclohexanone (**61**) (DH13F8) ou la 2-méthylcyclohexanone (**124**) (DH13B5), nous a permis de définir le site actif de ces enzymes.

2.1. STRUCTURE GENERALE

Comme DH2B1, DH13B5 et DH13F8 montrent une structure dimérique, confirmée par analyse gel filtration analytique réalisée par le LGBM. La partie C-ter de chaque monomère est constituée d'un feuillet β de six brins alors que le côté N-ter forme le domaine Rossmann. La structure quaternaire est obtenue par interaction entre les feuillets des deux monomères (Figure 50A). Ces derniers sont également retrouvés dans deux conformations principales, une ouverte et une fermée, différencierées par la position de la boucle flexible venant cloturer le site actif (résidus 163-180/226-246 (168-185/228-248) pour DH13B5 (DH13F8)). Les structures de DH13B5/F8 et celle de DH2B1 sont finalement très proches (rmsd de 1,77 Å) (Figure 50B).

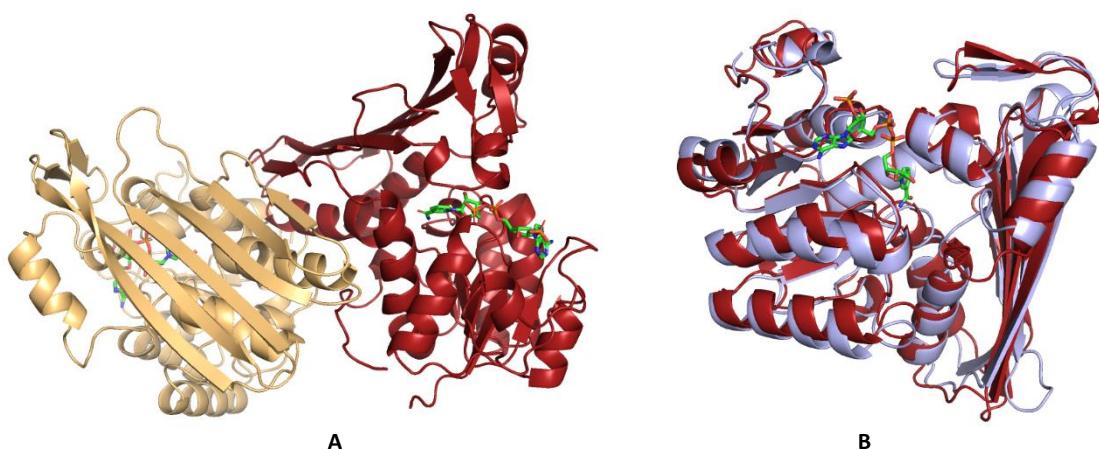


Figure 50 : A) Structure dimérique de DH13B5. B) Superposition d'un monomère de DH2B1 (bleu) et un monomère de DH13B5 (rouge). Vert : NADP.

2.2. SITES ACTIFS

La forme générale de la poche catalytique entre ces deux nouvelles enzymes et DH2B1 est globalement la même, bien que de plus petite taille. En revanche, les résidus la composant sont plus hydrophobes, ce qui explique la divergence des substrats transformés (Figure 51).

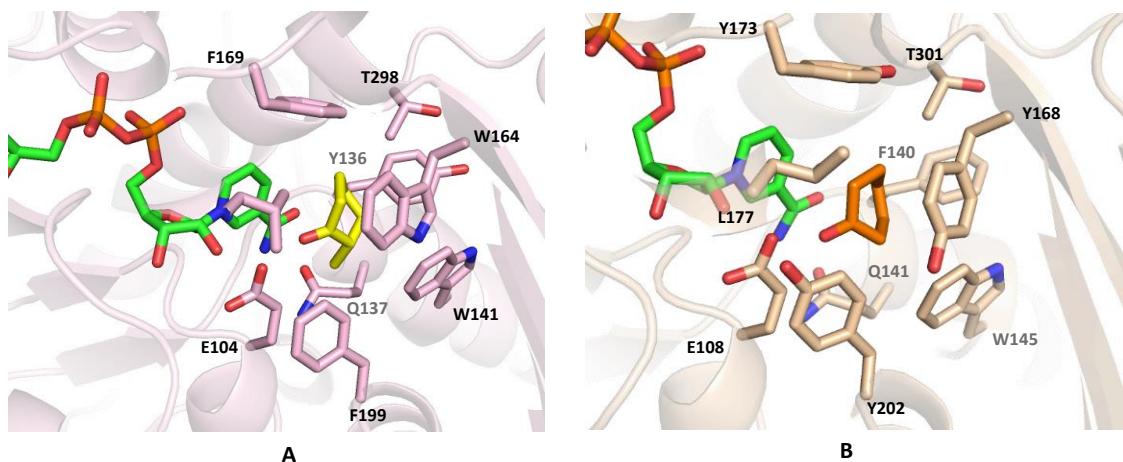


Figure 51 : A) Structure du site actif de DH13B5, vert = NADP, jaune = 2-méthylcyclohexanone (124). B) Structure du site actif de DH13F8, vert = NADP, orange = cyclohexanone (61).

Une des différences remarquables est l'absence de l'Arg161, résidu clé dans la fixation de la partie acide carboxylique des substrats dans DH2B1. L'ancre d'une molécule acide est donc défavorisé, ce qui est en accord avec les résultats des activités spécifiques de DH13B5 et DH13F8, qui ne présentent plus d'activité envers **93** et **95**.

La Glu102 identifiée dans DH2B1 comme étant responsable de la fixation du NH₄⁺ dans la poche, est quant à elle conservée à la fois dans DH13B5 et DH13F8 (Glu104 et 108), ce qui confirme son rôle majeur dans la catalyse. La Gln266, stabilisant le carbonyl réactif est quant à elle, remplacée par une tyrosine en position 168 (DH13F8) ou un tryptophane en position 164 (DH13B5) qui interagissent *via* une liaison hydrogène. La Phe168 de DH2B1 permettant la fermeture du site actif, est retrouvée dans DH13B5 (Phe169) et une tyrosine prend sa place chez DH13F8 (Tyr173). Enfin, l'His197, proposée comme intervenant dans une catalyse acide-base dans DH2B1, n'est pas retrouvée dans ces deux nouvelles enzymes, et aucun résidu à proximité ne semble avoir ce rôle. Son absence dans DH13B5 et DH13F8 pourrait s'expliquer par le plus petit volume de la poche catalytique ne laissant aucune autre possibilité de fixation l'ammoniac.

Par ailleurs, le positionnement du NADP⁺ dans son site de fixation permet de proposer une explication sur la préférence de l'enzyme pour ce cofacteur. En effet, la structure montre que le phosphate va se placer dans une poche spécifique, située en surface de la protéine et constituée des résidus His37, Asn38,

Arg41 (DH13F8) (Figure 52). Ces interactions additionnelles favorisent donc la fixation du NADPH sur l'enzyme, mais ne sont pas essentielles pour l'ancrage du cofacteur. Ceci expliquerait donc les résultats précédents sur la capacité de DH13B5 et DH13F8 à utiliser à la fois le NADH et le NADPH.

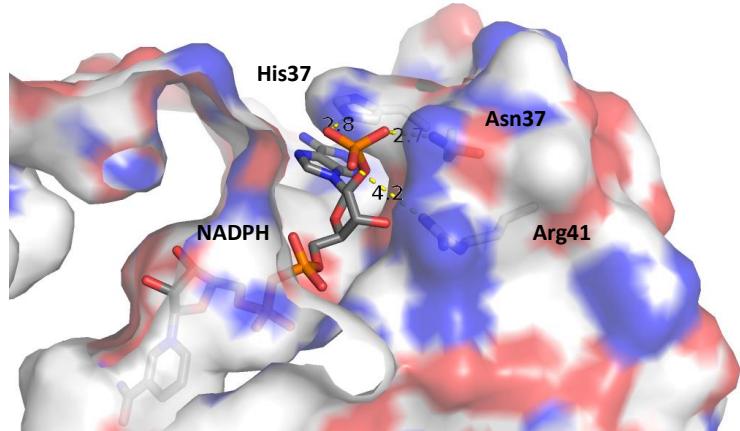


Figure 52 : Fixation du NADP dans DH13F8.

2.3. MECANISME REACTIONNEL

Le mécanisme envisagé dans le cas de DH13B5 et DH13F8 serait le suivant (Schéma 68). Dans un premier temps, le substrat se fixerait par interactions hydrophobes et liaison hydrogène entre le carbonyle et le Trp164 (Tyr168) (étape 1). L'ammoniac serait stabilisé par une interaction ionique avec le Glu104 (108). Ce dernier déprotonnerait l'ammoniac, qui attaquerait alors le carbonyle (étape 2). Par prototropie, l'oxyanion formé **I** se protonnerait (étape 3) pour donner l'intermédiaire hémiaminal **II**. Celui-ci se déshydraterait par départ de l'hydroxyde qui récupérerait alors le proton de le Glu104 (108) pour former une molécule d'eau (étape 4). L'iminium **III**, stabilisé par un pont salin avec le Glu104 (108) serait alors réduit par le NAD(P)H, par attaque de la face *ré* dans le cas d'une cétone prochirale et les produits de la réaction libérés (étape 5).

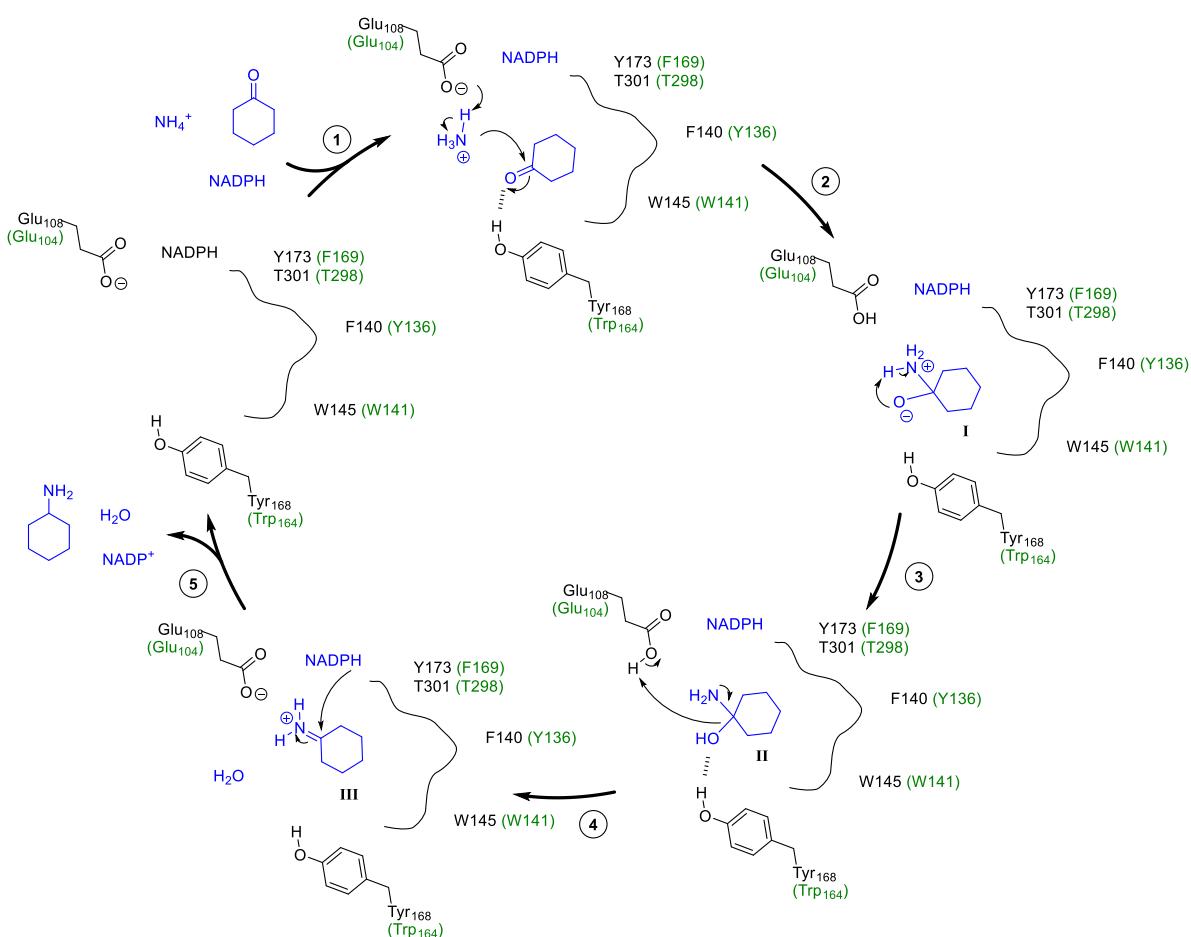


Schéma 68 : Mécanisme réactionnel supposé de DH13B5 (vert) et DH13F8 (noir).

Des modèles *in silico* réalisés par notre collaboratrice Karine Bastard appuient le mécanisme proposé : l'ammoniac se positionne très préférentiellement entre le Glu104 (108) et la cétone du substrat, emplacement idéal pour l'attaque du carbone électrophile (Figure 53). Le mécanisme proposé pour DH2B1 diffère légèrement de celui-ci, en particulier par l'implication de l'His197 pour l'attaque de l'ammoniac. Nous pourrions envisager un mécanisme similaire à celui de DH13B5/DH13F8 pour DH2B1, où l'His197 aurait plutôt un rôle dans la stabilisation de l'ammoniac dans la poche catalytique, de plus grande.

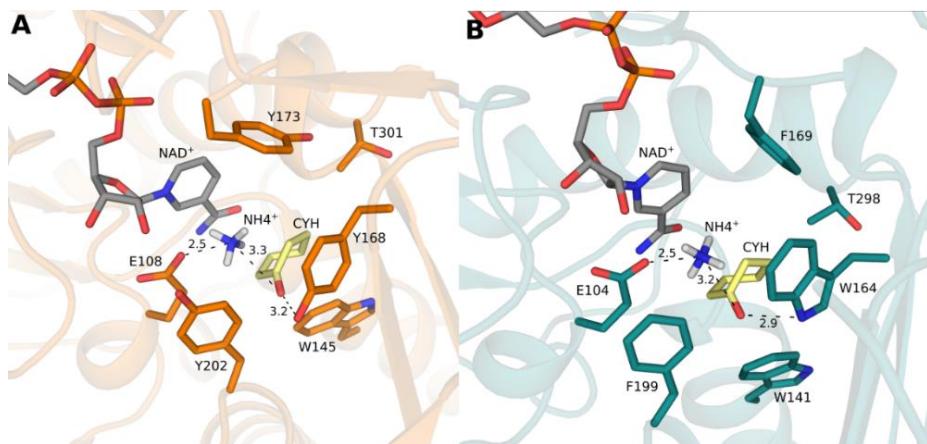


Figure 53 : Modèles des complexes NAD⁺, NH₄⁺, cyclohexanone (61) dans les structures cristallographiques de A) DH13F8. B) DH13B5.

Finalement, bien qu'éloignées en séquence, DH13B5/F8 et DH2B1 possèdent des structures similaires. Le repliement global, la forme du site actif ainsi que la conservation du glutamate 104 (DH13B5), résidu catalytique responsable de la fixation de l'ammoniac, laissent supposer un lien d'évolution entre ces enzymes. Les trois protéines cristallisées ont alors permis de construire, grâce à un important travail de modélisation réalisé par Karine Bastard, un arbre de classification regroupant 2029 protéines en fonction de leur site actif, qu'il reste encore à étudier (cf. publication soumise).

3. EXEMPLES DE TROIS SYNTHESES D'AMINES CHIRALES

Afin de valider l'intérêt biocatalytique des enzymes découvertes, nous avons décidé de réaliser 4 réactions à l'échelle semi-préparative. Les substrats choisis, dérivés de la cyclohexanone (2- et 3-méthylcyclohexanone (**124** et **62**)), cétone aliphatique linéaire (pentan-2-one (**72**)) et aldéhyde (isobutyraldéhyde (**150**))), couvrent les différents types de structures transformées par ces enzymes. La 2- et la 3-méthylcyclohexylamine (**154** et **66**) ont été synthétisées avec DH13B5, la pentan-2-amine (**99**) avec DH13F8 et la *N*,*N*-diméthylpropan-1-amine (**156**) avec C3UMY1 (méthylamine comme substrat

aminé) (Schéma 69). L'optimisation des conditions réactionnelles ainsi que les synthèses ont été effectuées sur **124**, **62** et **72** par moi-même, et sur **150** par mon encadrante de thèse, Dr Carine Vaxelaire. Ce dernier composé n'est donc pas détaillé par la suite.

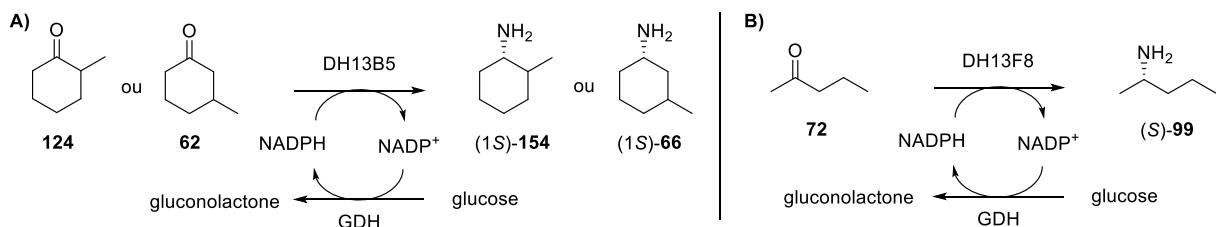


Schéma 69 : A) Réactions d'amination réductrice à optimiser avec DH13B5. B) Réaction d'amination réductrice à optimiser avec DH13F8.

Comme pour DH2B1, l'objectif de ces optimisations est d'atteindre une quantité maximale de produit en 24h de réaction. Elles ont été réalisées sur des réactions à échelle analytique de 100 µL, et les meilleures conditions trouvées lors d'une expérience sont conservées dans la suivante. En se basant sur les travaux déjà effectués sur ces enzymes mais également sur les résultats obtenus avec DH2B1, les conditions de départ pour l'optimisation ont été les suivantes : 100 mM tampon carbonate pH 9, 200 mM NH₄Cl, 0,2 mM NAD(P)H, 10 mM dérivé carbonylé, 0,1 mg.mL⁻¹ AmDH, 3 U.mL⁻¹ GDH, 1,1 équivalent de glucose. Dans les cas de DH13B5, les optimisations, jusqu'à la concentration en enzyme, ont été réalisées seulement sur le substrat **124**.

3.1. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE SYNTHESE

3.1.1. Choix du cofacteur

Malgré une préférence pour le NADPH constatée avec DH13B5 et DH13F8 lors de la détermination des paramètres cinétiques et des activités spécifiques, les deux cofacteurs ont tout de même été testés. En effet, le système de régénération FDH/NADH avec les AmDHs permet une synthèse optimisée, en termes de cosubstrat et coproduit de réaction.

Dans un premier temps, les deux enzymes ont été mises en réaction avec leur substrat et couplées avec la GDH capable de régénérer à la fois le NADH et le NADPH. Dans les deux cas, il apparaît que le cofacteur NADPH permet d'atteindre des conversions plus élevées qu'avec le NADH (Figure 54). Etonnamment, la réaction en présence de NADH ne fonctionne pas. Ce résultat est difficilement explicable, puisque, même si les enzymes sont moins affines avec ce cofacteur, les activités détectées précédemment n'étaient pas négligeables. De plus, la GDH utilisée est plus active avec le NADH que sur le NADPH. Des expériences complémentaires portant sur l'augmentation de la quantité de NADH

et l'utilisation de FDH ont été réalisées, mais les conversions obtenues sont toujours restées autour de 5 %.

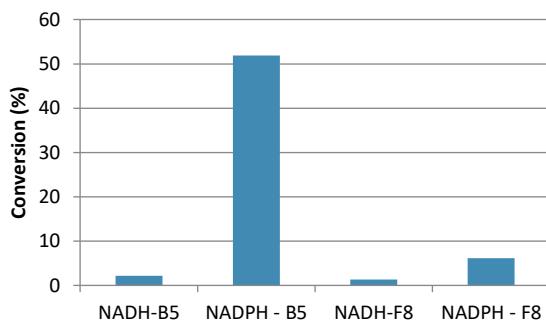


Figure 54 : Conversion (24h) en fonction du cofacteur et de l'enzyme.

Le cofacteur NADPH a donc été conservé pour la suite de l'optimisation pour les enzymes DH13B5 et DH13F8.

3.1.2. Tampon réactionnel

3.1.2.1. Nature du tampon

Etant donnée l'affinité de ces enzymes pour l'ammoniac et des concentrations utilisées dans la réaction avec DH2B1, nous avons supposé qu'une grande quantité de NH₃ allait être nécessaire à la catalyse. En plus du tampon carbonate utilisé jusqu'à présent, seuls les tampons sources d'ammoniac ont alors été testés à iso pH 9 et concentration en NH₃ (200 mM).

D'après les résultats présentés Figure 55A, les conversions obtenues au bout de 24 h sont similaires avec les tampons carbonate, ammoniac et formate d'ammonium avec DH13B5. Dans le cas de DH13F8, malgré une faible transformation du substrat, une préférence pour NH₄Cl/NH₄OH et NH₄COOH/NH₄OH semble se dégager (Figure 55B). Dans les deux cas, le formate d'ammonium a été retenu car il peut être introduit à une plus grande concentration dans les réactions que NH₄Cl/NH₄OH.

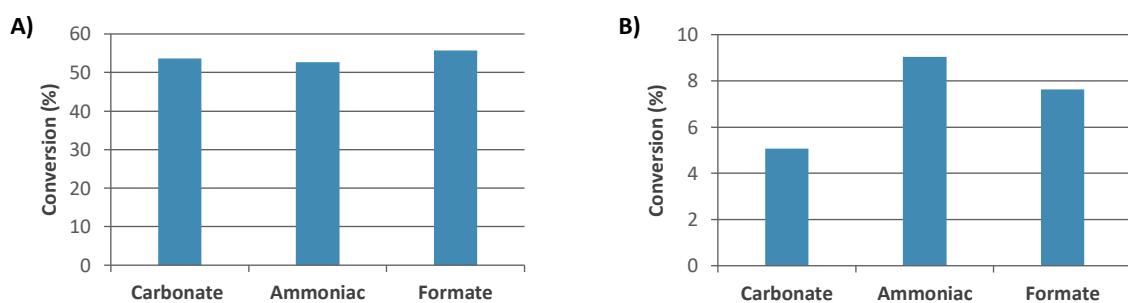


Figure 55 : Conversion (24h) en fonction de la nature du tampon pour la réaction d'amination réductrice biocatalysée de A) 124 par DH13B5. B) 72 par DH13F8.

3.1.2.2. Concentration en tampon

L'augmentation de la concentration en tampon dans la réaction avec DH13B5 est bénéfique jusqu'à 1 M, avec une conversion de 80 % atteinte en 48 h (Figure 56A). Au-delà, une baisse de la quantité d'amine dans le milieu est observée ce qui suggère une inhibition de l'enzyme.

En ce qui concerne la synthèse de la pentan-2-amine (**99**) par DH13F8, plus la concentration en ammoniac est forte, plus la conversion augmente, la meilleure obtenue étant de 54 % en 48 h avec 2 M de tampon (Figure 56B).

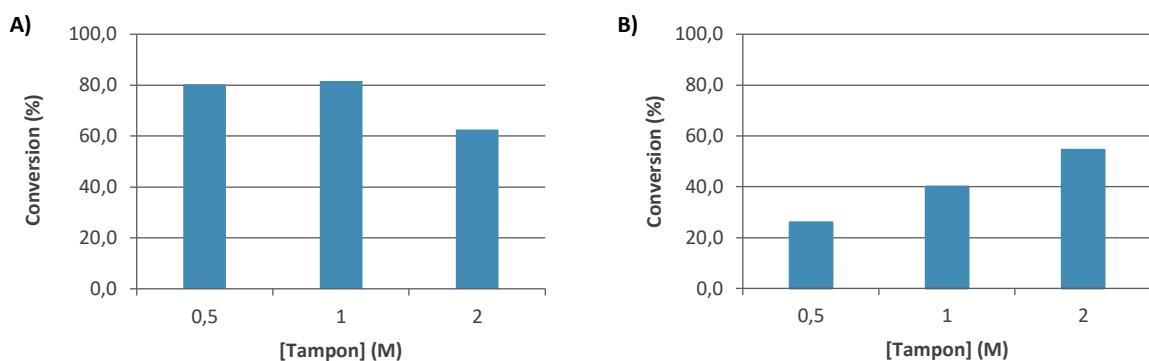


Figure 56 : Conversion (48h) en fonction de la concentration en tampon pour la réaction d'amination réductrice biocatalysée de A) 124 par DH13B5. B) 72 par DH13F8.

Une concentration de 1 M en tampon formate d'ammonium a donc été maintenue pour la réaction de DH13B5 sur la 2-méthylcyclohexanone (**124**) et de 2 M avec DH13F8 sur la pentan-2-one (**72**).

3.1.3. Concentration en substrat

Comme évoqué lors de l'optimisation de DH2B1, l'augmentation de la concentration en substrat entraîne généralement une baisse de la conversion. Par ailleurs, dans le cas présent, le système de recyclage GDH utilisé peut également gêner la catalyse, par l'apport nécessaire d'au moins un équivalent de glucose. Les solubilités dans l'eau de la 2-méthylcyclohexanone (**124**) et de la pentan-2-one (**72**) ne nous ont pas permis de tester des concentrations initiales supérieures à 50 et 200 mM respectivement. L'utilisation de cosolvant n'a pas été considérée dans cette étude mais devrait être envisagée dans des travaux futurs.

Bien qu'une conversion quasi-totale soit atteinte avec 10 mM de **124**, une concentration initiale de 50 mM permet de former trois fois plus d'amine dans le milieu pour un même temps de réaction tout en conservant une conversion de plus de 65 % (Figure 57A).

Dans le cas de DH13F8, l'augmentation de la concentration en cétone permet une hausse de la quantité d'amine formée jusqu'à 50 mM (Figure 57B). Au-delà de cette valeur, une chute de la conversion est observée, et de moins en moins de pentan-2-one (**72**) est transformée.

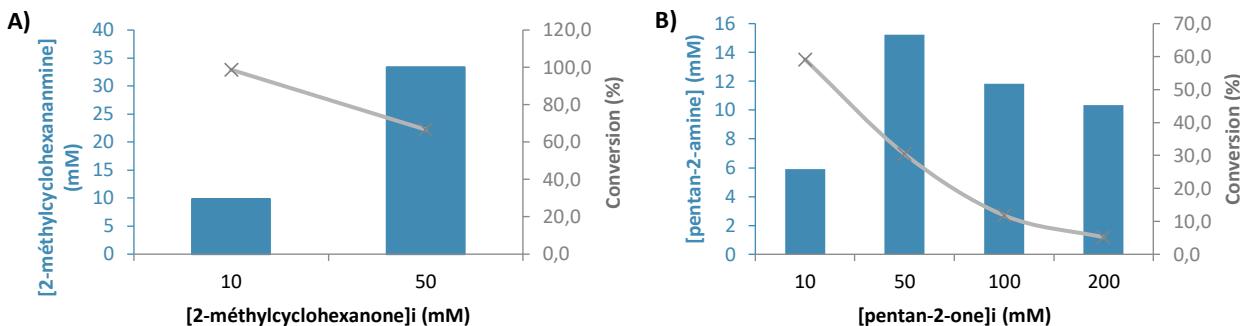


Figure 57 : Conversion (48h) et concentration d'amine formée en fonction de la concentration initiale en A) 124. B) 72.

La concentration initiale en substrat de 50 mM a donc été retenue pour les deux réactions, ce qui est dix fois moins que celle atteinte avec DH2B1 (0,5 M). A ce stade de l'étude, il n'est pas évident de conclure sur les raisons exactes de cette diminution d'activité pour des concentrations supérieures à 50 mM, mais ce résultat reste logique par rapport aux valeurs des paramètres cinétiques pour DH13B5. En effet, alors que la constante de demi-saturation de DH2B1 pour l'acide 4-oxopentanoïque (**95**) s'élève à 235 mM, celle de DH13B5 pour **124** est atteinte dès 0,99 mM. Une inhibition par excès de substrat peut donc être légitimement supposée, puisqu'une concentration de plus de 50 fois supérieure au K_M de DH13B5 est utilisée dans les réactions. Par comparaison, un facteur 2 seulement sépare le S_{50} de DH2B1 et la concentration de **95** introduite. De plus, une inhibition par le substrat a été observée avec la cyclohexanone (**61**) et l'isobutyraldéhyde (**150**) lors de la détermination des paramètres cinétiques où une baisse d'activité a été constatée au-delà de 5 et 20 mM respectivement (cf. IV.1.3). Par ailleurs, ces inhibitions sont également souvent décrites avec les amines déshydrogénases de la littérature (cf. I.3).

3.1.4. Concentration en enzymes

A partir de cette étape, la réaction sur la 3-méthylcyclohexanone (**62**) a été également étudiée, en partant des conditions réactionnelles déterminées jusqu'alors pour la 2-méthylcyclohexanone (**124**).

Une première analyse sur la quantité de GDH et de glucose a permis de s'assurer que ces deux paramètres n'étaient pas limitants dans les trois réactions considérées. Dans un second temps, la quantité d'AmDH a été ajustée sur une gamme allant de 0,1 à 0,5 mg.mL⁻¹, l'objectif étant d'utiliser le moins d'enzymes possible tout en maintenant les conversions.

3.1.4.1. Réactions avec DH13B5 : 2-/3-méthylcyclohexanone

L'augmentation de la concentration en DH13B5 avec la 2-méthylcyclohexanone (**124**) de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ à $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ permet une réaction plus rapide et des conversions améliorées de 10-15 % (Figure 58A). Cependant, après 48 h, seulement 75 % de **124** sont transformés et l'utilisation d'une quantité plus élevée d'enzyme ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) ne permet pas d'obtenir de meilleurs résultats. Cette observation est également valable avec la 3-méthylcyclohexanone (**62**), où 40 % de conversion sont atteints en 4 h aussi bien avec $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ que $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ d'enzyme (Figure 58B). Par ailleurs, la réaction semble stagner aux alentours de 50 % d'amine formée, soit un gain de conversion de seulement 10 % après 20 h supplémentaires.

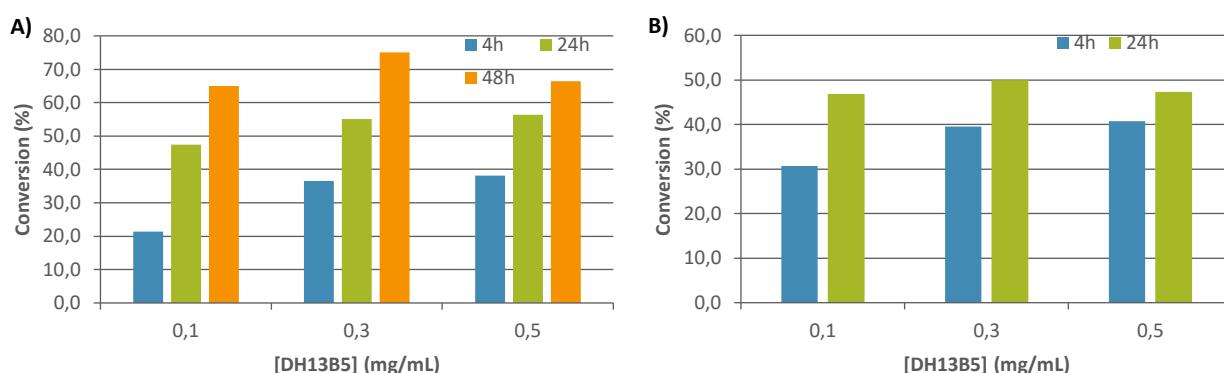


Figure 58 : Conversion en fonction de la concentration de DH13B5 pour la réaction d'amination réductrice biocatalysée de A) 124. B) 62.

Ces résultats pourraient s'expliquer par une préférence de l'enzyme pour un des deux énantiomères, notamment pour le 3-méthylcyclohexanone (**62**). En effet, l'examen des spectres UHPLC-UV pour ce substrat montre un épaulement du pic correspondant au second diastéréoisomère sur l'analyse 24 h, non présent à 4 h (Figure 59). Des suivis plus fins de la conversion et des excès diastéréoisomériques ont alors été réalisés avec **124** et **62** en présence de $0,1$ et $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ d'enzyme, respectivement par UHPLC-UV et GC-FID chirale.

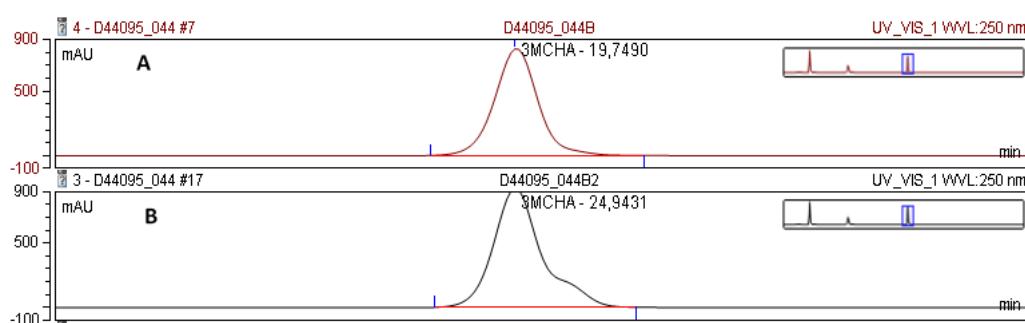


Figure 59 : Spectre UHPLC-UV du suivi de la réaction d'amination réductrice de **62** par DH13B5. A) Résultat à 4 h. B) Résultat à 24 h.

- 2-méthylcyclohexanone : conversion et stéréochimie des produits formés**

Le tracé du pourcentage de diastéréoisomère *cis* en fonction du temps confirme bien qu'un des deux énantiomères, la (2*R*)-2-méthylcyclohexanone (**124**), est préférentiellement transformé par DH13B5. Cependant, le produit issu de la réaction de l'énantiomère (2*S*) est détecté dès les premiers temps de réaction quelle que soit la concentration d'enzyme initiale (30 min pour 0,3 mg.mL⁻¹ et 1 h pour 0,1 mg.mL⁻¹) (Figure 60). Malgré cela, après 24 h, la réaction progresse lentement, avec une évolution de la conversion de seulement 20 % en 72 h, ce qui s'expliquerait alors plutôt par une inhibition par le produit de la réaction ou une dégradation partielle de l'enzyme.

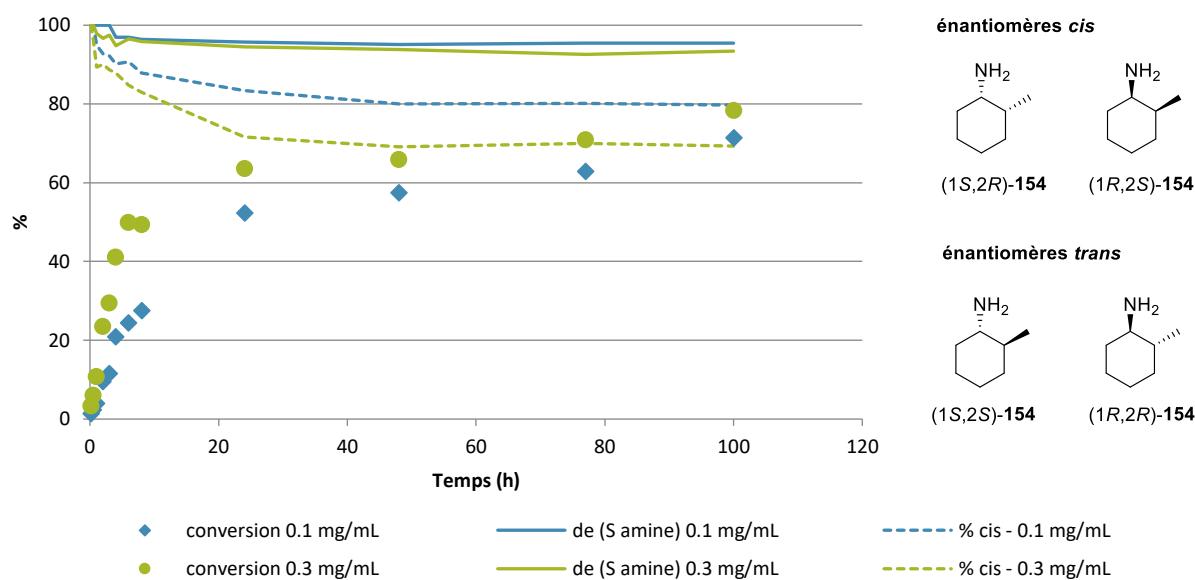


Figure 60 : Suivi de la conversion et de la stéréochimie du produit 154 formé en fonction de la concentration en DH13B5.

De plus, bien que formant très préférentiellement l'amine de stéréochimie (*S*), des traces du composés (*R*) sont détectées au bout de 1 h ou 4 h respectivement pour 0,3 et 0,1 mg.mL⁻¹ de DH13B5 à des conversions globales correspondantes de 10 et 21 %. Cela étant, l'excès diastéréoisomérique de l'amine (*S*) reste supérieur à 95 % tout au long de la réaction.

L'utilisation de 0,1 mg.mL⁻¹ ne permettant pas finalement de mieux contrôler l'excès diastéréoisomérique, ni le ratio *cis/trans* de manière significative. Nous avons opté pour une concentration de 0,3 mg.mL⁻¹ d'enzyme qui permet d'atteindre des conversions supérieures en des temps réactionnels plus courts.

- 3-méthylcyclohexanone : conversion et stéréochimie des produits formés**

Dans le cas de la 3-méthylcyclohexanone (**62**), seule l'amine de configuration (*S*) est détectée tout au long de la réaction. La formation de cette dernière est rapide dans les 4 premières heures (43 % de conversion avec $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ d'enzyme), puis stagne autour de 50 % de conversion même après 4 jours de réaction (Figure 61). Comme avec le substrat précédent, l'enzyme est probablement inhibée par le produit de la réaction, ou présente une instabilité dans le milieu.

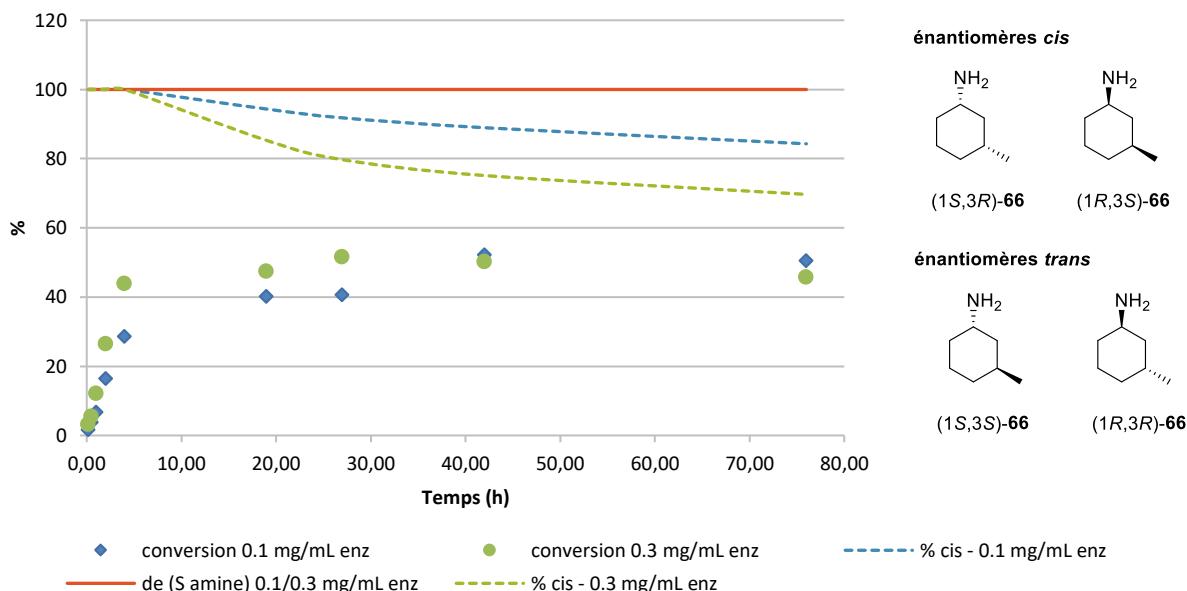


Figure 61 : Suivi de la conversion et de la stéréochimie du produit **66** formé en fonction de la concentration en DH13B5. de = excès diastéréoisomérique.

En revanche, contrairement à **124**, la formation du composé *trans* (*1S,3S*) n'est détectée qu'après 4 h de réaction soit pour une conversion de 43 % avec $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ d'enzyme. Le pourcentage de *cis* diminue ensuite pour se stabiliser autour 75 %. Il a alors été choisi d'utiliser $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ d'enzyme pour la montée en échelle, et de stopper la réaction au bout de 4-6 h afin d'obtenir le produit (*1S,3R*) avec un fort excès diastéréoisomérique.

3.1.4.2. DH13F8

Dans le cas de DH13F8 avec la pentan-2-one (**72**), une amélioration de la conversion est observée avec l'augmentation de la concentration en enzyme. Un maximum de 59 % est atteint avec $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ d'enzyme en 48 h (Figure 62). Cette concentration a donc été conservée pour la réaction à l'échelle semi-préparative.

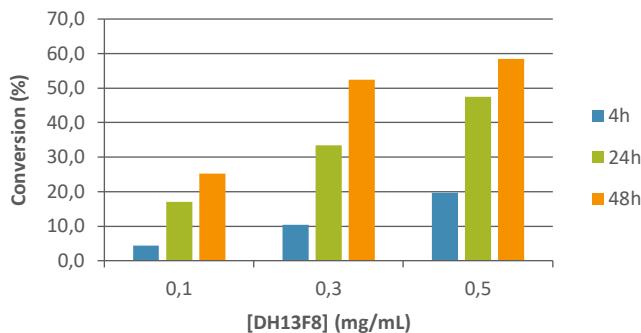


Figure 62 : Suivi de la conversion pour la réaction d'amination réductrice sur **72** en fonction de la concentration en DH13B5.

3.1.5. Conclusion des optimisations

Finalement, à l'issue de ces optimisations, les conditions suivantes ont été retenues pour les montées en échelle sur les trois composés **124**, **62** (DH13B5) et **72** (DH13F8) :

- **DH13B5** : 1 M de tampon $\text{NH}_4\text{COOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ pH 9, 50 mM de substrat, 0,2 mM de NADPH, 3 U.mL^{-1} de GDH, 55 mM de glucose et 0,3 mg.mL⁻¹ de DH13B5, agitation 400 rpm, 30 °C, 4-24 h.
- **DH13F8** : 2 M de tampon $\text{NH}_4\text{COOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ pH 9, 50 mM de substrat, 0,2 mM de NADPH, 3 U.mL^{-1} de GDH, 55 mM de glucose et 0,5 mg.mL⁻¹ de DH13F8, agitation 400 rpm, 30 °C, 24 h.

3.2. SYNTHESES A L'ECHELLE SEMI-PREPARATIVE

Une montée en échelle de chacune des réactions optimisées a été effectuée sur une millimole de substrat. Des rendements compris entre 35 et 40 % (conversion de 45-57 %) ont été obtenus avec des excès énatiomériques/diastéréoisomériques similaires à ceux observés lors des réactions à échelle analytique (*ee* > 97 % dans le cas de la (2*S*)-pentan-2-amine (**99**) et *ed* > 97 % dans le cas de la (1*S,2R*)-2-méthylcyclohexylamine (**154**) et (1*S,3R*)-3-méthylcyclohexylamine (**66**)). Des rapports *cis/trans* de 90/10 et 97/3 sont respectivement calculés pour **154** après 24 h de réaction et pour **66** pour un temps réactionnel de 6 h. Les produits ont été obtenus sous forme de sels hydrochlorés.

Des travaux similaires d'optimisation ont été effectués pour la synthèse biocatalysée de la *N*,*2*-diméthylpropanamine (**155**) avec C3UMY1 et ont abouti à l'obtention du produit souhaité avec un rendement de 76 % après 10 h de réaction.

Même si ces synthèses ont été réalisées à des concentrations modérées en substrats, le TTN et le STY ont été calculés pour ces 4 réactions (Tableau 19). Nous obtenons des TTNs inférieurs à ceux obtenus avec les RedAms pour la synthèse de la *N*-méthylcyclohexanamine (TTN 32000) majoritairement dues à la limitation en molarité de substrat. Les STYs sont du même ordre de grandeur (3,73 g.L⁻¹.d⁻¹ pour les RedAms), mais toutefois inférieurs à celui de DH2B1 de 51,6 g.L⁻¹.d⁻¹.

Tableau 19 : « Total turn ouver number » (TTN) et « space time yield » (STY) des synthèses optimisées avec DH13B5, DH13F8 et C3UMY1.

Substrat	Produit	Enzyme	Conversion	Rendement (masse isolée)	TTN	STY (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)
72	(<i>S</i>)- 99	DH13F8	57 %	39 % (48 mg)	3016	2,4
124	(<i>1S,2R</i>)- 154	DH13B5	55 %	35 % (52 mg)	6847	2,60
62	(<i>1S,3R</i>)- 66	DH13B5	45 %	40 % (60 mg)	5933	2,99
150	155	C3UMY1	76 %	56 % (69 mg)	22 800	8,28

4. CASCADE ENZYMATIQUE COUPLANT AMINE DESHYDROGENASES ET ENE-REDUCTASES

Dans le cadre de notre collaboration avec Dr Caroline E. Paul de l'Université de Wageningen sur l'utilisation de biomimétiques de cofacteurs nicotinamides (développée dans le chapitre suivant), une réaction en cascade couplant des ène-réductases (ERs) avec nos AmDHs a été proposée (Schéma 70).

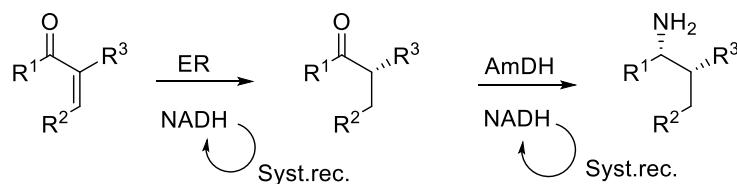


Schéma 70 : Cascade biocatalytique couplant les ERs et les AmDHs.

Cette cascade, déjà décrites avec les TAs (Monti *et al.*, 2015; Skalden *et al.*, 2016), permet entre autres le contrôle de la stéréochimie de deux centres chiraux en une seule étape. L'avantage des AmDHs par rapport aux TAs dans cette réaction est notamment l'utilisation du même cofacteur NAD(P) entre les ERs et les AmDHs. Le milieu est donc simplifié grâce à la présence d'un unique système de régénération.

4.1. PRESENTATION DES ENE-REDUCTASES

Les ERs sont des enzymes flavine mononucléotide (FMN) dépendantes de la famille des « old yellow enzymes » (OYE) (Scholtissek *et al.*, 2017; Winkler *et al.*, 2018). Elles catalysent l’hydrogénéation *anti* d’une double liaison activée par un groupement électroattracteur (Schéma 71).

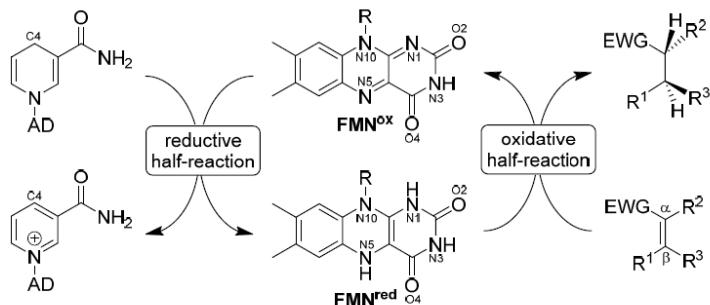


Schéma 71 : Réaction d’hydrogénéation asymétrique catalysée par les ERs. AD = adénine dinucléotide. R = ribose phosphate. © Scholtissek *et al.*, 2017.

Ces enzymes réagissent selon un mécanisme ping-pong. La première réaction est la réduction du FMN par le NAD(P)H. Le FMN réduit va, lors de la deuxième étape, transférer à son tour l’hydrure sur le carbone β de l’alcène. Une tyrosine présente dans le site actif fournit le proton nécessaire à la réduction de la double liaison C=C.

Ces enzymes sont donc capables, en une seule étape, de créer deux centres asymétriques et ce de manière très stéréosélective. De plus, elles acceptent un large spectre de substrats, ce qui les rend très intéressantes pour l’industrie, où on les retrouve dans des synthèses de pro-drogues (Pietruszka and Schölzel, 2012; Winkler *et al.*, 2013; Reß *et al.*, 2015).

4.2. MISE EN PLACE DE LA CASCADE

Notons qu’à ce moment du projet, les travaux d’optimisation des conditions de réaction avec DH13B5 et DH13F8 développés dans le paragraphe IV.3.1 n’avaient pas encore été effectués.

Des travaux préliminaires pour valider la faisabilité du couplage AmDHs/ERs ont été réalisés durant mon séjour à Wageningen. Une vérification de la compatibilité des conditions réactionnelles entre ces deux enzymes a tout d’abord été menée. Habituellement, les ERs sont utilisées dans le tampon MOPS à 50 mM, pH 7 en présence de 5 mM de CaCl₂, tandis que les AmDHs fonctionnent dans le tampon formate d’ammonium 1-2 M, à pH 9. Les premiers tests ayant montré que l’activité de l’ER de *Thermus*

scotoductus (*TsOYE*) employée n'est pas affectée par 1 M de tampon NH₄COOH/NH₄OH, des cascades ont été réalisés sans plus d'optimisation.

C3UMY1, DH13B5 et DH13F8 ont chacune été couplées avec la *TsOYE* sur la cyclohex-2-èn-1-one (**136**), avec le système de recyclage GDH (Schéma 72).

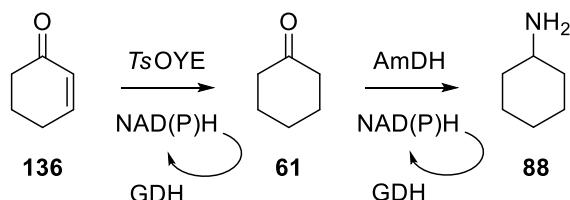


Schéma 72 : Schéma réactionnel de la cascade couplant les ERs avec les AmDHs pour la synthèse de **88**.

Un suivi GD-FID a permis d'observer qualitativement la formation des différents produits, après 24 h de réaction. Dans chaque cas, l'amine **88** est détectée, et le substrat **136** est totalement transformé, mais l'intermédiaire cétone **61** est également présent (Figure 63).

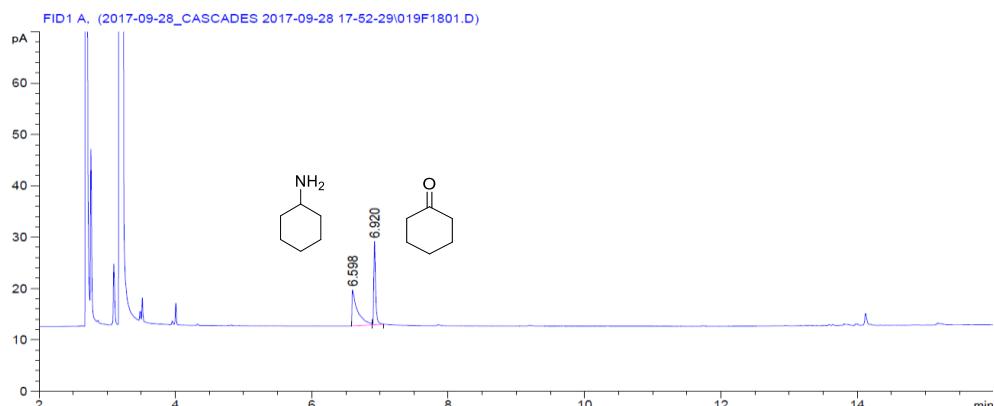


Figure 63 : Analyse GC-FID de la réaction en cascade de *TsOYE* et DH13F8. t_r (**136**) = 7,79 min, t_r (**61**) = 6,92 min, t_r (**88**) = 6,60 min

Ces premiers résultats encourageants permettent donc d'envisager la poursuite de ce volet du projet. Ainsi, 13 substrats étones précurseurs des cétones substrats des AmDHs vont être prochainement testés au laboratoire. DH13B5/DH13F8 et C3UMY1 vont être couplées à *TsOYE* ainsi qu'à un mutant de cette ER, plus actif sur des substrats cycliques β -substitués. Les meilleurs couples ERs/AmDHs seront retenus pour la réalisation de ces cascades à l'échelle semi-préparative. Par ailleurs, la *TsOYE* ne formant que l'énanthiomère (*S*) au niveau du carbone porteur du méthyle, d'excellents ratios cis/trans pourraient être obtenu.

5. CONCLUSION

DH13B5, DH13F8 et C3UMY1, issues d'une recherche à partir des 2,4-DAPDH, possèdent un spectre de substrats plus large que celui de DH2B1, sans prérequis de fonction acide carboxylique ou α -aminoacide dans la structure. Ces AmDHs partagent tout de même la même stéréosélectivité que DH2B1 avec la formation de l'amine chirale de configuration *S*, les différenciant alors des L/F-AmDHs et des RedAms de la littérature. De plus, ces enzymes, bien que préférentiellement NADPH dépendantes, acceptent également le NADH en tant que cofacteur.

La résolution structurale de ces enzymes a montré qu'elles possèdent une structure globale similaire à DH2B1 malgré une faible homologie de séquence. La poche catalytique est cependant plus petite et plus hydrophobe. Un mécanisme réactionnel légèrement différent de celui de DH2B1 a été postulé.

L'optimisation des conditions réactionnelles a permis de réaliser les synthèses biocatalysées de **66**, **99** et **154** sur 1 mmol de substrat. De très bons excès énantiо/diastéréoisomériques (95-99 %) ont été obtenus avec des rendements compris entre 35 et 40 %. Une transformation très préférentielle de l'énanтиomère (*R*) des substrats 2- et 3-méthylcyclohexanone (**124** et **62**) est observée. Même si le traitement des réactions pourrait être amélioré, ces faibles rendements sont majoritairement dus à des conversions moyennes (50-60 %) dans les conditions réactionnelles utilisées. Ces converions viennent probablement d'une inhibition des enzymes par le produit. Des expériences complémentaires seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse, mais ceci est couramment observé avec les AmDHs et les RedAms de la littérature.

Chapitre V : Mimics de cofacteurs nicotinamides : alternative biocatalytique

L'activité oxydoréductrice des AmDHs nécessite un cofacteur nicotinamide NADH ou NADPH, relativement onéreux en synthèse. Une alternative intéressante, d'un point de vue réactivité, stabilité et coût, est l'emploi d'analogues synthétiques NCBs (« nicotinamide cofactor biomimetics »). Moins coûteux, ils peuvent être introduits en quantité équimolaire et donc éviter l'emploi d'un système de recyclage (Schéma 73).

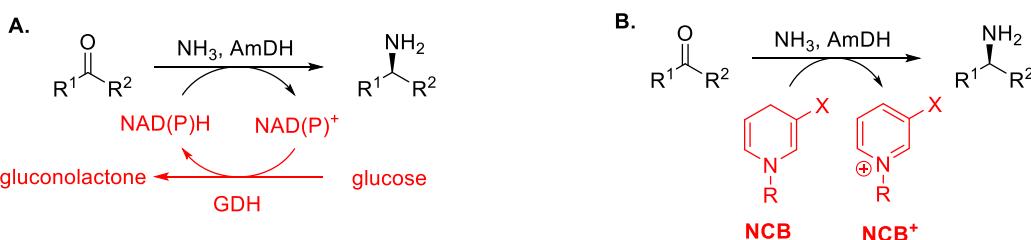


Schéma 73 : A) Réaction d'amination réductrice catalysée par les AmDHs en présence d'un système enzymatique de recyclage du cofacteur nicotinamide. B) Réaction d'amination réductrice catalysée par les AmDHs à partir des NCBs en tant que réducteurs.

Dr. Caroline E. Paul, de l'Université de Wageningen aux Pays-Bas a récemment développé des NCBs fonctionnant de manière très efficace avec les ène-réductases (ERs) (Paul *et al.*, 2013, 2015). L'utilisation de ces NCBs avec d'autres oxidoréductases constituent un axe de recherche important, puisque les NCBs synthétisés jusqu'à présent sont inactifs avec les déshydrogénases telles que les ADHs, les FDHs ou encore les GDHs (Paul and Hollmann, 2016). C'est pourquoi une collaboration avec Dr Caroline E. Paul a été mise en place. Grâce à l'obtention d'un financement « Fonds pour le rayonnement de la recherche » (FRR) de l'Université d'Evry Val d'Essonne, j'ai pu me rendre à Wageningen pendant un mois afin d'étudier l'activité des AmDHs découvertes avec les NCBs.

1. ACTIVITE AMDH EN PRESENCE DE COFACTEURS SYNTHETIQUES

L'activité de DH2B1, DH13B5, DH13F8 et C3UMY1 a été étudiée avec les NCBs à la fois pour l'amination réductrice et pour la déamination oxydative. L'étude de la déamination oxydative a été motivée par la plus grande diversité structurale de NCBs oxydés (Figure 64).

Toutes les réactions ont été réalisées en plaque 96 puits sur un volume total de 100 μL . Le suivi de la réaction a été effectué par spectrophotométrie à 340 nm. Les activités spécifiques ont été calculées comme décrit dans le chapitre II.2.1.1. Le coefficient d'extinction molaire des cofacteurs synthétiques est estimé être environ égal à celui du NAD(P)H soit de $6220 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

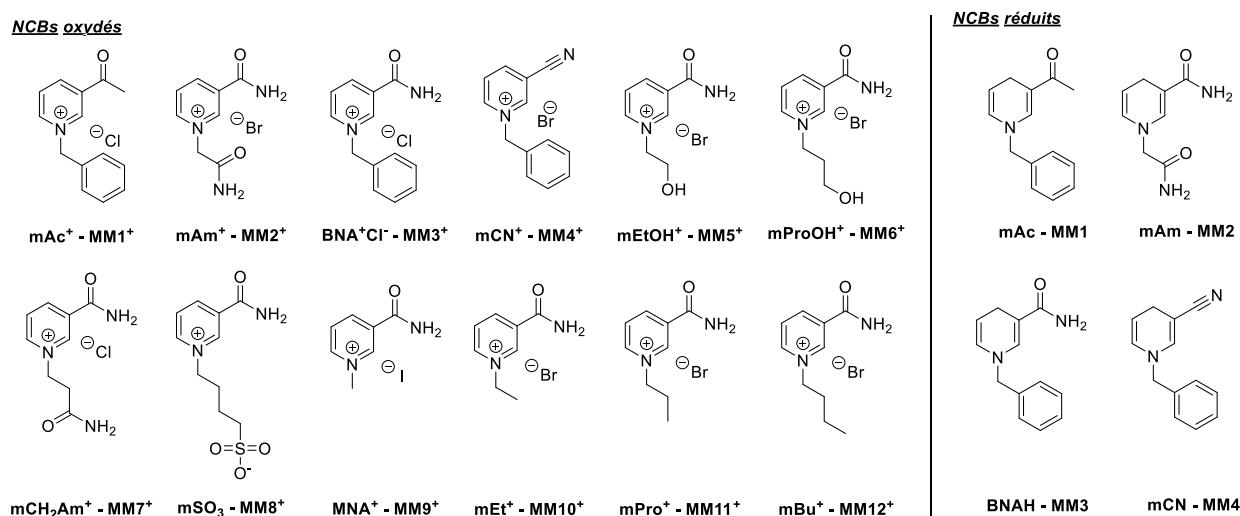


Figure 64 : Structure des cofacteurs synthétiques.

1.1. REACTION DE DEAMINATION OXIDATIVE

Les quatre enzymes ont été testées avec 2 équivalents de NCBs oxydés (**MM1⁺-MM12⁺**), ainsi qu’avec les cofacteurs naturels comme témoins positifs de réaction, sur différents substrats : DH2B1 avec le 4-aminopentanoate (**97**), DH13B5, DH13F8 et C3UMY1 sur la cyclohexylamine (**88**), la 2-méthylcyclohexylamine (**154**) et l’isopropylamine (**156**). Malheureusement, aucune transformation de ces substrats n’a été observée avec les NCBs (Figure 65). Cependant, les réactions avec les cofacteurs naturels ne montrent elles aussi que peu voire pas d’activité (0-15 mU.mg⁻¹).

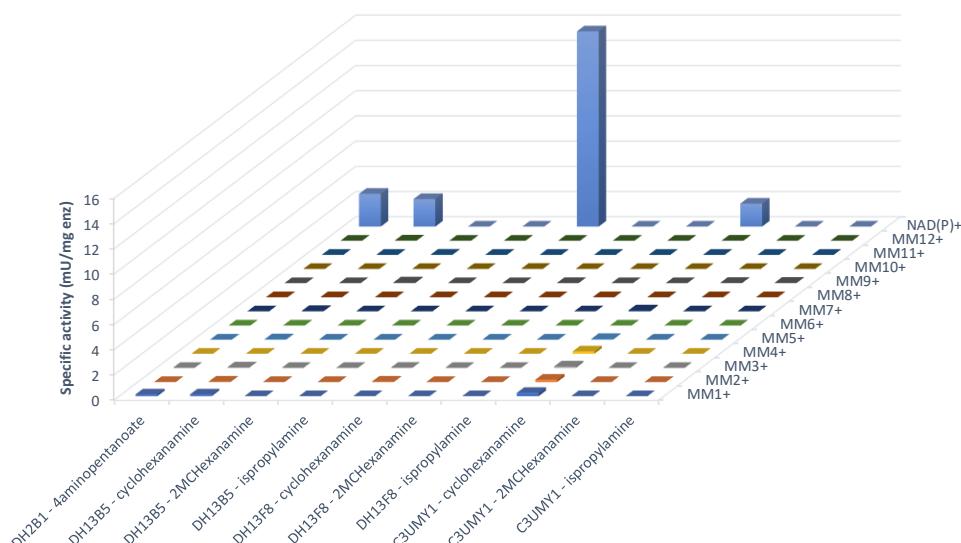


Figure 65 : Activité spécifique des AmDHs pour la réaction d’amination réductrice avec les cofacteurs synthétiques.

1.2. REACTION D'AMINATION REDUCTRICE

La mise en place de la réaction d'amination réductrice avec les NCBs et les AmDHs a nécessité d'étudier l'impact des cosolvants sur les AmDHs, les NCBs réduits n'étant que faiblement solubles dans l'eau.

1.2.1. Etude des cosolvants

Trois cosolvants miscibles à l'eau (DMSO, ACN et EtOH) ont été étudiés sur DH2B1, DH13B5, DH13F8 et C3UMY1, jusqu'à hauteur de 20 % en volume, pour les réactions d'amination réductrice de l'acide 4-oxopentanoïque (**95**) (DH2B1), et de la cyclohexanone (**61**) (DH13B5/F8, C3UMY1). Bien que des travaux aient déjà été réalisés avec DH2B1, cette dernière a tout de même été intégrée à ces expérimentations. En effet, dans cette étude, nous nous intéressons à la vitesse initiale de la réaction, suivie par spectrophotométrie, et non pas à la conversion déterminée elle, au bout de 24h par analyse UHPLC-UV (cf. II.5).

De manière générale, les résultats obtenus montrent que DH2B1, DH13B5, DH13F8 et C3UMY1 acceptent plutôt bien la présence de cosolvants quelque soit celui utilisé (Figure 66). DH2B1 est l'une des plus résistantes, son activité reste stable aussi bien avec le DMSO que l'EtOH ou l'ACN, à tous les pourcentages testés (Figure 66A). Lors de l'étude précédemment menée sur cette enzyme, une perte de la conversion avait été observée au bout de 24 h de réaction avec 10 et 20 % d'EtOH ou d'ACN. Ceci signifie donc qu'en présence de cosolvant, l'enzyme est stable sur les premiers temps de réaction (10 min – 2 h) puis perd de l'activité au-delà de cette période.

De même que DH2B1, C3UMY1 ne perd pas d'activité quelque soit le nature et le pourcentage du cosolvant testé (Figure 66B). De plus, si avec l'ACN une activité stable autour de $60 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ est observée, une augmentation significative de cette dernière est au contraire constatée avec le DMSO ($156 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$) et l'EtOH ($137 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$), à partir de 5 % et 10 % v/v respectivement ($60 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ sans cosolvant).

DH13B5 et DH13F8 ont toutes deux un comportement similaire vis-à-vis de ces trois cosolvants. En présence d'ACN, leur activité reste stable autour d'une valeur moyenne respectivement de $180 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ et $67 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$. L'EtOH provoque quant à lui, une rapide inactivation/dégradation de l'enzyme, visible dès 5 % v/v. Au-delà, plus aucune activité n'est observée. Dans le cas de l'utilisation de DMSO, une diminution progressive est constatée pour des concentrations supérieures à 5 % avec DH13B5 ($200 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ avec 5 % à $50 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ avec 20 %), ou DH13F8 ($37 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ à $14 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$).

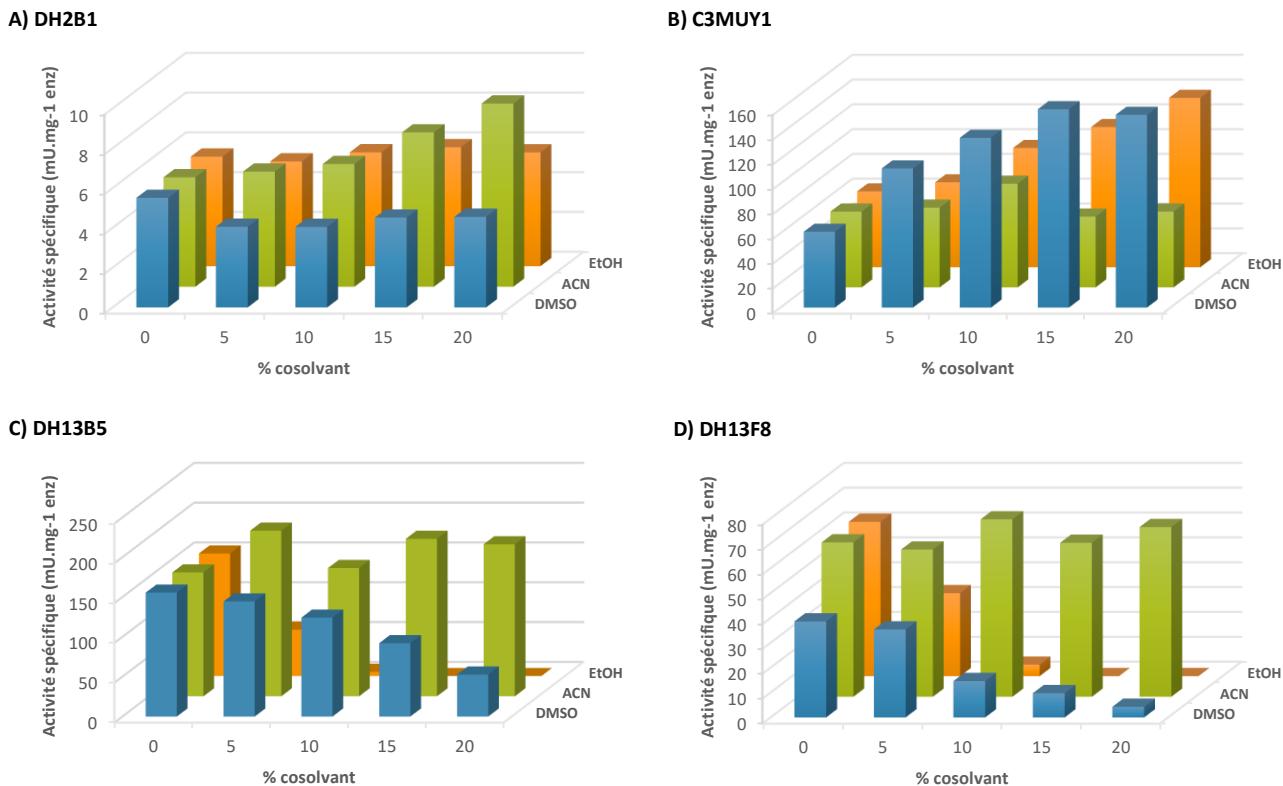


Figure 66 : Activité spécifique en fonction du pourcentage de cosolvant en réaction avec A) DH2B1, B) C3UMY1, C) DH13B5, D) DH13F8.

Finalement, le DMSO a tout de même été choisi en tant que cosolvant pour les réactions couplant les AmDHs et les NCBs. En effet, il constitue le meilleur compromis entre solubilité des NCBs et perte d'activité des enzymes.

1.2.2. Réactions

Les réactions d'amination réductrice avec les NCBs (**MM1-MM3**) ont été effectuées avec DH2B1 (substrat **95**, 5 mM), DH13B5, DH13F8 et C3UMY1 (substrats **61**, **124**, et **150**, 5 mM), en présence de 0,4 mM de cofacteur (soit 0,8 % v/v de DMSO). Les cinétiques enzymatiques ont été suivies sur 5 h, bien que l'activité spécifique des enzymes soit calculée sur les premiers temps de réaction. Malheureusement, aucune réaction n'a été détectée avec les NCBs testés. Au vu de ces résultats négatifs, la question s'est alors posée de savoir si ces NCBs ne seraient pas inhibiteurs des AmDHs. Une étude, développée dans la section suivante, a alors été menée.

Par ailleurs, le suivi des réactions sur 5 h a permis de mettre en évidence une décomposition des cofacteurs synthétiques dans le milieu réactionnel (Figure 67). En effet, les courbes obtenues ont montré une perte d'absorbance progressive non due à une activité enzymatique, les blancs réactionnels suivant la même cinétique. C'est notamment le cas du BNAH, où la décomposition s'accélère après 1 h 30 de

réaction (Figure 67). Il a alors été décidé d'examiner plus amplement la stabilité de ces NCBs, détaillée dans la deuxième partie de ce chapitre.

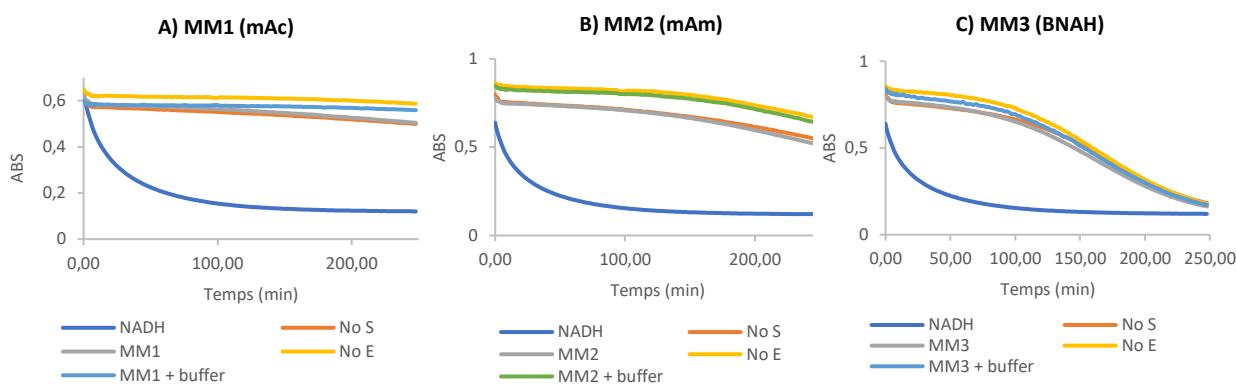


Figure 67 : Suivi spectrophotométrique de la réaction d'amination réductrice avec DH13B5 en présence des NCBs A) MM1. B) MM2. C) MM3.

1.2.3. Inhibition des AmDHs pas les NCBs

L'inhibition des AmDHs par les NCBs (**MM1-MM4**) a été testée dans les deux sens réactionnels avec les 4 enzymes sur leur substrat respectif (4-oxopentanoate (**95**)/4-aminopentanoate (**97**) pour DH2B1, cyclohexanone (**61**)/cyclohexylamine (**88**) pour DH13B5/F8 et C3UMY1). 0,2 mM de NCBs réduits ont été ajoutés lors de la réaction d'amination réductrice, et 1 mM de NCBs oxydés dans le sens de la déamination oxydative, tout en maintenant la présence des cofacteurs naturels.

D'après les résultats obtenus, les **MM1-MM3** ne semblent pas avoir d'effet inhibiteur sur l'activité des AmDHs dans les conditions de concentrations utilisées (Figure 68). En revanche, aucune activité n'a été détectée en présence de **MM4** avec DH13F8 pour la réaction d'amination réductrice. Une diminution semble également visible dans le cas de l'oxydation, même si de très faibles activités ont été mesurées dans le sens oxydatif. Ces travaux n'ont pas été plus approfondis, mais il serait intéressant de tester des concentrations en NCBs variées.

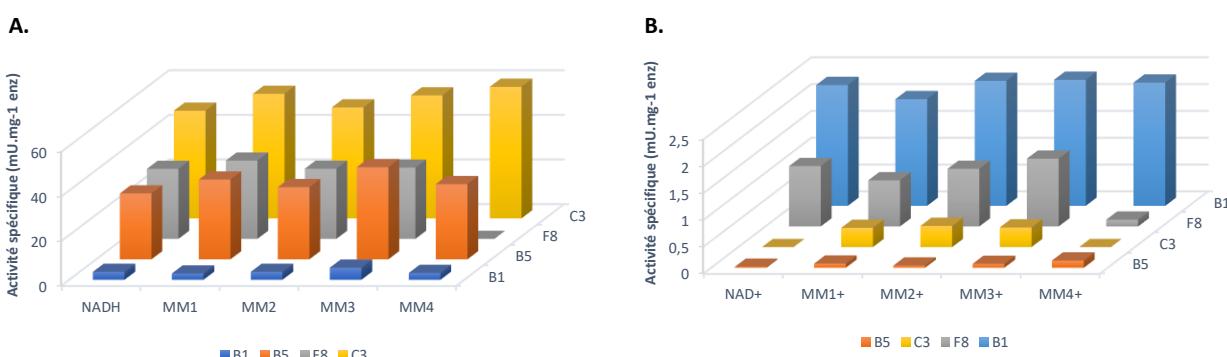


Figure 68 : Activité spécifique des AmDHs en fonction des cofacteurs synthétiques A) pour la réaction d'amination réductrice. B) pour la réaction de déamination oxydative.

2. STABILITE DES COFACTEURS

Malgré leur utilisation en biocatalyse, aucune étude de stabilité des NCBs n'a encore été décrite pour différentes conditions de tampon et pH. Ce travail a donc été mené en incluant également les cofacteurs naturels. Une recherche bibliographique a en effet révélé que très peu d'études ont été réalisées sur la stabilité de NADH et NADPH malgré leur omniprésence dans les réactions biocatalysées d'oxydoréduction (Lowry *et al.*, 1961; Alivisatos *et al.*, 1965; Rover *et al.*, 1998).

La stabilité des cofacteurs réduits a été testée en plaque 96 puits sur un volume total de 200 µL, pour 7 tampons, à 3 pH différents ainsi qu'à plusieurs concentrations (Tableau 20). L'absorbance des solutions est suivie sur 5 h à température ambiante. Les résultats sont présentés en vitesse de décomposition du cofacteur en pmol.h⁻¹, calculée sur le temps le plus long de linéarité des courbes de suivi. A noter que la quantité initiale de cofacteur dans les milieux est de 80 pmol (0,4 mM concentration finale). Les courbes obtenues sont présentées en annexe 9.

Tableau 20 : Nature du tampon, pH et concentrations testés pour l'étude de la stabilité des cofacteurs.

Tampon	pH	Concentrations (mM)
NH ₄ Cl/NH ₄ OH	8 - 9 - 10	50 – 200 (pH 9)
NH ₄ COOH/NH ₄ OH	8 - 9 - 10	50 – 200 (pH 9) – 500 (pH 9) – 1000 (pH 9)
NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃	9 - 10 - 11	50 – 200 (pH 10)
TRIS	7 - 8 - 9	50 – 200 (pH 8)
MOPS	6 - 7 - 8	50 – 200 (pH 7)
KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	5 - 6 - 7	50 – 200 (pH 6)
HEPES	6,5 - 7,5 - 8,5	50 – 200 (pH 7,5)

2.1. STABILITE DES COFACTEURS SYNTHETIQUES

2.1.1. Nature du tampon et pH

Une analyse générale des résultats montre que les cofacteurs synthétiques sont moins stables en milieu acide qu'en milieu basique (Figure 69). A pH identiques, le tampon phosphate se trouve être le moins favorable quelque soit le NCB. Au contraire, les tampons TRIS et carbonate sont quant à eux les plus stabilisants. La décomposition des NCBs est également constante avec NH₄Cl/NH₄OH et NH₄COOH/NH₄OH sur les 3 premières heures de réaction, mais s'accélère ensuite (Figure 70). Une mesure du pH en fin de réaction a permis d'expliquer ce résultat par une acidification des milieux due à l'évaporation de l'ammoniac (pH_i= 9, pH_f = 5,6).

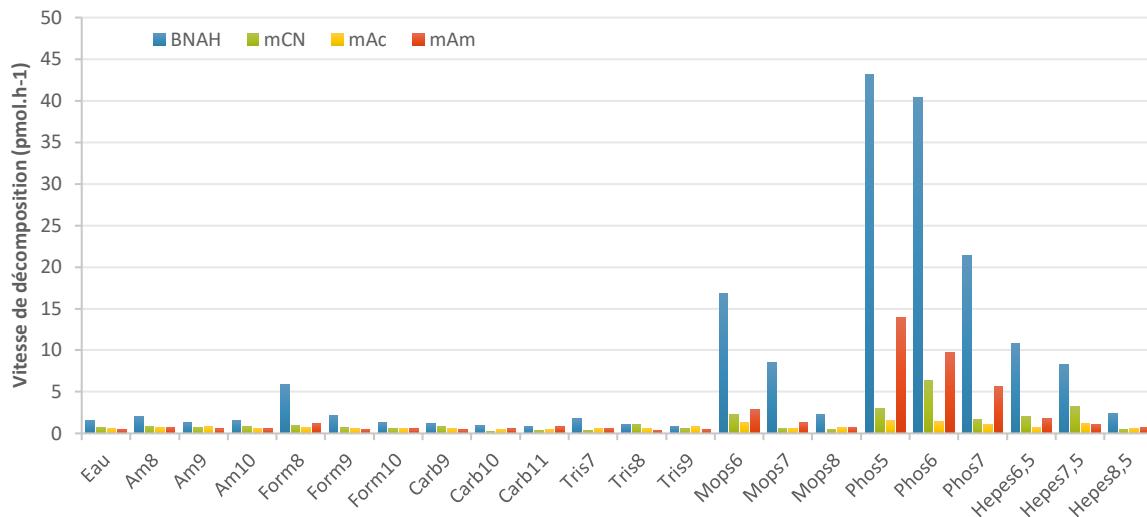


Figure 69 : Vitesse de décomposition des cofacteurs synthétiques réduits en fonction de la nature et du pH des tampons.

Le BNAH apparaît comme le moins stable des NCBs notamment en milieu acide où il se décompose jusqu'à 30 fois plus rapidement que les autres cofacteurs synthétiques dans les mêmes conditions. Par ailleurs, le tampon phosphate favorise cette décomposition par rapport à l'utilisation de l'HEPES ou du TRIS dans des mêmes gammes de pH. En effet, la Figure 70 montre que la décomposition du cofacteur est très rapide et commence même avant le début de l'analyse (ABS_i (phosphate) < ABS_i (TRIS)). Au bout d'1 h 30 d'incubation dans le tampon phosphate à pH 5, la totalité de BNAH introduit est décomposé.

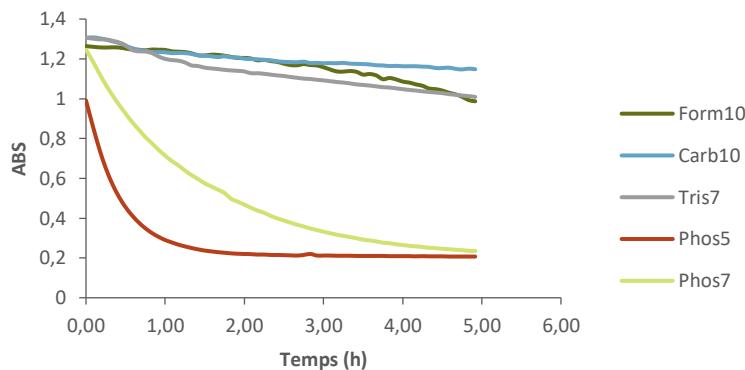


Figure 70 : Suivi spectrophotométrique de la décomposition du BNAH en fonction de la nature du tampon et du pH.

A l'inverse du BNAH, il ressort de cette étude que le mAc est le plus stable des quatre NCBs, quelque soit les milieux et pH testés, même en présence de tampon phosphate. Les mimics mAm et mCN se comportent quant à eux de façon similaire, avec tout de même une décomposition plus rapide de mAm à des pH acides.

2.1.2. Concentration en tampon

L'augmentation de la concentration en tampon n'a de manière générale pas une grande influence sur la vitesse de décomposition des cofacteurs synthétiques (Figure 71). Le BNAH est dans ce cas là aussi le plus sensible à ces variations. La plus grande variation de la vitesse décomposition est néanmoins observée avec mAm en le tampon phosphate à 50 mM / 200 mM, avec un facteur 3 les séparant.

L'utilisation de tampon formate jusqu'à 1 M n'a pas réellement d'effet sur la stabilité des NCBs, à l'exception du BNAH où une faible hausse de la décomposition semble tout de même se dessiner. Ce résultat est à prendre en considération lors de l'utilisation des mimics en réaction d'amination réductrice où les concentrations en formate d'ammonium sont souvent élevées.

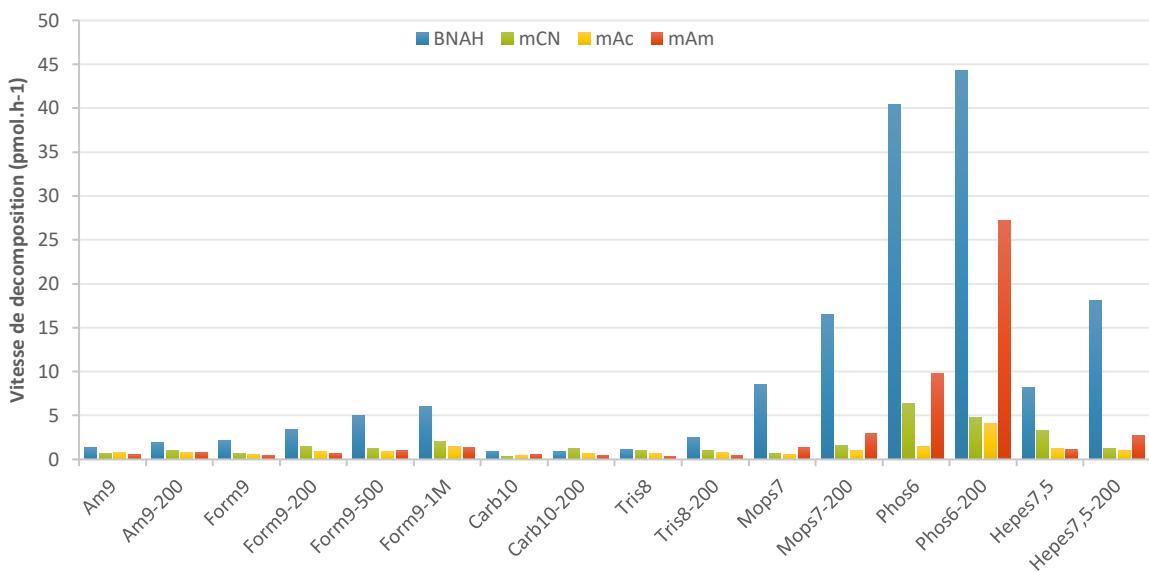


Figure 71 : Vitesse de décomposition des cofacteurs synthétiques en fonction du tampon et de sa concentration.

2.2. STABILITE DES COFACTEURS NATURELS

D'un point de vue général, il apparaît clairement que le NADH est plus stable que le NADPH (Figure 72). De même que les cofacteurs synthétiques, les deux cofacteurs naturels sont moins stables en milieu acide qu'en milieu basique, et leur décomposition est accélérée en milieu phosphaté. Ils sont toutefois moins altérés que le BNAH, le mAm ou le mCN pour des conditions identiques. En revanche, si le NADH et le mAc ont des stabilités comparables pour la majorité des milieux testés, ce cofacteur synthétique est plus résistant aux pH acides et tampon phosphaté que le NADH et que le NADPH.

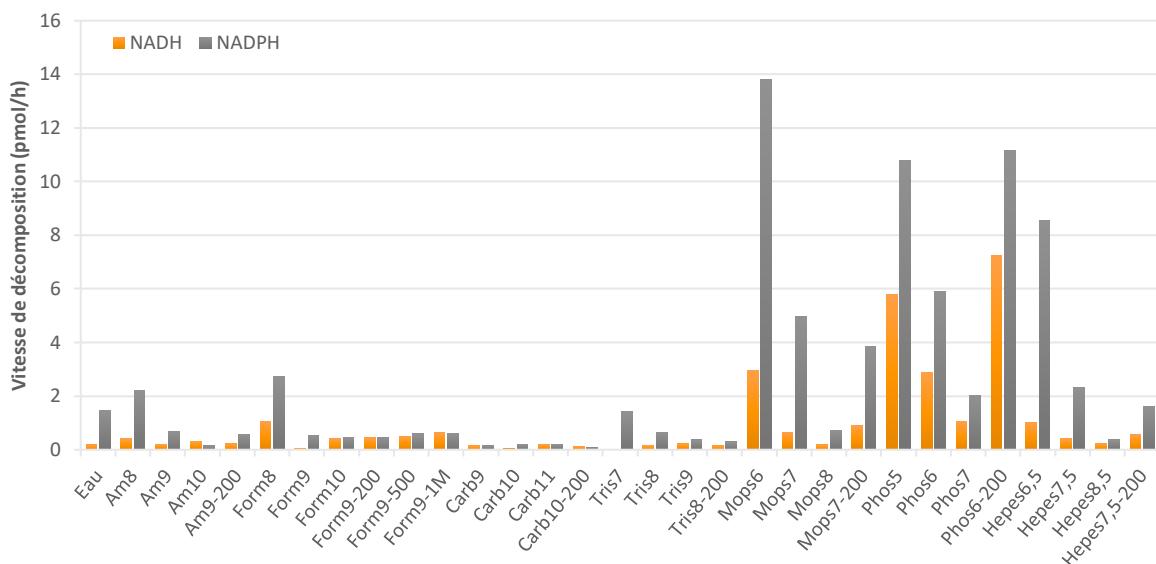


Figure 72 : Vitesse de décomposition des cofacteurs naturels en fonction de la nature du tampon, de sa concentration et du pH.

Pour des pH compris en 9 et 11, la nature du tampon ainsi que sa concentration n'ont pas d'impact sur la décomposition des deux cofacteurs naturels, cette dernière restant faible ($< 0,6 \text{ pmol.h}^{-1}$). L'utilisation de fortes concentrations d'ammoniac, en particulier avec le NADH, n'a pas de réelle influence sur la stabilité des cofacteurs, ce qui est un atout pour les réactions d'amination réductrice.

3. CONCLUSION

Après avoir vérifié l'influence des cosolvants sur les AmDHs découvertes, les réactions d'amination réductrice et de déamination oxydative avec DH2B1, DH13B5, DH13F8 et C3UMY1 couplées aux NCBs ont finalement montré l'inactivité de ces enzymes avec les cofacteurs synthétiques. Il est tout de même important de souligner que ces derniers, à l'exception peut-être de mCN (**MM4**), ne semblent pas provoquer d'inhibition des AmDHs.

Ces expériences ont néanmoins conduit à l'étude de la stabilité des cofacteurs synthétiques réduits mais également ceux de naturels (NADH et NADPH), relativement peu décrite dans la littérature. Cette étude a montré que le BNAH est le moins stable quelque soit les conditions réactionnelles. Les pH acides et le tampon phosphate accélèrent quant à eux la décomposition de tous les cofacteurs. Le NCB mAc s'est lui révélé plus résistant à ces deux derniers paramètres que les cofacteurs naturels, ce qui présente un avantage supplémentaire pour son utilisation dans des synthèses biocatalysées.

Bien qu'inactifs avec les AmDHs, ces NCBs n'inhibent pas les AmDHs, une amélioration de la réaction en cascade entre AmDH et ERs peut être envisagée. En effet, les NCBs étant capables de régénérer les cofacteurs naturels (Jones and Taylor, 1976; Taylor and Jones, 1976) et fonctionnant avec

les ERs. Une cascade s'affranchissant du système enzymatique de recyclage du cofacteur peut alors être considérée ; l'emploi de 2 équivalents de NCB permettrait la régénération du NAD(P)H (Schéma 74).

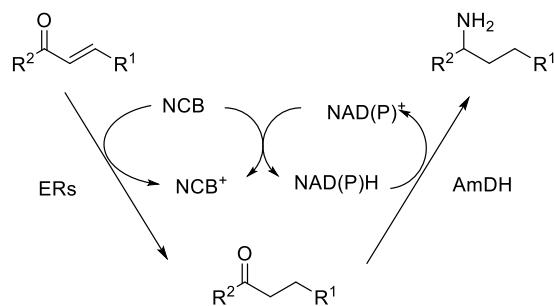


Schéma 74 : Cascade couplant les ERs et les AmDHs dans un processus neutre d'oxydo-réduction

Conclusion et perspectives

Les études menées au cours de ces trois années de thèse ont finalement permis de répondre aux deux objectifs principaux de ce projet : la découverte d'amines déshydrogénases naturelles (AmDHs), enzymes catalysant l'amination réductrice d'une cétone à partir d'ammoniac, et leur application en synthèse.

En collaboration avec la plateforme de clonage et de criblage des activités enzymatiques de l'unité Génomique Métabolique, une approche par comparaison de séquence a été menée pour rechercher des AmDHs dans la biodiversité bactérienne. Un set de référence constitué de la 2,4-diaminopentaoate déshydrogénase (2,4-DAPDH) et de la L-erythro-diaminohexanoate déshydrogénase (Kdd), provenant toutes deux de *Clostridium sticklandii*, a permis de trouver 9 enzymes sur 62 testées, actives sur l'acide 4-oxopentanoïque (**95**).

Après une étude préliminaire de 6 d'entre elles, celle issue de *Petrotogas mobilis* (DH2B1) a fait l'objet de plus amples caractérisations. La détermination de ses constantes cinétiques sur l'acide 2-amino-4-oxopentanoïque (**93**) et à **95**, nous a fait conclure à une activité naturelle 2,4-DAPDH de cette enzyme, en accord avec son contexte génomique précédemment observé ; son activité AmDH est donc secondaire. Le spectre de substrats de DH2B1 se restreint principalement à son substrat métabolique (**93**) et **95**, homologue non aminé. Ce dernier a alors été choisi afin de montrer l'intérêt de DH2B1 dans la synthèse énantiomériste de l'acide (4S)-4-aminopentanoïque (**97**). Après optimisation des conditions réactionnelles, une montée en échelle a permis l'obtention de 465 mg de produit pur (rendement 88 %) avec un *ee* supérieur à 99,5 %. De plus, la thermoactivité et la thermostabilité de DH2B1 mais aussi sa tolérance à de fortes concentrations initiales en substrat (0,5 M), encore non décrite avec les AmDHs, la rendent très intéressante pour des applications en synthèse.

L'obtention de la structure cristallographique de DH2B1 par l'équipe du Pr Gideon Grogan de l'Université de York, a ouvert de nouvelles perspectives de travail. La définition du site actif et des résidus importants à la catalyse, (Glu102, l'His197 et la Gln266), ainsi que la détermination des paramètres cinétiques des mutants associés (G102A et H197A), nous ont permis de proposer un mécanisme réactionnel. Des premiers travaux de mutations dirigées sur DH2B1 ont montré la possibilité d'obtention de variants actifs sur la pentan-2-one (**72**), supprimant ainsi la contrainte d'une fonction acide dans la structure des substrats, tout en conservant l'énantiomériste de l'enzyme. Grâce à une collaboration étroite avec Dr Karine Bastard de l'unité GM, la modélisation d'une partie de la plaque DH2 a permis de mettre en évidence 7 nouvelles enzymes actives sur **93** et **95**, non sorties lors du criblage.

Ces premières enzymes découvertes nous ont encouragés à en rechercher de nouvelles selon la même approche génomique. Un criblage d'homologues d'opine déshydrogénases/synthases ainsi qu'une démarche basée sur la recherche d'un motif 3D supposé caractéristique de l'activité AmDH se sont malheureusement révélés infructueux.

Une exploration de la biodiversité *via* la plateforme précédemment utilisée, à partir des 9 premières AmDHs a finalement abouti à la découverte de 2 nouvelles enzymes (DH13B5 et DH13F8). L'analyse de leur contexte génomique n'a pas permis de présumer de leur fonction métabolique et, par conséquent, de leur substrat natif. Par ailleurs, 3 homologues proches en séquence K0UKT5, C3UMY1 et E3CZE3 ont aussi montré une activité AmDH. La caractérisation de ces deux dernières ainsi que de DH13B5 et DH13F8 a dévoilé un spectre de substrats beaucoup plus large que celui de DH2B1, sans contrainte de fonction carboxylique sur la molécule. Les meilleures activités ont été obtenues sur des cétones cycliques et des aldéhydes aliphatiques. En plus de l'ammoniac, ces 4 enzymes acceptent également la méthylamine comme source d'azote, ce qui élargit alors leur champ d'application. Malgré une inhibition de DH13B5 et DH13F8 pour des concentrations supérieures à 50 mM, l'optimisation de leurs conditions réactionnelles a permis des synthèses énantiométriques à échelle semi-préparative du *cis*-(1*S*,2*R*)-2-méthylcyclohexylamine (**154**), *cis*-(1*S*,3*R*)-3-méthylcyclohexylamine (**66**), (2*S*)-pentan-2-amine (**99**), avec des rendements compris entre 35 et 40 %, et de forts excès énantiomériques (97-99 %). L'obtention de la structure tridimensionnelle de DH13B5 et DH13F8 a révélé un repliement très similaire à celui de DH2B1. La poche catalytique est cependant de plus petite taille et les résidus la constituant beaucoup plus hydrophobes. Un mécanisme réactionnel impliquant entre autres un résidu glutamate, conservé aussi dans DH2B1, a été postulé.

Afin de s'affranchir du système de recyclage, une étude sur l'utilisation de cofacteurs synthétiques (NCBs) avec les AmDHs découvertes a été menée en collaboration avec Dr Caroline E. Paul de l'Université de Wageningen. Bien que ces travaux n'aient pas été concluants du point de vue du couplage AmDHs/NCBs, ils ont donné lieu à un examen approfondi de la stabilité de ces NCBs mais aussi des cofacteurs NADH et NADPH, peu décrite dans la littérature.

Au total, 21 nouvelles AmDHs ont été trouvées et prouvées expérimentalement grâce à des recherches au sein de la biodiversité bactérienne. Cette méthode, basée sur la comparaison de séquence, a permis d'apporter une diversité de structures et de séquences aux AmDHs, jusqu'à présent uniquement obtenues par ingénierie des acide aminé déshydrogénases. Notre approche présente également l'avantage de générer de plus petites collections d'enzymes à cribler par rapport à une approche de mutation semi rationnelle. Cette stratégie peut donc être le point de départ pour la découverte de nouveaux châssis moléculaires, avant d'être complémentée par des analyses informatiques pour améliorer les activités existantes. Une telle approche, commencée avec DH2B1 pour modifier son spectre de substrats, pourrait également être envisagée dans les cas de DH13B5/F8 afin de lever les inhibitions par excès de substrats. Il serait également possible d'élargir la poche catalytique pour accéder à des transformations de cétones possédant deux substituants larges de part et d'autre du centre réactionnel.

L’immobilisation des enzymes pourrait être considérée pour augmenter leur activité et stabilité. Ce point sera étudié prochainement grâce à la venue d’Adam Caparco, doctorant dans l’équipe du Pr A. Bommarius du « Georgia Institute of Technology » (USA).

Des premiers travaux ayant montré une faisabilité d’un couplage entre réductases avec DH13B5, DH13F8 et C3UMY1, cette cascade est actuellement en cours de développement au laboratoire, en collaboration avec Dr Caroline E. Paul. Un des intérêts majeurs de cette réaction est le contrôle en une seule étape de deux centres asymétriques à partir d’une cétone α/β insaturée prochirale.

Enfin, la famille de 2029 AmDHs récemment mis en évidence par Dr Karine Bastard va faire l’objet d’études plus approfondies. La découverte d’enzymes possédant un spectre de substrats ou une stéréoselectivité différents peut par exemple attendue.

L’ensemble de ces travaux de thèse et toutes ces perspectives envisagées mettent bien en évidence l’interdisciplinarité de ce projet, mais plus globalement de la biocatalyse, où biologistes, bio-informaticiens, cristallographes et chimistes travaillent main dans la main pour concevoir une chimie plus respectueuse de l’environnement.

Partie expérimentale

1. GENERALS

1.1. CHEMICALS

All chemicals were purchased from commercial sources (Sigma Aldrich®, Enamine®, Acros Organics®) and used without additional purification. Glucose dehydrogenase (GDH) GDH105 was given by Codexis®. A sample of phosphate dehydrogenase (PTDH) was gratefully given by Pr. Marco Fraaije (University of Groningen).

1.2. EQUIPMENTS

Ion exchange column purification was performed on a Dowex®50WX8-200 mesh purchased from Sigma Aldrich

NMR spectra were recorded on a Bruker (Bruker, Billerica, USA) 300 or 600 MHz spectrometer (Evry University, France) for ¹H and ¹³C experiments. Chemical shifts (expressed in ppm) of ¹H spectra were referenced to the solvent peaks δ(H) = 4.79 for D₂O.

UHPLC-UV/MS analyzes were performed on a UHPLC U3000 RS 1034 bar system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) equipped with a DAD3000 diode array detector and a MSQ Plus™ Single Quadrupole Mass Spectrometer.

UHPLC-MS confirmation analyses of DH2 plate were performed on a U3000 RS 1034 bar (Thermo Fisher Scientific) coupled to a Hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass-spectrometer (QTRAP 5500 from ABSciex, Toronto, Canada).

Chiral GC-FID analyses were performed in two different conditions.

- **Condition A:** Gas Chromatograph Trace 1300 (Thermo Scientific) equipped with an autosampler injector AI/AS1310, a Flame Ionization Detector (FID) and a H₂ Generator Alliance (F-DGSi). Samples were injected on a CP-Chirasil Dex-CB column (25 m; 0.32 mm; 0.25 µm). Injector temperature 250 °C, split flow 56, split ratio 40, flame 320 °C, H₂ flow 30 ml.min⁻¹.

- **Condition B** (at Wageningen University): Gas Chromatograph HP 6890 (Hewlett packard) equipped with a Flame Ionization Detector (FID). Samples were injected on a Agilent DB-1 column (60 m; 0.25 mm; 0.25 µm). Injector temperature 220°C, split ratio 50:1, detector temperature 250 °C, flow 2.1 mL.min⁻¹, average velocity 45 cm.s⁻¹. Column oven program : 50 °C, for 2 min, ramp 5 °C.min⁻¹ to 150 °C, for 10 min, ramp 10 °C.min⁻¹ to 235 °C, for 3 min .

Enzymatic spectrophotometric screenings in microplates were performed on a SpectraMax Plus384 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) (**condition C**).

Spectrophotometric assays at Wageningen were recorded on a xMarkTM microplate spectrophotometer (Bio-Rad) (**condition D**).

Spectrophotometric assays were recorded on a Safas UVMC2 (Safas, Monaco) thermostated when specified with a refrigerated/heating circulator Corio CD-200F (Jubalo®, Seelbach, Germany) using microcells high-precision cell quartz with 0.6 or 10 mm light path (Hellma Analytics, Müllheim, Germany (**condition E**)).

Polarimetry measurements were done at 589 nm on a Unipol L Polarimeter (Schmidt + Haensch) equipped with a glass tube 50 mm.

Thin-layer chromatography (TLC) was performed with aluminium-backed sheets with silica gel 60 F254 (Merck). Column chromatography was performed on a CombiFlash® Companion using Redised® Rf cartridges.

2. ENZYME PRODUCTION

2.1. GENERAL PROCEDURE – LIC METHOD

The choice of the primers was based on the Primer3 program (Rozen and Skaletsky, 2000). Oligonucleotides were purchased from Sigma-Genosys. Specific extensions are added to the primers for cloning into our plasmid pET22b(+) (Novagen) modified for ligation independent cloning. The forward primers introduced a hexahistidine sequence in the proteins after the initial methionine when purification is planned. Plasmid were then introduced into *E. coli* BL21 (DE3) plysE strains (Invitrogen) for over-expression.

Transformed cells were grown of Terrific Broth (TB) medium containing 0.5 M sorbitol, 5 mM betaine, and 100 g/ml carbenicillin at 37 °C until reaching an A600. Isopropyl b-D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added at a concentration of 500 M to induce protein production, and the cells were further grown at 20 °C overnight. After centrifugation, the cells were washed and suspended in 50 ml of lysis buffer (50 mM phosphate, pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 % glycerol, and 10 mM imidazole) containing 1 mM Pefabloc SC and 22 µL of LysonaseTM bioprocessing reagent (Novagen) and sonicated using an Ultrasonic processor. After centrifugation, the cell-free extract was recovered.

2.2. 96 MICROWELL PLATE GENERATION

All steps from primers purchase to clarified cell free extract were performed in 96 microwell plates. After enzymes selection as described in the main text, each candidate was cloned and produced following the previous protocol (section 2.1.). After overexpression of the recombinant genes in *Escherichia coli* strain BL21, cells were lysed (100 mM phosphate buffer pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 % glycerol, 30 mM Imidazole, pefabloc 1 mM, lysonase) and total protein concentrations were determined by the Bradford method with bovine serum albumin as the standard (Bio-Rad). The samples were analyzed by SDS-PAGEs using the Invitrogen NuPAGE system and screen as described in section II.1.3.1.

2.3. SMALL SCALE PURIFICATION OF ENZYMES

After cloning and over expression of enzymes as described in section 2.1, their small scale purifications were conducted from a 2 x 50 mL culture by nickel affinity chromatography by loading the cell-free extract (8 mL) onto a Ni-NTA column (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. The elution buffer was 100 mM phosphate (pH 7.5), 50 mM NaCl, 250 mM imidazole and 10 % glycerol. The positive fractions were desalted using Amicon ultracel-10 K (Merck Millipore) with buffer containing 100 mM phosphate (pH 7.5), 50 mM NaCl and 10 % glycerol to obtain purified enzymes. Protein concentrations were determined by the Bradford method with bovine serum albumin as the standard (Bio-Rad). The samples were analyzed by SDS-PAGEs using the Invitrogen NuPAGE system. The purified proteins were stored at -80 °C.

2.4. LARGE SCALE PRODUCTION

2.4.1. General procedure

After cloning and over expression of enzymes as described in section 2.1, large-scale purification of DH2B1, DH13B5, DH13F8 et C3UMY1 were conducted from a 500 mL culture by nickel affinity chromatography in tandem with gel filtration (Hi Load 16/600 Superdex 200pg). The storage buffer was 50 mM phosphate pH 8.0, 50 mM NaCl, 15 % glycerol and 1 mM DTT. Protein concentrations were determined by the Bradford method with bovine serum albumin as the standard (Bio-Rad). The samples were analyzed by SDS-PAGEs using the Invitrogen NuPAGE system. The purified proteins were stored at -80 °C.

2.4.1. Purification of DH2B1 by heat treatment

Large scale purification of DH2B1 was done by heat treatment: cell free extracts (35 mL) were heated at 70 °C for 20 min. After centrifugation (12000 rpm, 4°C, 20 min), the supernatant containing the purified enzyme was taken. Protein concentrations were determined by the Bradford method with bovine serum albumin as the standard (Bio-Rad). The samples were analyzed by SDS-Page using the Invitrogen Nupage system. The purified proteins were stored at -80 °C.

2.5. PRODUCTION OF DH2B1 MUTANTS

QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent technology) was used for the production of enzyme variants (E102A, R161M, N163V, H197A, H264L, Q266A, N163V/R161M, mutant 13), with the native DH2B1 plasmid as template. Enzyme variant N163V/R161M/H264L was obtained using the DH2B1 variant N163V/R161M plasmid as template. Successful cloning and creation of the target mutations were confirmed by sequencing. Crude-cell lysates of all the enzyme variants were produced as described above (Section 2.3.).

Table S 1 : Primers for the production of DH2B1 mutants.

Mutations	Primers	Séquence
E102A	Forward (F)	CGTAATTACCATTTGCT GCG GAATGGCCTTCC
	Reverse (R)	GGAAAGGCCATTTC CGC AGCAATGGTAATTACG
N135V	Forward (F)	GTTTAGGGACTGGCGTAGT G CCAGGGTTTGTC
	Reverse (R)	GGACAAACCTGG CACT ACGCCAGTCCCTAAAC
R161M	Forward (F)	GAGAATTAAGGCTGCC ATG ATTAATGATCTTCGCCTTCGC
	Reverse (R)	GCGAAAGGCCAAAGATCATTAAT CAT GGCAGCCTTAATTCTC
N163V	Forward (F)	GAGAATTAAGGCTGCCAGAATT GTG GATCTTCGCCTTCGC
	Reverse (R)	GCGAAAGGCCAAAGAT CCA ATTCTGGCAGCCTTAATTCTC
H197A	Forward (F)	GCGGAAAGATAGTAGG TG CGATAGGGTTGAACAG
	Reverse (R)	CTGTTCAAACCTAT CGC ACCTACTATCTTCGC
H264L	Forward (F)	GTTGATAGAACCTTGAG CTCC TCAGCAGGTACTTCC
	Reverse (R)	GGAAGTACCTGCTGAGGG GAG CTCAAGTTCTATCAC
Q266A	Forward (F)	GATAGAACCTGAGCATC TG CGAGGTACTCCCCATTAG
	Reverse (R)	CTAAATGGGGAAAGTACCTG CGC AGGATGCTCAAGTTCTATC
R161M- N163V	Forward (F)	GAGAATTAAGGCTGCC ATG ATT GTG GATCTTCGCCTTCGC
	Reverse (R)	GCGAAAGGCCAAAGAT CCA AT CAT GGCAGCCTTAATTCTC

3. ENZYMATIC ACTIVITIES BY SPECTROPHOTOMETRIC ANALYSES

3.1. ENZYMATIC SCREENING ASSAY

All reactions (reaction mixture described below according to the nature of the plate screened) were conducted at 25 °C in 96-microwell plates (**condition C**), using the cell free extract obtained as previously described (Section 2.2). Absorbance at 340 nm was measured immediately and monitored for 1 h. A background plate was established in the same manner but with a mixture lacking substrate. An active enzyme corresponds to a well exhibiting a higher slope (0 – 500 s) in the reaction well over the background well. An estimated specific activity was calculated according to Beer-Lambert's law, molar absorptivity of β-NADH ($\varepsilon = 6\,220\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) and total protein concentration. All tested enzymes were listed in Annexe 10.

3.1.1. Screening of DH2 plate (II.1.3.3)

Condition for the reductive amination reactions: to a reaction mixture (100 µL) containing 46 mM of ketone substrate, 0.5 mM of NADH and 0.5 mM of NADPH in 225 mM NH₄Cl/NH₄OH buffer pH 9.8 was added 30 µL of cell free extract. Screened substrates: **95, 96, 72, 100, 60, 105, 107**.

Condition for the oxidative deamination reactions: to a reaction mixture (100 µL) containing 50 mM of amine substrate, 0.5 mM of NAD⁺ and 0.5 mM of NADP⁺ in 100 mM NaHCO₃/Na₂CO₃ buffer pH 9.8 was added 30 µL of cell free extract. Screened substrates: **93, 89, 99**.

UHPLC-MS confirmation: To a reaction mixture (50 µL) containing 10 mM of ketone substrate, 4 mM of NADH and 4 mM of NADPH in 225 mM NH₄Cl/NH₄OH buffer (pH 9.8) was added 7.5 µL of cell free extract. The reaction mixture was stirred at 30 °C (500 rpm). After the specified period of time (2 h for **95** or 3 days for **100**), an aliquot (4 µL) was diluted in 396 µL of UHPLC mobile phase (2/8 (NH₄)₂CO₃ 10 mM / ACN), filtered on 0.22 µm, and analyzed by UHPLC-MS following conditions detailed in section 4.1. A background reaction was performed in the same manner but with a mixture lacking the cell free extract. MS-calibration curves based on MRM responses were established with commercially available racemic amines **97** and **102**.

3.1.2. Screening of plate generated by 3D-guided structure approach (III.2)

Condition for the reductive amination reactions: to a reaction mixture (100 µL) containing 50 mM of ketone substrate (25 mM for pentanal), 0.5 mM of NADH and 0.5 mM of NADPH in 200 mM NH₄Cl/NH₄OH buffer pH 8.0 was added 30 µL of cell free extract. Screened substrates: **61, 69, 72, 118**.

Condition for the oxidative deamination reactions: to a reaction mixture (100 µL) containing 50 mM of amine substrate, 0.5 mM of NAD⁺ and 0.5 mM of NADP⁺ in 100 mM NaHCO₃/Na₂CO₃ buffer pH 9.5 was added 30 µL of cell free extract. Screened substrates: **42, 70, 88, 99, 119**.

3.1.3. Screening of DH12 and DH13 plates (III.3.2)

Condition for the reductive amination reactions: to a reaction mixture (200 µL) containing 50 mM of ketone substrate (10 mM for **93**), 0.5 mM of NADH and 0.5 mM of NADPH in 200 mM NH₄Cl/NH₄OH buffer pH 8.0 was added 20 µL of cell free extract. Screened substrates: **93, 96**.

Condition for the oxidative deamination reactions: to a reaction mixture (200 µL) containing 50 mM of amine substrate (10 mM for the natural substrate X), 0.5 mM of NAD⁺ and 0.5 mM of NADP⁺ in 100 mM NaHCO₃/Na₂CO₃ buffer pH 9.5 was added 20 µL of cell free extract. Screened substrates: **1, 88, 91, 97** and **99**.

3.1.4. Screening of DH14 plate (III.3.1.2)

Condition for the reductive amination reactions: to a reaction mixture (100 µL) containing 50 mM of ketone substrate (20 mM for acetophenone **59**), 0.5 mM of NADH and 0.5 mM of NADPH in 200 mM NH₄Cl/NH₄OH buffer pH 8.0 was added 20 µL of cell free extract. Screened substrates: **59, 72, 107**.

Condition for the oxidative deamination reactions: to a reaction mixture (100 µL) containing 50 mM of amine substrate, 0.5 mM of NAD⁺ and 0.5 mM of NADP⁺ in 100 mM NaHCO₃/Na₂CO₃ buffer pH 9.5 was added 20 µL of cell free extract. Screened substrates: **1, 104, 110**.

3.2. HITS VALIDATION

Selected hits from enzymatic screening assay were purified (section 2.3) for verification by spectrophotometric assay (**condition E**). The reactions were conducted in spectrophotometric cell (10 mm light path) in a final reaction volume of 100 µL, at room temperature. A background reaction was established in the same manner but with a mixture lacking substrate. An active enzyme corresponds to a reaction exhibiting a higher slope (0 – 300 s) than the background one.

3.2.1. Hits from screening of plate generated by 3D-guided structure approach (III.2.2)

Four enzymes were successfully purified and tested toward their respective hits substrates. Str_C5 was tested toward **72** and **118**. Str_D3 was tested toward **61**, **118**, **121**, and **119**. Str_C6 and Str_D6 were tested toward **61**, **72** and **99**.

Reductive amination reaction: To a mixture of 200 mM NH₄Cl/NH₄OH buffer pH 9.0, and a mix of NADH/NADPH 1/1 (0.2 mM) was added 0.1-0.5 mg.mL⁻¹ of purified enzyme. 5 mM of ketone substrate was then added to initiate the reaction. A reaction without ammonium source (200 mM carbonate buffer pH 9.0) was also carried out in order to verify ADH activity with tested enzyme.

Oxydative deamination / Oxydation reaction: To a mixture of 200 mM carbonate buffer pH 9.0, and a mix of NAD⁺/NADP⁺ 1/1 (0.2 mM), was added 0.1-0.5 mg.mL⁻¹ of purified enzymes. 5 mM of amine/alcohol substrate was then added to initiate the reaction.

3.2.2. Hits from screening of DH12 and DH13 plates (III.3.2)

Five enzymes were successfully purified and tested toward their respective hits substrates. DH12C12 was tested toward **59** and **61**. DH12F3 was tested toward **59**. DH13G10 was tested toward **72**. DH13B5 was tested toward **72**, **59** and **61**. DH13D7 and DH13F8 were tested toward **72** and **61**.

Reductive amination reaction: To a mixture of 200 mM NH₄Cl/NH₄OH pH 8.2, and a mix of NADH/NADPH 1/1 (0.2 mM) was added 0.1-0.5 mg.mL⁻¹ of purified enzyme. 10-50 mM of ketone substrate was then added to initiate the reaction. A reaction without ammonium source (200 mM carbonate buffer pH 8.0) was also carried out with the cyclohexanone in order to verify ADH activity with tested enzyme.

3.2.3. Hits from screening of DH14 plate (III.3.1.2)

Eight enzymes were successfully purified and tested toward their respective hit substrates. DH14A5, DH14F2 and DH13F7 were tested toward **1** and **99**. DH14B8 and DH14C5 were tested toward **1**, **99**, **59** and **72**. DH14D4, DH14E7 and DH14F3 were tested toward **59** and **72**.

Reductive amination reaction: To a mixture of 100 mM NH₄Cl/NH₄OH buffer pH 8.0, and a mix of NADH/NADPH 1/1 (0.2 mM) was added 0.1-0.4 mg.mL⁻¹ of purified enzyme. 10-30 mM of ketone substrate was then added to initiate the reaction. A reaction without ammonium source (200 mM carbonate buffer pH 9) was also carried out in order to verify ADH activity with tested enzyme.

Oxydative deamination: To a mixture of 100 mM carbonate buffer pH 9.5, and a mix of NAD⁺/NADP⁺ 1/1 (0.4 mM), was added 0.1-0.5 mg.mL⁻¹ of purified enzyme. 10-30 mM of amine substrate was then added to initiate the reaction.

3.2.4. Candidates enzymes for reported natural AmDH activity (III.3.1.1)

A0A0L8M195 (SVG1) and A0A0L8N6M2 (SVG2) from *Streptomyces virginiae* (Strain DSM 40094), A0A0F4XNA3 (PKC1) from *Pseudomonas kilonensis* (strain DSM 13647) were tested on **59, 72, 107, 1, 99 and 110**.

Reductive amination reaction: To a mixture of 200 mM NH₄Cl/NH₄OH buffer pH 8.0, and a mix of NADH/NADPH 1/1 (0.2 mM) was added 0.1-0.5 mg.mL⁻¹ of purified enzyme. 10-30 mM of ketone substrate was then added to initiate the reaction.

Oxydative deamination: To a mixture of 100 mM carbonate buffer pH 9.5, and a mix of NAD⁺/NADP⁺ 1/1 (0.2-1 mM), was added 0.1-0.5 mg.mL⁻¹ of purified enzymes. 10-30 mM of amine substrate was then added to initiate the reaction.

3.3. SPECIFIC ACTIVITY DETERMINATION

Specific activities of purified enzymes were determined for the reductive amination reaction by spectrophotometric assay as described in Section II.2.1.1. Unless otherwise specified, the reactions were conducted at 340 nm in spectrophotometric cell (10 mm light path) in a final reaction volume of 100 µL, at specified temperature (**condition E**). The specific activity was determined from the measured slope according to Beer-Lambert's law and molar absorptivity of β-NADH ($\epsilon = 6,220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) using the average values from the triplicate experiments.

3.3.1. Biochemical characterization of DH2B1 (II.3)

3.3.1.1. Substrate scope of DH2B1 (II.3.2)

All reactions were performed in triplicate with thermostated spectrophotometer set at 60 °C. To a reaction medium containing a solution of a 20-100 mM solution of ketone substrates (**59, 60, 72, 93, 95, 96, 100, 105 and 107**) in 300 mM NH₄Cl/NH₄OH buffer (NH₄Cl/NH₄OH pH 9.7) preheated at 60 °C during 5 min, was added a solution of 0.2 mM NADH following by 0.5 mg.mL⁻¹ of DH2B1 pre-incubated at 60 °C during 5 min.

3.3.1.2. Activity vs temperature (II.3.3)

All reactions were performed in triplicate. A reaction mixture of ketone **95** (100 mM) in NH₄Cl/NH₄OH buffer (300 mM NH₄Cl/NH₄OH pH 7.2), heated to the specified temperature in a ThermoMixer® Eppendorf, was added to a thermostated spectrophotometric cell set up at the specified temperature and containing NADH (0.2 mM) and the enzyme DH2B1 (1 mg.mL⁻¹) purified by heat treatment (reaction final volume 100 µL).

3.3.1.3. Thermostability (II.3.4)

All reactions were performed in triplicate. To a reaction medium containing 100 mM of 4-oxopentanoic acid (**95**) in 300 mM NH₄Cl/NH₄OH buffer pH 7.2) preheated at 60 °C during 5 min, was added a solution of 0.2 mM NADH following by 0.5 mg.mL⁻¹ of DH2B1 purified by heat treatment previously incubated for the specified period of time at specified temperature. Residual activity was measured at 60 °C as described above.

3.3.2. DH2B1 mutants and homologs (II.6.2.4)

The reactions were conducted in a spectrophotometric cell (6 mm light path). The term homolog used below designates DH2A7, DH2A10, DH2B9, DH2C5, DH2C7, DH2D2.

*Protocol for DH2B1 homologs toward **93** and **95**:* To a mixture of 2 M ammonium formate buffer pH 8.5, and 0.3 mM NADH, was added 0,01-0,2 mg.mL⁻¹ of purified enzyme. 0,5 mM (**93**) or 0,5 M (**95**) respectively was then added to initiate the reaction.

*Protocol for DH2B1 mutants toward **93**:* To a mixture of 2 M ammonium formate buffer pH 8.5, and 0.3 mM NADH, was added 0.1 µg.mL⁻¹ of purified enzyme. 0,5 mM of **93** was then added to initiate the reaction.

*Protocol for DH2B1 mutants toward **95** and **72**:* To a mixture of 2 M ammonium formate buffer pH 8.5 and 0.3 mM NADH, was added 0.2-200 µg.mL⁻¹ of purified enzyme. 0,5 M (0,1 M) of **95** (**72**) was then added to initiate the reaction. The spectrophotometer was thermostated at 50 °C and the reaction mixture preincubated at 50 °C before addition of substrate.

3.3.3. Biochemical characterization of DH13B5/F8, C3UMY1 and E3CZE3

3.3.3.1. Carbonyl substrate scope of DH13B5/F8, C3UMY1 and E3CZE3 (IV.1.1.1)

All reactions were conducted at 340 nm in duplicate or in triplicate in the case of DH13B5 and DH13F8.

To a mixture of ammonium formate buffer (2 M ammonium formate, pH 9.5), and NADH or NADPH (0.2 mM) was added an appropriate amount of purified enzyme (0.01 – 0.5 mg.mL⁻¹). Carbonyl-containing compound (**61**, **124**, **62**, **128**, **129**, **125**, **126**, **130**, **131**, **132**, **133**, **107**, **72**, **134**, **73**, **135**, **136**, **137**, **59**, **54**, **138**, **139**, **140**, **96**, **141**, **142**, **143**, **144**, **145**, **95**, **93**, **146**, **147**, **148**, **118**, **149**, **150**, **151**, **152**, **153** or **154**) (10 mM) was then added to initiate the reaction.

3.3.3.2. Amine substrate scope of DH13B5/F8, C3UMY1 and E3CZE3 (IV.1.1.2)

All reactions were performed in duplicates in case of negative amine substrate and in triplicate otherwise. In the case of methylamine as amine source, the procedure was as follow: to a mixture of TRIS.HCl buffer (50 mM, pH 9.5), NADH/ NADPH (0.1 mM each), and methylamine (500 mM) was added an appropriate amount of purified enzyme (0.02 – 0.2 mg.mL⁻¹). Carbonyl-containing compound **61** or **150** (5 mM) was then added to initiate the reaction.

3.3.4. Effect of pH and number of amine equivalents one activity with C3UMY1 (IV.1.2)

All reactions were performed in triplicate. To a mixture of TRIS.HCl or potassium phosphate buffer (50 mM, pH 5.9 – 12.4), NADPH (0.2 mM) and methylamine **55** (2 or 50 eq.), was added 0.02 mg.mL⁻¹ of purified C3UMY1. Isobutyraldehyde **150** (10 mM) was then added to initiate the reaction.

3.4. KINETIC PARAMETER DETERMINATION (II.3.5, II.6.2, IV.1.3)

Kinetic parameters were determined by spectrophotometric NAD(P)H-monitoring in the forward (reductive amination) direction at 340 nm. All reactions were performed in duplicate, in ammonium formate buffer pH 8.5 or 9.0 (or 50 mM carbonate buffer pH 9.0 when specified) in a final volume of 100 µL at room temperature (approximately 23 °C) or at 50 °C when specified, in spectrophotometer cell with optical paths of 0.6 or 1 cm, depending on the saturated concentration of NADH or NADPH. Initial rates of the reaction were measured with various concentrations of substrate and saturated concentrations of the other substrates. Data were fitted to the Michaelis and Menten equation or Hill

equation, using Sigma Plot software. Allosteric profil were confirmed by the modelisation of “Single Rectangular, 2 parameters”, allosteric profil with “Sigmoidal Hill, 3 Parameters”. For each condition and graphs, see section 9.1.

3.5. DETERMINATION OF AMMONIA CONCENTRATION (II.4.2)

Reactions were conducted at 340 nm in spectrophotometric cell (10 mm light path) in a final reaction volume of 100 µL, at room temperature (condition E), according to the following protocol (Figure S 1): to a solution containing 100 mM of phosphate buffer pH 8.0, 1 mM of ADP, 0.2 mM of NADH and 5 mM of the synthesized product was added 2 mg.mL⁻¹ of glutamate dehydrogenase. α-ketoglutarate (10 mM) was then added to initiate the reaction, and the difference in absorbance was measured after stabilization of absorbance. The amount of ammonia was deduced from a calibration curve obtained in the same conditions with NH₄Cl and commercial amine.

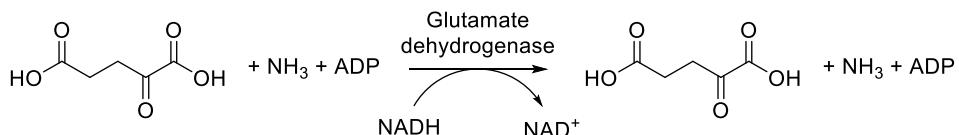


Figure S 1 : Spectrophotometric test for the determination of NH₄Cl amount in purified product 91 or 97.

3.6. COSOLVANT STUDY – (V.1.2.1 – WAGENINGEN)

All reactions were conducted at room temperature in 96-microwell plates (condition D). To a reaction mixture (100 µL) containing 1 M ammonium formate buffer pH 9, 0.4 mM NAD(P)H, 5 mM cyclohexanone (**91**) or 4-oxopentanoic acid (**95**) for DH2B1 was added 0.05-0.1 mg.mL⁻¹ of enzyme. The reaction was monitored for 3 h by spectrophotometry and the specific activity was calculated according to Beer-Lambert's law, molar absorptivity of β-NADH ($\epsilon = 6\ 220\ M^{-1}\ cm^{-1}$).

3.7. COFACTOR STABILITY – (V.2.1.1 – WAGENINGEN)

All reactions were conducted at room temperature in 96-microwell plates (condition D). The absorbance at 340 nm of a solution (200 µL) containing buffer, at specified concentration and pH, and 0.4 mM NAD(P)H or reduced NCB, was monitored for 5 h. NCBs decomposition were calculated according to Beer-Lambert's law, molar absorptivity of β-NADH ($\epsilon = 6\ 220\ M^{-1}\ cm^{-1}$). Molar absorptivity of NCBs was estimated to be the same of NAD(P)H.

3.8. REACTION WITH NCBs – (V.1 – WAGENINGEN)

All reactions were conducted at room temperature in 96-microwell plates (condition D). Absorbance at 340 nm was measured immediately and monitored for 4-5 h by spectrophotometry. Blank reactions were established in the same manner but with a mixture lacking substrate and enzyme. Specific activities were calculated according to Beer-Lambert's law, molar absorptivity of β -NADH ($\epsilon = 6\ 220\ M^{-1} \cdot cm^{-1}$) and protein concentration, after deducting slope of blank reaction. Molar absorptivity of NCBs was estimated to be the same of NAD(P)H. Reduced NCBs were dissolved in DMSO, at 50 mM final concentration.

Reductive amination reaction: To a solution (100 μ L) containing 1 M ammonium formate buffer pH 9.0, 5 mM of ketone substrate, 0.4 mM of NAD(P)H or reduced NCB, was added 0.05-0.1 mg.mL⁻¹ of purified enzymes. Tested substrates: **61, 124, 150** and only **95** in case of reaction with DH2B1.

Oxydative deamination: To a solution (100 μ L) containing 100 mM carbonate buffer pH 9.0, 5 mM of amine substrate, 10 mM of NAD(P)⁺ or oxydized NCB⁺, was added 0.05-0.1 mg.mL⁻¹ of purified enzymes. Tested substrates: **88, 154, 156** and only **97** in case of reaction with DH2B1.

3.9. STUDY OF AMDH INHIBITION BY NCBs (V.1.2.3 - WAGENINGEN)

All reactions were conducted at room temperature in 96-microwell plates (condition B). Absorbance at 340 nm was measured immediately and monitored by spectrophotometry. Blank reactions were established in the same manner but with a mixture lacking substrate and enzyme. Specific activities were calculated according to Beer-Lambert's law, molar absorptivity of β -NADH ($\epsilon = 6\ 220\ M^{-1} \cdot cm^{-1}$) and protein concentration, with the initial slope after deducing the slope of blank reaction. Reduced NCBs were dissolved in DMSO, at 50 mM final concentration.

Reductive amination reaction: To a solution (100 μ L) containing 1 M ammonium formate buffer pH 9, 5 mM of ketone substrate, 0.2 mM of NAD(P)H, 0.2 mM of reduced NCB, was added 0.05-0.1 mg.mL⁻¹ of purified enzymes. Tested substrates: **61, 124, 150**, and only **95** in case of reaction with DH2B1.

Oxydative deamination: To a solution (100 μ L) containing 100 mM carbonate buffer pH 9, 5 mM of amine substrate, 1 mM of NAD(P)⁺ and 1 mM oxydized NCB⁺, was added 0.05-0.1 mg.mL⁻¹ of purified enzymes. Tested substrates: **88, 154, 157** and only **97** in case of reaction with DH2B1.

4. ANALYTICAL METHODS

4.1. UHPLC-MS (QTRAP) CONFIRMATION ANALYSES OF DH2 SCREENING

UHPLC-MS analyses were conducted on a Zic-pHilic (Merck) column (100 x 4.6 mm; 5 µm) with the following conditions : mixture of (NH₄)₂CO₃ 10 mM / ACN as eluent with a linear gradient (ratio 20/80 to 60/40 in 10 min, then 60/40 during 6 min); flow 0.5 mL·min⁻¹; temperature 40 °C; injection volume 10 µL. MS parameters (Qtrap): ion source 5500 V, curtain gas 20 a.u., temperature 450 °C, gas1 45 a.u., gas2 60 a.u., CAD – medium; MRM (multiple reaction monitoring) scan type using multiple ion transitions in positive mode

4.2. SPECTROFLUORIMETRY

4.2.1. Spectrofluorimetric screening without derivatization step (III.1.2.1)

All reactions were conducted at 25 °C in 96-microwell plates, in the cell free extract obtained as previously described (Section 2.2). To a solution (100 µL total volume) containing 200 mM NH₄Cl/NH₄OH pH 9.7, 0.5 mM NADPH, 0.5 mM NADH, and 46 mM of 4-oxopentanoic acid **95**, was added 30 µL of cell free extract. Fluorescence was measured immediately and monitored for 2 h ($\lambda_{\text{excitation}} = 363$ nm, $\lambda_{\text{emission}} = 458$ nm, photomultiplier (PM) = 390 V). A background plate was established in the same manner but with a mixture lacking substrate. An active enzyme corresponds to a well exhibiting a higher slope (0 – 500 s) in the reaction well over the background well.

4.2.2. Spectrofluorimetric screening with NDA derivatization (III.1.2.2)

To a reaction mixture (100 µL) containing 20 mM of 4-oxopentanoic acid **95**, 0.4 mM of NADH and 0.4 mM of NADPH, 40 mM of glucose-6-phosphate, 3 U·mL⁻¹ of G6PDH in 200 mM NH₄Cl/NH₄OH buffer (pH 9.7) was added 20 µL of cell free extract. The reaction mixture was stirred at room temperature (400 rpm). After 20 h, an aliquot (10 µL) was diluted in 50 µL of water. Then 40 µL of borate buffer (10 mM), 5 µL of NaCN (50 mM) and 5 µL of NDA **115** (5 mM) were added. Fluorescence was measured immediately ($\lambda_{\text{excitation}} = 418$ nm, $\lambda_{\text{emission}} = 480$ nm, photomultiplier (PM) = 390 V). A background plate was established in the same manner but with a mixture lacking substrate. An active enzyme corresponds to a well exhibiting a higher fluorescence in reaction well compared to blank well.

All materials in contact with NaCN were put in 3 volumes of a solution containing 1 volume of NaOH 1 M and 2 volumes of NaOCl 5.25 % during 3 h before to be thrown out.

4.3. **DERIVATIZATION PROCEDURES AND UHPLC ANALYSES**

4.3.1. **Procedure for derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (DNFB)**

To 10 µL of reaction mixture were added 10 µL of a 1 M Na₂CO₃ aqueous solution, 50 µL of a 1 M NaHCO₃ aqueous solution and 40 µL of a 5 mM DNFB solution in EtOH. The mixture was stirred (400 rpm) at 65 °C for 1 h and then quenched by 50 µL of a 1 M HCl aqueous solution, filtered (0.22 µm), and analyzed by UHPLC-UV (Conditions: Kinetex® F5 (Phenomenex) column (100 x 2.1 mm; 1.7 µm). mixture of ACN/H₂O + 0.1% formic acid as eluent with a linear gradient (ratio 30/70 during 2 min, then 30/70 to 80/20 in 2.5 min, then 80/20 during 0.5 min followed by re-equilibration time); flow 0.5 mL·min⁻¹; temperature 25 °C; injection volume 1 µL; UV detection at λ = 360 nm).

4.3.2. **Procedure for derivatization with (S)-2-(5-fluoro-2,4-dinitrophenylamino)propanamide (FDAA)**

To 20 µL of reaction mixture were added 8 µL of a 1 M NaHCO₃ aqueous solution and 20 µL of a 15 mM FDAA solution in EtOH. The mixture was stirred (400 rpm) at 50 °C for 1 h and then quenched by 4 µL of 2 M HCl aqueous solution and centrifuged (10 min, 10000 rpm) to remove proteins. The resulting supernatant (25 µL) was diluted in ACN (75 µL), filtered (0.22 µm), and analyzed by UHPLC-UV with the following methods.

Condition F (for 4-aminopentanoic acid **97** and 2,4-diaminopentanoic acid **91**): UHPLC-UV analyses were performed using a Kinetex® F5 (Phenomenex) column (100 x 2.1 mm; 1.7 µm). Conditions: mixture of ACN/H₂O + 0.1 % formic acid as eluent with a linear gradient (ratio 10/90 during 2 min, then 10/90 to 50/50 in 5 min, then 50/50 to 100/0 during 2 min followed by re-equilibration time); flow 0.5 mL·min⁻¹; temperature 25 °C; injection volume 1 µL; UV detection at λ = 340 nm

Condition G (other substrates): UHPLC-UV analyses were performed using a Kinetex® F5 (Phenomenex) column (100 x 2.1 mm; 1.7 µm). Conditions: mixture of MeOH/H₂O + 0.1% formic acid 70:30 as eluent with an isocratic method (10 min); flow 0.3 mL·min⁻¹; temperature 25 °C; injection volume 1 µL; UV detection at λ = 340 nm.

4.3.3. Procedure for derivatization with benzoyl chloride (BzCl)

To 20 µL of reaction mixture were added 10 µL of a 1 M Na₂CO₃/NaHCO₃ aqueous solution pH 10,5, 40 µL of H₂O, and 30 µL of a 50 mM BzCl solution in acetonitrile. The mixture was vortexed for 30 s and then quenched by the addition of 20 µL of a 1 M HCl aqueous solution and 30 µL of a 1/1 solution of H₂O/acetonitrile. After centrifugation (10 krpm, 10 min, ambient temperature) and filtration (0.22 µm), the mixture was analyzed by UHPLC-UV-MS according to the conditions described below.

Condition H : UHPLC-UV-MS analyses were performed using a Kinetex® F5 (Phenomenex) column (100 x 2.1 mm; 1.7 µm). Conditions: mixture of ACN/H₂O + 0.1% formic acid as a linear gradient (ratio 20/80 during 1 min, then 20/80 to 100/0 in 10 min, then 100/0 during 2 min followed by re-equilibration time); flow 0.5 mL·min⁻¹; temperature 25 °C; injection volume 3 µL; UV detection at λ = 250 nm; MS detection: polarity +eV, cone 75V, ionization method : ESI.

Condition I : (for **66, 99, 154**) UHPLC-UV(-MS) analyses were performed using a Kinetex® F5 (Phenomenex) column (100 x 2.1 mm; 1.7 µm). Conditions: mixture of ACN/H₂O + 0.1 % formic acid as a linear gradient (ratio 20/80 during 1 min, then 20/80 to 70/30 in 3 min, then 70/30 during 2 min followed by re-equilibration time); flow 0.5 mL·min⁻¹; temperature 25 °C; injection volume 3 µL; UV detection at λ = 250 nm.

4.3.4. UHPLC analysis of 2,4-DAP-containing reaction mixture

To 100 µL of reaction mixture were added 1 µL of trifluoroacetic acid (TFA). After centrifugation (10 min at 10 krpm, ambient temperature), 40 µL of the supernatant were diluted in 120 µL of elution buffer (ammonium formate 20 mM pH 3.6), filtered (0.22 µM) and analyzed by UHPLC-ELSD (Zic pHilic® (Merck) column (4.6 x 150 mm; 5 µm); mixture of ammonium formate pH 3.6, 20 mM/ACN as a linear gradient (ratio 20/80 to 60/40 in 15 min, then 60/40 during 7 min following by re-equilibration time); flow 0.5 mL·min⁻¹; temperature:30 °C; injection volume 10 µL; ELSD parameters : T_{eva} = 70 °C; T_{eb} = 40 °C; attenuation = 5.

4.4. GC-FID ANALYSES

4.4.1. Procedure for acetic anhydride derivatization (for pentan-2-amine 99)

15 µL of a solution of KOH 10 N and 400 µL of dichloromethane were added to 40 µL of the reaction mixture containing pentan-2-amine **99**, and the organic phase (350 µL) was taken and dried over MgSO₄.

The resulting dried solution was derivatized with 20 µL of acetic anhydride solution (50 mg DMAP / ml of acetic anhydride) 30 min at room temperature, stirring at 700 rpm. After addition of 150 µL of water and 10 min stirring at room temperature, the organic phase was dried (MgSO_4), filtered on 0.22 µm, and analyzed by chiral GC-FID (**condition A**) to determine the enantiomeric excess according to the order of retention reported by Knaus et al. on the same column (Knaus, Böhmer, *et al.*, 2017). GC oven conditions: 100°C (2 min), 1°C/min to 118°C (5 min), 25°C/min to 180°C.

4.4.2. Procedure for trifluoroacetic anhydride derivatisation (2- and 3-methylcyclohexylamine 154 and 66)

15 µL of a solution of KOH (10 N) and 300 µL of ethyl acetate were added to 40 µL of the reaction mixture containing either 2- or 3-methylcyclohexylamine **154** or **66**, and the organic phase (250 µL) was taken and dried over MgSO_4 . The resulting dried solution was derivatized with 20 µL of pure trifluoroacetic anhydride 1 h at 30 °C. After addition of 300 µL of a saturated solution of NaHCO_3 and 30 min stirring at room temperature, the organic phase was dried (MgSO_4), filtered on 0.22 µm and analyzed by chiral GC-FID (**condition A**) to determine the diastereoisomeric excess and the *cis/trans* ratio. GC oven conditions: 100 °C (2 min), 2 °C/min to 112.5 °C, 25 °C/min to 180 °C (2 min). For 2-methylcyclohexylamine **154**, the order of retention times of each diastereoisomer was reported by Richter *et al.* on the same column (Richter *et al.*, 2015). For 3-methylcyclohexylamine **66**, the order of retention times was assigned according to our enzymatically synthesized product whose stereochemistry was confirmed by NMR taking into account the known stereochemistry on the carbon bearing formed amine.

5. ANALYTICAL BIOCATALYTIC REACTIONS

5.1. HIT VALIDATION AND EE (ED) DETERMINATION

All purified enzymes were tested in analytical biocatalytic reaction with the following protocol.

To a reaction mixture (total volume = 100 µL) containing 10 mM ketone substrate, 0.2 mM NADPH, 0.2 mM NADH, 11 mM glucose, 3 U/ml glucose dehydrogenase from Codexis (GDH105) in 200 mM $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ buffer (pH 8.5) was added 0.1-0.5 mg.mL⁻¹ of small-scale purified enzyme. The reaction was shaken at 400 rpm for 48 h at 30 °C. One reaction without enzyme and one without substrate were carried out in the same conditions. Enzymes from thermophilic organism were also tested at 50-60 °C.

The reaction mixture was monitored by UHPLC-UV/MS after derivatization with the appropriate protocol depending on the expected amine product, according to methods described in paragraph 4.3.

The resulting analyzes were compared to analyzes obtained with the corresponding commercial amines derivatized according to the same procedure. Tested enzymes / substrates pairs were summarized in Table S2.

Table S 2 : All purified enzymes which are tested towards various substrates in biocatalytic synthesis with recycling system. ¹ enzymes from thermophilic organism.

Enzymes	Screening	Tested substrates	Derivatization/analysis
DH12C12	2,4-DAPDH	59, 61	Condition H
DH12F3	2,4-DAPDH	59	Condition H
DH12G10 ¹	2,4-DAPDH	72	Condition H
DH13B5	2,4-DAPDH	61,59,152,107,118,126,124,62,72	Condition H / Condition G
DH13D7 ¹	2,4-DAPDH	72	Condition H
DH13E5 ¹	2,4-DAPDH	61,72	Condition H
DH13E8 ¹	2,4-DAPDH	61,72	Condition H
DH13F8	2,4-DAPDH	61, 59, 152, 107, 118, 126, 124, 62, 72	Condition H / Condition G
DH14A5 ¹	ODH	59, 72	Condition H
DH14B8	ODH	59, 72	Condition H
DH14C5	ODH	59, 72	Condition H
DH14D4	ODH	59, 72	Condition H
DH14E7 ¹	ODH	59, 72	Condition H
DH14F2 ¹	ODH	59, 72	Condition H
DH14F3 ¹	ODH	59, 72	Condition H
DH14F7	ODH	59, 72	Condition H
Str_C5	3D-structure guided	72, 118	Condition H
Str_C6 ¹	3D-structure guided	72	Condition H
Str_D3	3D-structure guided	61, 72	Condition H
Str_D6	3D-structure guided	72	Condition H
PKC1	Patent	59,72	Condition H
SVF2	Patent	59, 72	Condition H
SVG1	Patent	59, 72	Condition H

5.2. REACTION OF PENTAN-2-ONE WITH DH2B1 VARIANT N135V/N163V/R161M/H264L

To a reaction mixture (total volume = 100 µL) containing 50 mM of pentan-2-one **72**, 0.4 mM NADH, 3 U/ml FDH in 2 M NH₄OH/NH₄COOH buffer (pH 8.5) was added 0.3 mg.mL⁻¹ of small-scale purified DH2B1 variant N135V/N163V/R161M/H264L. The reaction was shaken at 400 rpm for 24 h at 50 °C. The reaction mixture was monitored by UHPLC-UV/MS after derivatization with benzoyl chloride (BzCl) (**Condition I**). The enantiomeric excess was determined after derivatization with acetic anhydride for detection by chiral GC-FID (**condition A**) (section 4.4.1).

5.3. OPTIMIZATION FOR SEMI-PREPARATIVE SCALE ENZYMATIC REACTIONS

5.3.1. Optimization for (4S)-4-aminopentanoate ((4S)-97) biocatalytic synthesis (II.4.1)

Unless otherwise specified, reactions were performed in 100 µL total volume and monitoring by UHPLC-UV after DNFB derivatization of sample taken as previously described (Section 4.3.1.) at 24 and 48 h. Concentration of amine in reaction mixtures were deduced from calibration curves obtained after DNFB derivatization of standard commercial amines in presence of the same buffer.

5.3.1.1. Cofactor selection

To a solution containing 100 mM sodium carbonate buffer pH 9.5, 10 mM NADH or NADPH, 200 mM NH₄Cl and 10 mM 4-oxopentanoic acid (**95**) was added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH2B1. The reaction mixture was stirred at 400 rpm, 30 °C for 48 h.

5.3.1.2. Temperature without recycling system

To a solution containing 100 mM sodium carbonate buffer pH 9.5, 10 mM NADH, 200 mM NH₄Cl, 10 mM 4-oxopentanoic acid (**95**) were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH2B1. The reaction mixture was stirred at 50, 60, or 70 °C, 400 rpm, for 48 h.

5.3.1.3. Temperature and recycling system

To a solution containing 100 mM sodium carbonate buffer pH 9.5, 0.4 mM NADH, 200 mM NH₄Cl, 10 mM 4-oxopentanoic acid (**95**), 2 eq of recycling substrate were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH2B1 and 3 U.mL⁻¹ of recycling enzyme (0,05 mg.mL⁻¹ in the case of PTDH). The reaction mixture was stirred at 30, 50, or 60 °C 400 rpm, for 48 h. Two added temperatures (70 and 80 °C) were tested with GDH 105 and CDX 901. Recycling substrates were: sodium phosphite for PTDH, glucose for GDH, glucose-6-phosphate for G6PDH.

5.3.1.4. pH and buffer selection

Conditions with NaHCO₃/Na₂CO₃ buffer: To a solution containing 100 mM sodium carbonate buffer pH 8.0-9.5, 0.4 mM NADH, 200 mM NH₄Cl, 10 mM 4-oxopentanoic acid (**95**), 20 mM HCO₂Na (glucose) were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH2B1 and 3 U.mL⁻¹ of FDH (GDH). The reaction mixture was stirred at 60 °C (50 °C) 400 rpm, for 48 h.

Conditions with NH₄Cl/NH₄OH buffer: To a solution containing 200 mM ammoniac buffer pH 6-10, 0.4 mM NADH, 10 mM 4-oxopentanoic acid (**95**), 20 mM HCO₂Na (glucose) were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH2B1 and 3 U.mL⁻¹ of FDH (GDH). The reaction mixture was stirred at 50 °C (60 °C) 400 rpm, for 48 h.

Conditions with NH₄COOH/NH₄OH buffer: To a solution containing 200 mM ammonium formate buffer pH 6.5-10, 0.4 mM NADH, 10 mM 4-oxopentanoic acid (**95**), were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH2B1 and 3 U.mL⁻¹ of FDH. The reaction mixture was stirred at 50 °C, 400 rpm, for 48 h.

5.3.1.5. Buffer concentration

Calibration curves were carried out for each buffer concentration.

Conditions with FDH: To a solution containing 0.1, 0.2, 0.5, 1, 3 or 5 M ammonium formate buffer pH 8.5, 0.4 mM NADH, 10 mM 4-oxopentanoic acid (**95**), were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH2B1 and 3 U.mL⁻¹ of FDH. The reaction mixture was stirred at 50 °C, 400 rpm, for 48 h.

Conditions with GDH: To a solution containing 0.1, 0.2, 0.5, 1, 3, 3.9 M ammoniac buffer pH 9.0, 0.4 mM NADH, 10 mM 4-oxopentanoic acid (**95**), were added 0.01 mg.mL⁻¹ of DH2B1 and 3 U.mL⁻¹ of GDH. The reaction mixture was stirred at 60 °C, 400 rpm, during 48 h.

5.3.1.6. Substrate concentration

To a solution containing 5 M ammonium formate buffer pH 8.5, 0.4 mM NADH, 10, 50, 100, 300 or 500 mM 4-oxopentanoic acid (**95**) (basified with KOH at pH ~8.0), were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH2B1 and 3 U.mL⁻¹ of FDH. The reaction mixture was stirred at 50 °C, 400 rpm, for 48 h. Samples were diluted in water before DNFB derivatization to be derivatized in the same concentration range as in calibration curves.

5.3.1.7. Enzyme concentrations

DH2B1: to a solution containing 5 M ammonium formate buffer pH 8.5, 0.4 mM NADH, 0.5 M 4-oxopentanoic acid (**95**) (basified with KOH at pH ~ 8.0), were added 0.5, 0.75, 1, 1.25 or 1.5 mg.mL⁻¹ of DH2B1 and 3 U.mL⁻¹ of FDH. The reaction mixture was stirred at 50°C, 400 rpm, for 24 h. Sampling was carried out at 6 and 24h.

FDH: to a solution containing 5 M ammonium formate buffer pH 8.5, 0.4 mM NADH, 0.5 M 4-oxopentanoic acid (**95**) (basified with KOH at pH around 8.0), were added 1 mg.mL⁻¹ of DH2B1 and 0.3, 0.6, 1 or 3 U.mL⁻¹ of FDH. The reaction mixture was stirred at 50 °C, 400 rpm, for 48 h.

5.3.1.8. 1-mL scale up

A small scale up was performed in 1 mL total volume in duplicate in optimized conditions. To a solution containing 5 M ammonium formate buffer pH 8.5, 0.4 mM NADH, 0.5 M 4-oxopentanoic acid (**95**) (basified with KOH at pH ~ 8.0), were added 1 mg.mL⁻¹ of DH2B1 and 0.5 U.mL⁻¹ of FDH. The reaction mixture was stirred at 50 °C, 400 rpm, for 24 h. Then, the reaction mixture was diluted with 500 µL of water and acidified to pH 1 HCl 6 M After centrifugation (20 min, 9.5 krpm), the supernatant was taken and the pellet was dissolved in water (approximately 0.5 mL) and centrifuged (10 krpm, 20 min). Supernatants were combined and lyophilized overnight.

5.3.2. Optimization for 2- and 3-methylcyclohexylamine (154 and 66) biocatalytic synthesis (IV.3.1)

Unless otherwise specified, reactions were performed in 100 µL total volume and monitoring by UHPLC-UV after BzCl derivatization (**conditions I**) as previously described (Section 4.3.3) at 24 and 48 h when not otherwise specified. Concentration of amine in reaction mixtures were deduced from calibration curves obtained after BzCl derivatization of standard commercial amines in presence of the same buffer and at same reaction times. Diastereoisomeric excesses were determined by GC-FID after derivatization with TFA (Section 4.4.2).

5.3.2.1. Cofactor selection

To a solution containing 100 mM sodium carbonate buffer pH 9.0, 0.2 mM NADH or NADPH, 200 mM NH₄Cl, 10 mM racemic 2-methylcyclohexanone (**124**) and 11 mM glucose, were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH13B5 and 3 U.mL⁻¹ of GDH. The reaction mixture was stirred at 30 °C, 400 rpm, for 24 h. Sampling was performed at 5 and 24 h.

5.3.2.2. Buffer selection

Conditions with sodium carbonate buffer: to a solution containing 200 mM sodium carbonate buffer pH 9.0, 0.2 mM NADPH, 200 mM NH₄Cl, 10 mM racemic 2-methylcyclohexanone (**124**), 11 mM of glucose, were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH13B5 and 3 U.mL⁻¹ of GDH. The reaction mixture was stirred at 30 °C, 400 rpm, for 24 h. Sampling was performed at 5 and 24 h.

Conditions with ammonia-containing buffer: to a solution containing 200 mM ammoniac or ammonium formate buffer pH 9.0, 0.2 mM NADPH, 10 mM racemic 2-methylcyclohexanone (**124**), 11 mM glucose, were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH13B5 and 3 U.mL⁻¹ of GDH. The reaction mixture was stirred at 30 °C, 400 rpm, for 24 h. Sampling was performed at 5 and 24 h.

5.3.2.3. Buffer concentration

To a solution containing 0.2, 0.5, 1 or 2 M ammonium formate buffer pH 9.0, 0.2 mM NADPH, 10 mM racemic 2-methylcyclohexanone (**124**), 11 mM glucose, were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH13B5 and 3 U.mL⁻¹ of GDH. The reaction mixture was stirred at 30 °C, 400 rpm, for 48 h.

5.3.2.4. Substrate concentration

To a solution containing, 1 M ammonium formate buffer pH 9.0, 0.2 mM NADPH, 10 or 50 mM (1 eq) racemic 2-methylcyclohexanone (**124**), 1.1 eq of glucose, were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH13B5 and 3 U.mL⁻¹ of GDH. The reaction mixture was stirred at 30 °C, 400 rpm, for 48 h.

5.3.2.5. Enzyme concentrations

GDH: To a solution containing, 1 M ammonium formate buffer pH 9.0, 0.2 mM NADPH, 50 mM (1 eq) racemic 2-methylcyclohexanone (**124**), 1.1 or 2 eq of glucose, were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH13B5 and 3, 20 or 60 U.mL⁻¹ of GDH. The reaction mixture was stirred at 30 °C, 400 rpm, for 24 h.

DH13B5: To a solution containing, 1 M ammonium formate buffer pH 9.0, 0.2 mM NADPH or NADP⁺, 50 mM racemic 2-methylcyclohexanone (**124**) or 3-methylcyclohexanone (**62**), 55 mM of glucose, were added 0.1, 0.3 or 0.5 mg.mL⁻¹ of DH13B5 and 3 U.mL⁻¹ of GDH. The reaction mixture was stirred at 30 °C, 400 rpm, for 48 h. Sampling was performed at 4, 24 and 48 h for **124** and at 4 and 24 h for **62**.

5.3.2.6. 1 mL-scale up and kinetic monitoring

To a solution (1 mL finl volume) containing 1 M ammonium formate pH 9.0, 0.2 mM NADP⁺, 50 mM racemic 2-methylcyclohexanone (**124**) or 3-methylcyclohexanone (**62**), 1.1 eq of glucose, was added 0.1 or 0.3 of DH13B5 and 3 U.mL⁻¹ of GDH. The reaction mixture was stirred at 30 °C, 400 rpm, for 96 h and sampled at t = 10 min, 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 48, 72 and 96 h.

5.3.3. Optimization for (2S)-pentan-2-amine ((2S)-99) biocatalytic synthesis (IV.3.1)

Unless otherwise specified, reactions were performed in 100 µL total volume and monitoring by UHPLC-UV after BzCl derivatization (**conditions I**) as previously described (Section 4.3.3) at 24 and 48 h. Concentration of amine in reaction mixtures were deduced from calibration curves obtained after BzCl derivatization of standard commercial amines in presence of the same buffer and at same reaction

times. Enantiomeric excesses were determined by GC-FID after derivatization with anhydride acetic (Section 4.4.1).

5.3.3.1. Cofactor selection

To a solution containing 100 mM sodium carbonate buffer pH 9.0, 0.2 mM NADH or NADPH, 200 mM NH₄Cl, 10 mM pentan-2-one (**72**), 11 mM of glucose, were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH13F8 and 3 U.mL⁻¹ of GDH. The reaction mixture was stirred at 30 °C, 400 rpm, for 24 h. Sampling was performed at 5 and 24 h.

5.3.3.2. Buffer selection

Conditions with sodium carbonate buffer: to a solution containing 200 mM sodium carbonate buffer pH 9.0, 0.2 mM NADPH, 200 mM NH₄Cl, 10 mM pentan-2-one (**72**), 11 mM of glucose, were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH13F8 and 3 U.mL⁻¹ of GDH. The reaction mixture was stirred at 30 °C, 400 rpm, for 24 h. Sampling was performed at 5 and 24 h.

Conditions with ammonia-containing buffer: to a solution containing 200 mM ammoniac or ammonium formate buffer pH 9.0, 0.2 mM NADPH, 10 mM pentan-2-one (**72**), 11 mM glucose, were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH13F8 and 3 U.mL⁻¹ of GDH. The reaction mixture was stirred at 30 °C, 400 rpm, for 24 h. Sampling was performed at 5 and 24 h.

5.3.3.3. Buffer concentration

To a solution containing 0.2, 0.5, 1 or 2 M ammonium formate buffer pH 9.0, 0.2 mM NADPH, 10 mM pentan-2-one (**72**), 11 mM glucose, were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH13F8 and 3 U.mL⁻¹ of GDH. The reaction mixture was stirred at 30 °C, 400 rpm, for 48 h.

5.3.3.4. Substrate concentration

To a solution containing, 2 M ammonium formate buffer pH 9.0, 0.2 mM NADPH, 10, 50, 100 or 200 mM pentan-2-one (**72**), 1.1 eq of glucose, were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH13F8 and 3 U.mL⁻¹ of GDH. The reaction mixture was stirred at 30 °C, 400 rpm, for 48 h.

5.3.3.5. Recycling system optimization

To a solution containing, 2 M ammonium formate buffer pH 9.0, 0.2 mM NADPH, 50 mM (1 eq) pentan-2-one (**72**), 1.1 or 2 eq of glucose, were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH13F8 and 3, 20 or 60 U.mL⁻¹ of GDH. The reaction mixture was stirred at 30 °C, 400 rpm, for 48 h.

5.3.3.6. DH13F8 concentration

To a solution containing, 2 M ammonium formate buffer pH 9.0, 0.2 mM NADPH or NADP⁺, 50 mM pentan-2-one (**72**), 55 mM of glucose, were added 0.1, 0.3 or 0.5 mg.mL⁻¹ of DH13F8 and 3 U.mL⁻¹ of GDH. The reaction mixture was stirred at 30 °C, 400 rpm, for 48 h. Sampling was performed at 4, 24 and 48 h.

5.3.3.7. Small scale up

A small scale up was performed in 1 mL total volume in duplicate in optimized conditions. To a solution containing 2 M ammonium formate buffer pH 9.0, 0.2 mM NADP⁺, 50 mM pentan-2-one (**72**), 55 mM of glucose, were added 0.5 mg.mL⁻¹ of DH13F8 and 3 U.mL⁻¹ of GDH. The reaction mixture was stirred at 30 °C, 400 rpm, for 96 h and sampled at 4, 24 and 96 h.

5.3.4. Biocatalytic synthesis of (2*R*, 4*S*)-2,4-diaminopentanoate ((2*R*,4*S*-91) (II.7.2.1.2)

Reactions were performed in 1 mL total volume and monitored by HPLC-ELSD (Section 4.3.4) at 4, 24 and 48 h reaction times. Conversions of D-ornithine (**113**) were deduced from calibration curves obtained with various concentrations of commercial D-ornithine (**113**) in the same reaction conditions and reaction times, except in the absence of enzyme. The anaerobic solutions were prepared by flushing with nitrogen in the presence of a colored indicator (resazurine) and stored in an airtight container.

5.3.4.1. Substrate concentration

To an anaerobic solution containing 50 mM TRIS buffer pH 9.0, 10 mM of DTT, 3 µM coenzyme B12, 0.04 mM PLP and 20, 50 or 100 mM **113**, was added 0.1 mg.mL⁻¹ of aminomutase. The reaction mixture was stirred at rt, 400 rpm, for 48 h under nitrogen atmosphere.

5.3.4.2. Temperature

To an anaerobic solution containing, 50 mM TRIS buffer pH 9.0 with 10 mM of DTT, 3 µM coenzyme B12, 0.04 mM PLP and 50 mM **113**, was added 0.1 mg.mL⁻¹ of aminomutase. The reaction mixture was stirred at rt, 30 and 37 °C, 400 rpm, for 48 h under nitrogen atmosphere.

5.3.4.3. Anaerobic condition

To an anaerobic solution containing, 50 mM TRIS buffer pH 9.0 with 10 mM of DTT or Na₂S, 3 µM coenzyme B12, 0.04 mM PLP and 50 mM **113**, was added 0.1 mg.mL⁻¹ of aminomutase. The reaction

mixture was stirred at rt, 30 and 37 °C, 400 rpm, for 20 h under nitrogen atmosphere or stored in a glove box (98 % N₂ and 2 % H₂) without stirring.

5.3.4.4. 10-mL scale up

To an anaerobic solution (10 mL total volume) containing 50 mM TRIS buffer pH 9.0 with 10 mM of DTT, 3 µM coenzyme B12, 0.04 mM PLP and 50 mM **113**, was added 0.1 mg.mL⁻¹ of aminomutase. The reaction mixture was stirred at rt, 30 and 37 °C, 400 rpm, for 20 h under nitrogen atmosphere or stored in a glove box (98 % N₂ and 2 % H₂) without stirring.

5.4. CASCADE REACTION – (IV.4 – WAGENINGEN)

The cascade reactions were performed in 250 µL total volume. To a solution containing 1 M ammonium formate buffer pH 9.0, 0.4 mM NAD(P)⁺, 10 mM cyclohex-2-en-1-one (**136**), 2.1 eq of glucose, 5 mM CaCl₂ were added 0.1 mg.mL⁻¹ of DH13B5 (or DH13F8, or C3MY1), 3 U.mL⁻¹ of GDH and 0.1 mg.mL⁻¹ of TsOYE. The reaction mixture was stirred at 30 °C, 400 rpm. After 20 h, the reactions were quenched with NaOH 10 M (100 µL) and extracted with AcOEt (2 x 175 µL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and analysed by GC-FID (condition B).

6. SEMI-PREPARATIVE SCALE BIOCATALYTIC SYNTHESIS

6.1. BIOCATALYTIC SYNTHESIS OF (4S)-4-AMINOPENTANOIC ACID ((4S)-97)

In a Greiner tube (50 mL) with a screw cap, was poured 9 mL of a media containing 5 M NH₄CO₂H/NH₄Cl buffer (pH 8.5), 0.5 M 4-oxopentanoic acid (**95**) (basified at pH 8.9), 0.4 mM NADH, 0.5 U of FDH and 9 mg of DH2B1 purified by heat treatment. The reaction mixture was stirred at 400 rpm at 50°C for 24 h then quenched with 6 M HCl aqueous solution to reach pH 1, centrifuged (10 krpm, 20 min). The supernatant was taken and the pellet was dissolved in water and centrifuged (10 krpm, 20 min) a second time. Supernatants were combined and lyophilized overnight. The freeze-dried product was dissolved in 0.1 M HCl aqueous solution and purified by ion exchange chromatography using a Dowex® 50WX8-200 mesh resin previously activated by hydrochloric acid 1M (non-linear gradient elution (4 column volumes): 0.1 M HCl, H₂O until neutral pH, and NH₄OH 3.3 %). Positive fractions (TLC, ninhydrine relevation) were combined and lyophilized to afford (4S)-4-aminopentanoic acid

((4S)-**97**) as a white solid (466 mg, 88% yield) with ee ≥ 99.5 % as determined by UHPLC after FDAA derivatization. t_R (9) = 2.30 min (DNFB derivatization), t_R [(4S)-**97**] = 4.79 min, t_R [(4R)-**97**] = 5.09 min (FDAA derivatization **condition F**) $[\alpha]_D^{15.4} = -11.3^\circ$ ($c = 30.1 \text{ mg.mL}^{-1}$, H₂O) {lit. for opposite enantiomer (4R)-4-aminopentanoic acid ((4R)-**97**) : $[\alpha]_D^{22.0} = +13.6^\circ$ ($c = 1.05$, H₂O) (Otsuka *et al.*, 1990) }, ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ = 3.34 – 3.19 (m, 1H), 2.20 (ddd, $J = 7.8, 7.1, 3.1 \text{ Hz}$, 2H), 1.91 – 1.60 (m, 2H), 1.20 (d, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 3H) {(Otsuka *et al.*, 1990)}; ¹³C NMR (75 MHz, D₂O) δ = 181.9, 47.9, 33.8, 30.9, 17.7.

6.2. BIOCATALYTIC SYNTHESIS OF (2R,4S)-2,4-DIAMINOPENTANOATE ((2R,4S)-91)

In a 4 Greiner tube (50 mL) with a screw cap, was poured 30 mL of a media containing 50 mM TRIS buffer (pH 9) with 10 mM DTT, 50 mM D-ornithine (**113**), 3 µM coenzyme B12, 0.04 mM PLP and 0.1 mg.mL⁻¹ aminomutase. The reaction mixture was stirred at 300 rpm at 30°C under nitrogen atm for 24 h. Then the reaction mixtures were pooled together and lyophilized. The lyophilisate was dissolve in 50 mL of water/TFA 98:2 and centrifuged (20 min, 10 krpm, 8°C). The supernatant was taken and the pellet was dissolved in water and centrifuged (20 min, 10 krpm, 8°C) a second time. Supernatants were combined and lyophilized overnight. The freeze-dried product was dissolved in MeOH and purified by silica flash chromatography (elution gradient MeOH/H₂O 50:50 to 35:65 in 15min, then 30min at 35:65). Positive fractions (TLC, ninhydrine relevation) were combined, concentrated *in vacuo*, and lyophilized to afford **91** as white solid (300 mg, 30 % yield) with ee > 99 % as determined by HPLC-ELSD. t_r [2R,4S] = 15.7 min, t_r [2S,4S] = 16.1 min, ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ = 3.40 (t, $J = 6.7 \text{ Hz}$, 1H), 3.36 – 3.23 (m, 1H), 1.84 (dt, $J = 14.4, 7.3 \text{ Hz}$, 1H), 1.69 (dt, $J = 13.9, 6.1 \text{ Hz}$, 1H), 1.19 (d, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, D₂O) δ = 180.11, 53.52, 45.93, 38.72, 19.24.

6.3. BIOCATALYTIC SYNTHESIS OF CIS-(1S, 2R)-2-METHYLCYCLOHEXYLAMINE HYDROCHLORIDE (154)

In a 50 mL-Greiner tube equipped with a screw cap was poured racemic 2-methylcyclohexanone (**125**) (10 mL of a 100 mM stock solution, 1 mmol), distilled water (6.0 mL), ammonium formate pH 9 (2 mL of a 10 M stock solution), D-glucose (0.7 mL of a 1.5 M stock solution, 1.1 mmol), NADP⁺ (0.08 mL of a 50 mM stock solution, 4 µmol), GDH (Codexis GDH 105, 0.3 mL of a 200 U.mL⁻¹ stock solution, 60 U) and purified DH13B5 (0.9 mL of 6.8 mg.mL⁻¹ stock solution). The reaction was shaken at 30 °C 400 rpm with UHPLC monitoring after BzCl derivatization (**condition I**). After 24 h (stabilized conversion at 45 %), the reaction was basified to pH 12 with 10 M KOH solution and the product

extracted with diethylether (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried (MgSO_4) and concentrated under reduced pressure to approximatively 10 mL before addition of a solution of 2 M HCl in diethylether (0.6 mL, 1.2 mmol). The solid was filtered, washed with cold diethylether (3 x 5 mL) and dried over vacuum to afford (1*S*, 2*R*)-**154** as monohydrochloride salt (52 mg, 35 % yield, white solids) as a mixture of *cis/trans* product (ratio 90/10) with *ed* ≥ 99 % as determined by chiral GC-FID. ^1H NMR was identical to the *cis* isomer reported by Brown *et al.* (Brown *et al.*, 1986). ^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ = 3.41 (m, 1H), 2.09 (m, 1H), 1.75 – 1.70 (m, 2H), 1.64 – 1.50 (m, 3H), 1.49 – 1.36 (m, 3H), 1.00 (d, J = 7.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, D_2O) δ = 56.52, 52.91, 35.82, 33.19, 31.14, 30.63, 29.41, 26.25, 24.68, 24.23, 21.97, 20.83, 17.62, 13.25.

6.4. BIOCATALYTIC SYNTHESIS OF CIS-(1S, 3R)-3-METHYLCYCLOHEXYLAMINE HYDROCHLORIDE ((1S, 3R)-66).

In a 50 mL-Greiner tube equipped with a screw cap was poured racemic 3-methylcyclohexanone (**62**) (10 mL of a 100 mM stock solution, 1 mmol), distilled water (5.8 mL), ammonium formate pH 9.0 (2 mL of a 10 M stock solution), D-glucose (0.7 mL of a 1.5 M stock solution, 1.1 mmol), NADP^+ (0.08 mL of a 50 mM stock solution, 4 μmol), GDH (Codexis GDH 105, 0.3 mL of a 200 U. mL^{-1} stock solution, 60 U) and purified DH13B5 (0.9 mL of 6.8 mg. mL^{-1} stock solution). The reaction was shaken at 30 °C 400 rpm with UHPLC monitoring after BzCl derivatization (**condition I**) of 20 μL samples. After 6 h (stabilized conversion at 45 %), the reaction was basified to pH 12 with 10 M KOH solution and the product extracted with diethylether (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried (MgSO_4) and concentrated under reduced pressure to approximatively 10 mL before addition of a solution of 2 M HCl in diethylether (0.6 mL, 1.2 mmol). Due to absence of precipitation, 10 mL of distilled water was added and the product extracted with 2 x 20 mL of water. The combined aqueous phases were washed with diethylether (3 x 10 mL) to remove the unreacted ketone and then lyophilized to afford (1*S*, 3*R*)-**66** as monohydrochloride salt (60 mg, 40 % yield, yellowish oil) as a mixture of *cis/trans* product (ratio 97/3) with *ed* ≥ 99 % as determined by chiral GC-FID and NMR. ^1H NMR was identical to the *cis* isomer reported by Zhou and List (Zhou and List, 2007). ^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ = 3.19 – 3.09 (m, 1H), 1.96 (m, 2H), 1.83 – 1.75 (m, 1H), 1.66 (m, 1H), 1.53 – 1.43 (m, 1H), 1.38 – 1.27 (m, 1H), 1.24 (m, 1H), 1.03 – 0.96 (m, 1H), 0.92 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.83 (m, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{H}_2\text{O+D}_2\text{O}$) δ = 52.05, 40.09, 34.58, 32.31, 31.51, 25.24, 23.26.

6.5. BIOCATALYTIC SYNTHESIS OF (2S)-PENTAN-2-AMINE HYDROCHLORIDE (*S*)-99

In a 50 mL-Greiner tube equipped with a screw cap was poured pentan-2-one (**72**) (2 mL of a 500 mM stock solution, 1 mmol), distilled water (11.7 mL), ammonium formate pH 9.0 (4 mL of a 10 M stock solution), D-glucose (0.7 mL of a 1.5 M stock solution, 1.1 mmol), NADP⁺ (0.08 mL of a 50 mM stock solution, 4 µmol), GDH (Codexis GDH 105, 0.3 mL of a 200 U.mL⁻¹ stock solution, 60 U) and purified DH13F8 (1.1 mL of 8.7 mg.mL⁻¹ stock solution). The reaction was shaken at 30 °C 400 rpm with UHPLC monitoring after BzCl derivatization (**condition I**). After 24 h (stabilized conversion at 57 %), the reaction was basified to pH 12 with 10 M KOH solution and the product extracted with diethylether (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried (MgSO₄) and concentrated under reduced pressure to approximatively 10 mL before addition of a solution of 2 M HCl in diethylether (0.6 mL, 1.2 mmol). The solid was filtered, washed with cold diethylether (3 x 5 mL) and dried over vacuum to afford (*S*)-**99** as monohydrochloride salt (48 mg, 39 % yield, white solids) with ee ≥ 97 % as determined by chiral GC-FID. ¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ = 3.43 – 3.33 (m, 1H), 1.69 – 1.50 (m, 1H), 1.44 – 1.34 (m, 1H), 1.29 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 0.94 (t, J = 7.4 Hz, 1H). ¹³C NMR (151 MHz, D₂O) δ = 47.62, 36.09, 18.03, 17.62, 12.89.

7. *IN VIVO* DIRECTED EVOLUTION

7.1. TOXICITY AND GROWTH ASSAY (II.7.2.2)

Composition of NTA-mix: 10⁻² M nitrilotriacetic acid, 3.10⁻³ M calcium chloride, 3.10⁻³ M ferric chloride, 10⁻³ M manganese chloride, 3.10⁻⁴ M zinc chloride, 3.10⁻⁴ M boric acid, 3.10⁻⁴ M chromium chloride, 3.10⁻⁴ M cobalt chloride, 3.10⁻⁴ M cupric chloride, 3.10⁻⁴ M nickel chloride, 3.10⁻⁴ M sodium molybdate, 3.10⁻⁴ M sodium selenite. pH was adjusted at 6.5 with NaOH 10N.

Composition of MS medium for culture in liquid media: 4 mM citric acid, 1 mM MgSO₄, 20 mM NH₄Cl, 50 mM K₂HPO₄, 1/1000^e dilution of NTA-mix, 0.2 % glucose, 100 µg.mL⁻¹ carbemicilin.

Composition of MS medium for culture in solid media: 4 mM citric acid, 1 mM MgSO₄, 20 mM NH₄Cl, 50 mM K₂HPO₄, 1/1000^e dilution of NTA-mix, 0.1 % glucose. The mixture was mixed with Agar 1:1 v/v.

Composition of MSN⁺ medium for culture in solid media: 4 mM citric acid, 1 mM MgSO₄, 50 mM K₂HPO₄, 1/1000^e dilution of NTA-mix, 0.1 % glucose. The mixture was mixed with Agar 1:1 v/v.

Procedure: Precultures were carried out in 2 mL MS liquid medium at 37 °C for one night, starting from isolated single colony on the Petri plate. Precultures were then 1/215^e diluted with a fresh culture medium and 4 mL were used for the solid culture media on Petri plate containing 25 mL of appropriate solid medium. After culture absorption, an hole was made in the center of the Petri plate in which 90 µL of substrate (**97** or **91**) was added (0,5 M, pH around 7) The Petri plate put at 37 °C for 48h.

7.2. **EVOLUTION ASSAY (II.7.2.2)**

Composition of relaxant medium: (MSN⁻ medium) 4 mM citric acid, 1 mM MgSO₄, 20 mM NH₄Cl, 50 mM K₂HPO₄, 1/1000^e dilution of NTA-mix (same as described above), 0.2 % glucose, 4 mM L-alanine, 3 mM NH₄Cl, 4 mM (2R, 4S)-**91**.

Composition of stress medium: (MSN⁻ medium) 4 mM citric acid, 1 mM MgSO₄, 20 mM NH₄Cl, 50 mM K₂HPO₄, 1/1000^e dilution of NTA-mix (same as described above), 0.2 % glucose, 8 mM (2R, 4S)-**91**.

Procedure: 16 mL of *E. coli* AmDH⁺ ΔpuuE ΔgapT ΔdadA (G4488) were monitoring in GM3 automate. First, a turbidostat was applied with a transmittance threshold at 80 %. When the threshold was reached, the culture was diluted at 10 % (1.6 mL). One day of turbidostat regim allows to estimated the generation time of the mutant G4488 at 2 h. Medium swap was then applied during 6 days. The culture was diluted every 10 min by 950 µL of fresh relaxant or stress medium, depending on the value of the transmittance. The second turbidostat was defined with a transmittance threshold at 80 % and 5 % of dilution (0.8 mL).

8. **BIO-INFORMATIC ANALYSES**

Visualization and pictures were carried out with Pymol software (Schrödinger and LLC).

Molecular docking, using Autodock and AutodockTools software or Autodock vina software were performed using 4-oxopentanoic acid (**95**), 2-amino-4-oxopentanoic acid (**93**), with the crystallographic structure of DH2B1. Gasteiger charges and non polar hydrogen atoms were added using AutoDockTools on DH2B1 and substrates. Side chain protonation states were assumed negative charge for Asp and Glu, positive charge for Lys and neutral charge for His. The docking grid encompassed the pocket the entire pocket, which includes residues 23 residues (12, 78, 100, 102, 132, 133, 134, 135, 136, 161, 163, 168, 171, 172, 175, 176, 196, 197, 198, 264, 266, 299, 303) defined by Fpocket software (Schmidtke *et al.*, 2011). Protein side chains were not allowed to move and all degrees of freedom were possible for

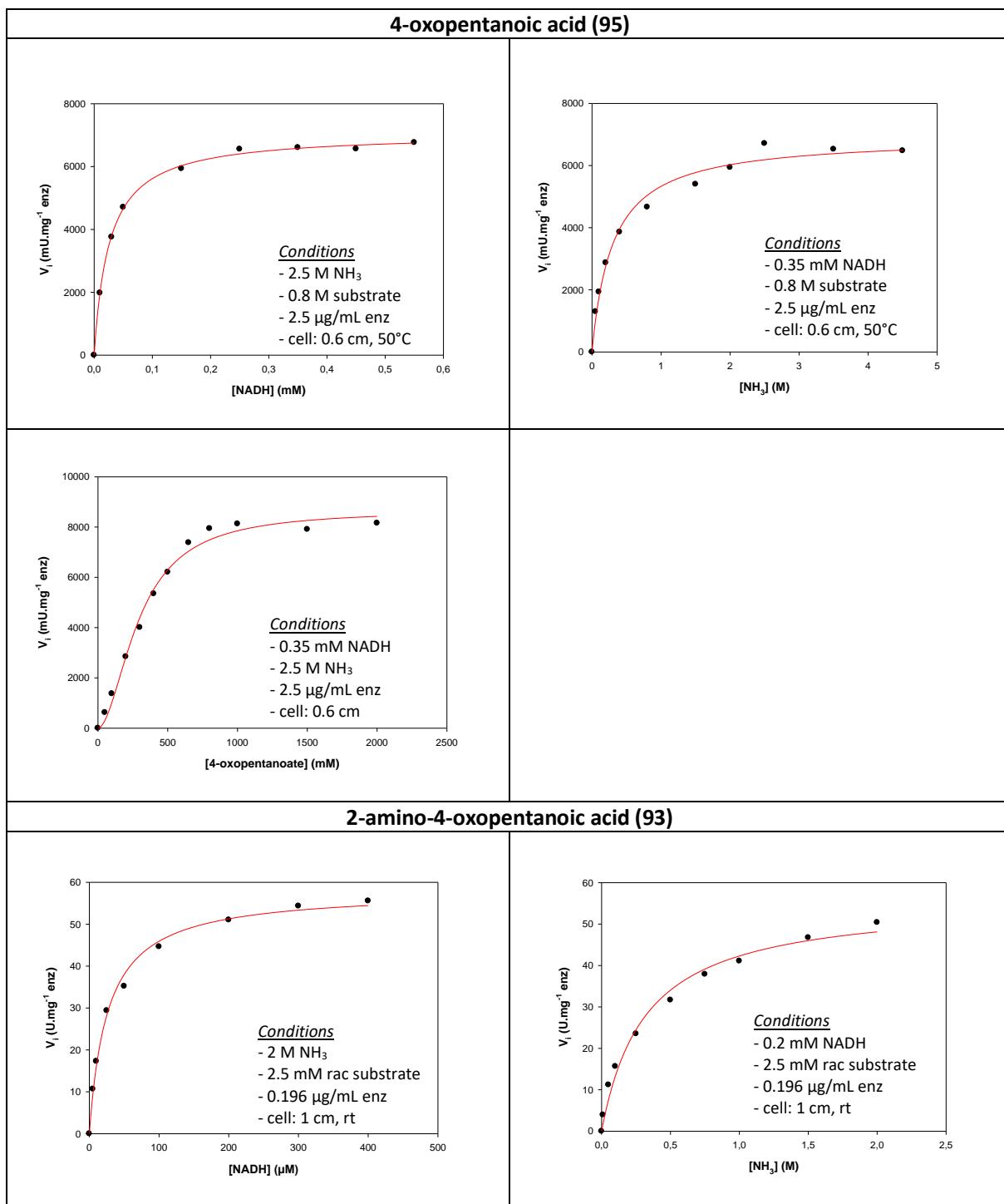
substrates. The number of binding modes was set to 400 maximum with an energy range set to 10. The obtained docking poses were analyzed based on scoring values of Autodock's scoring function.

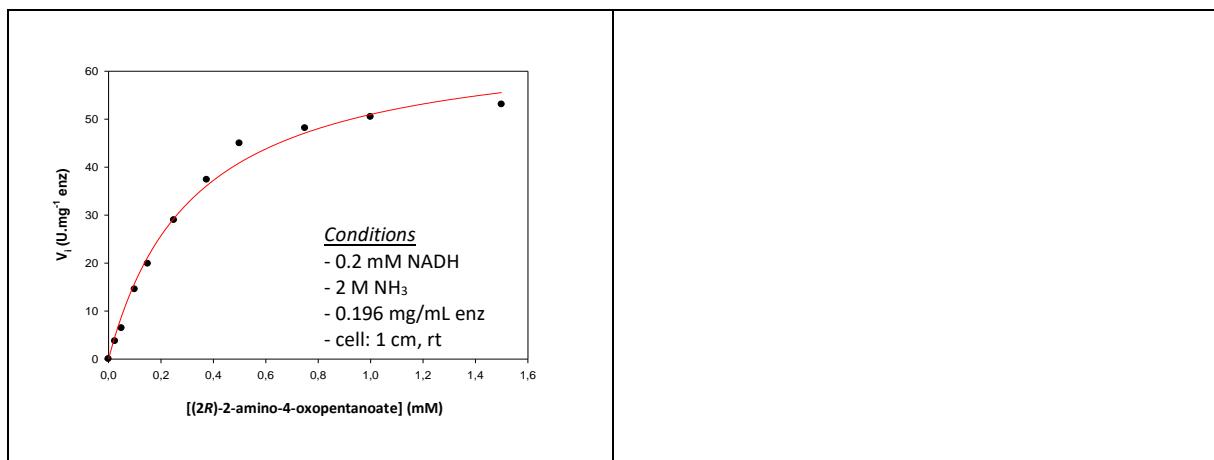
The variants N135V/N163V/R161M/H264L were modeled by homology with Modeller software²⁰ using the crystallographic structure of AmDH4 as template. Mutations were done directly in the FASTA file before homology modeling. Molecular docking were performed in the same conditions described above.

9. CHROMATOGRAMS AND SPECTRA

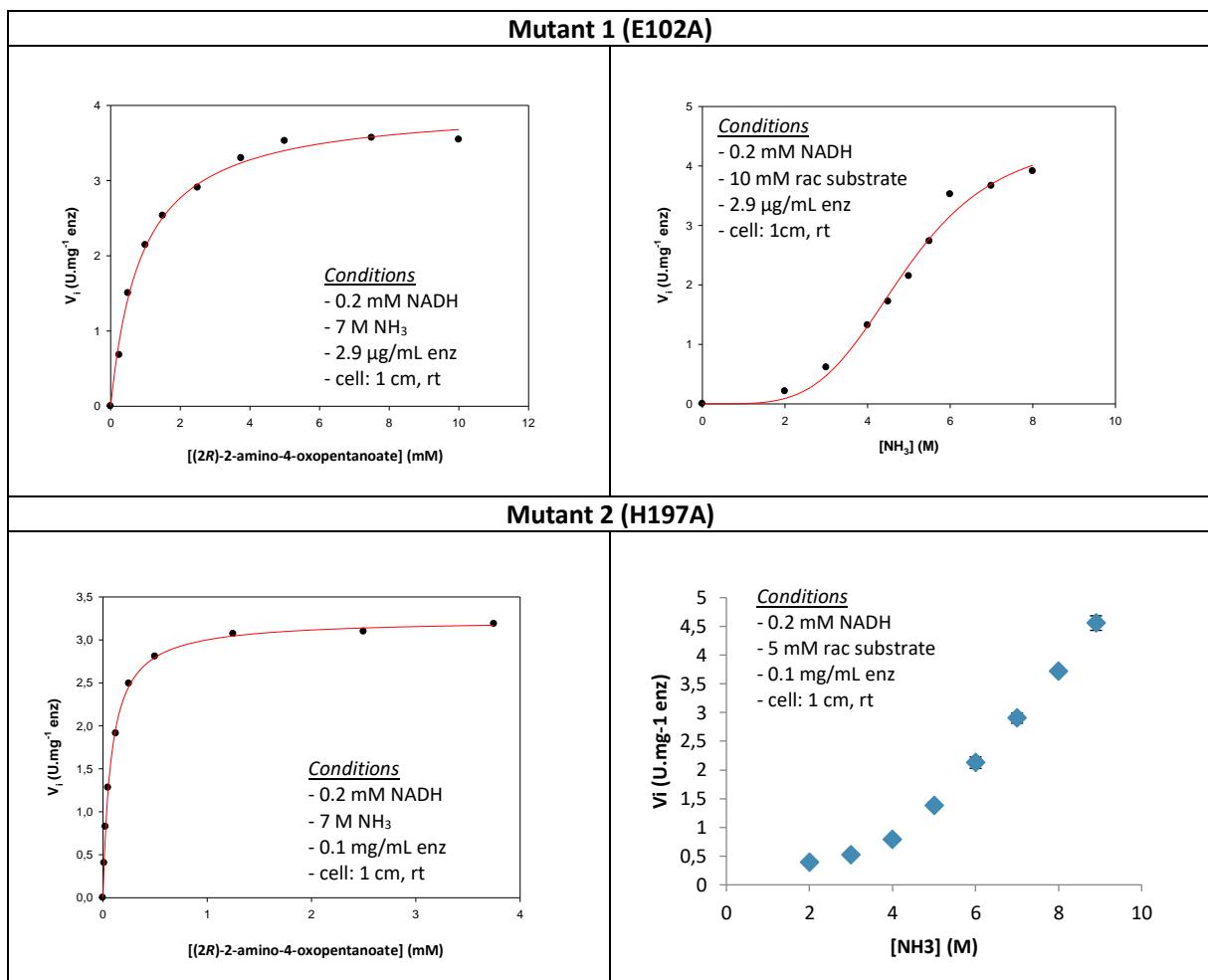
9.1. KINETIC PARAMETERS

9.1.1. DH2B1

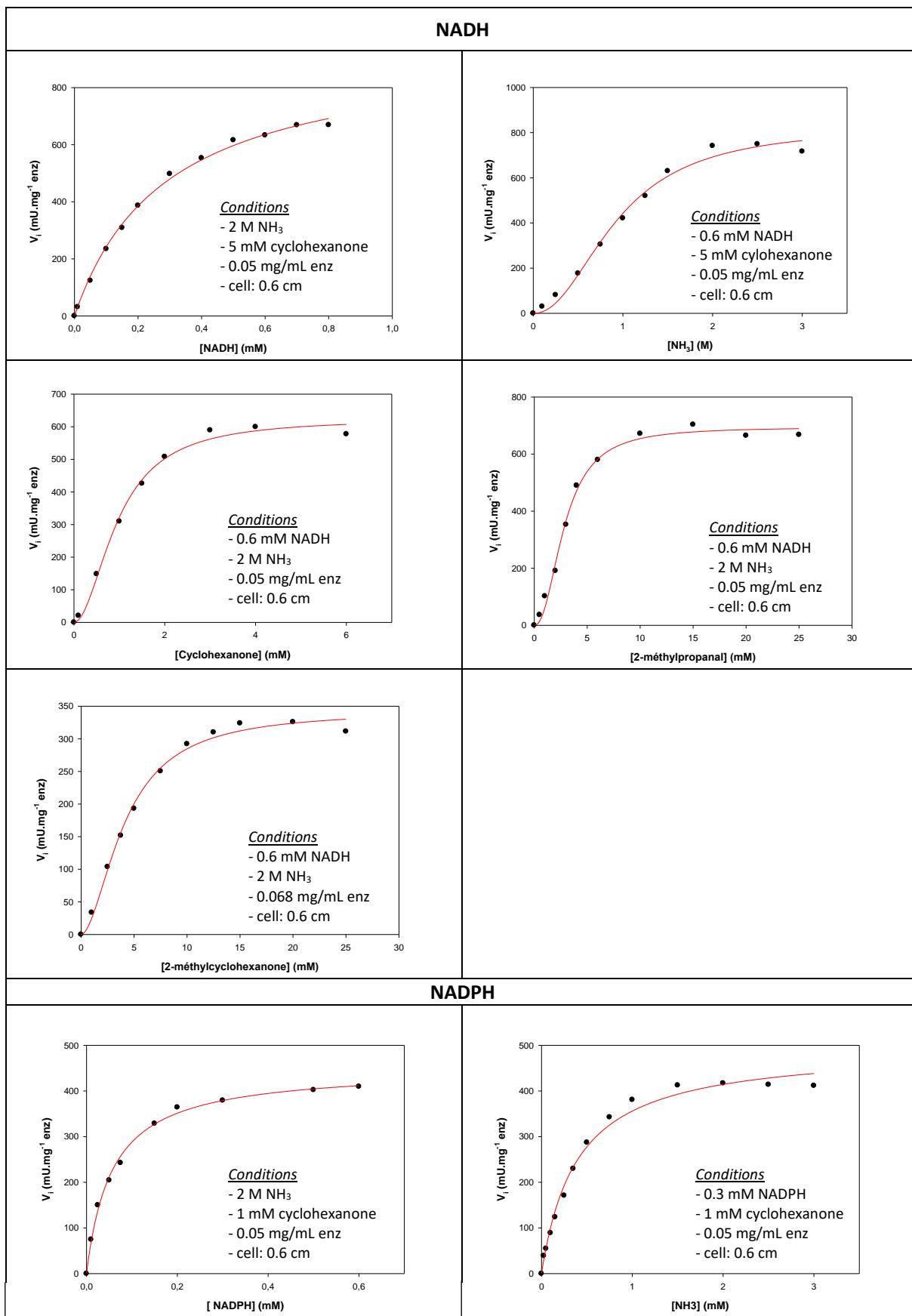


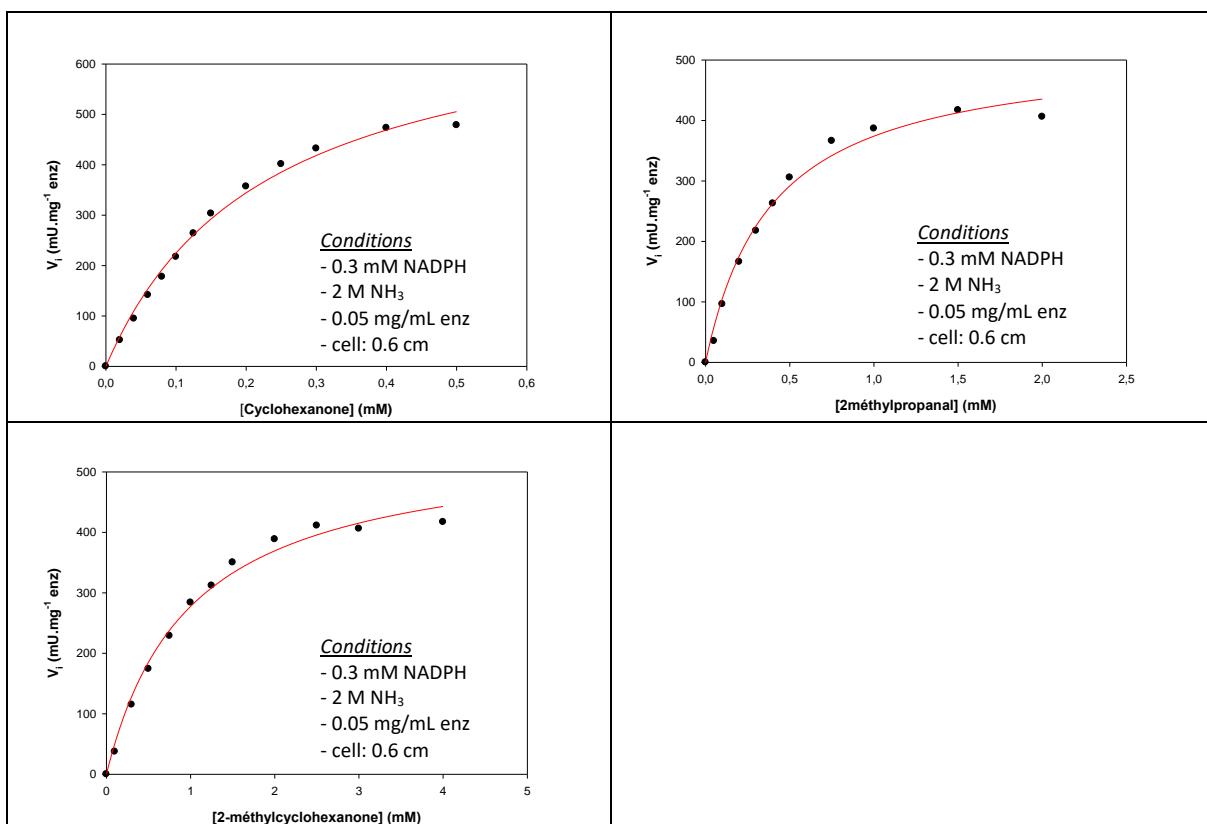


9.1.2. Mutants

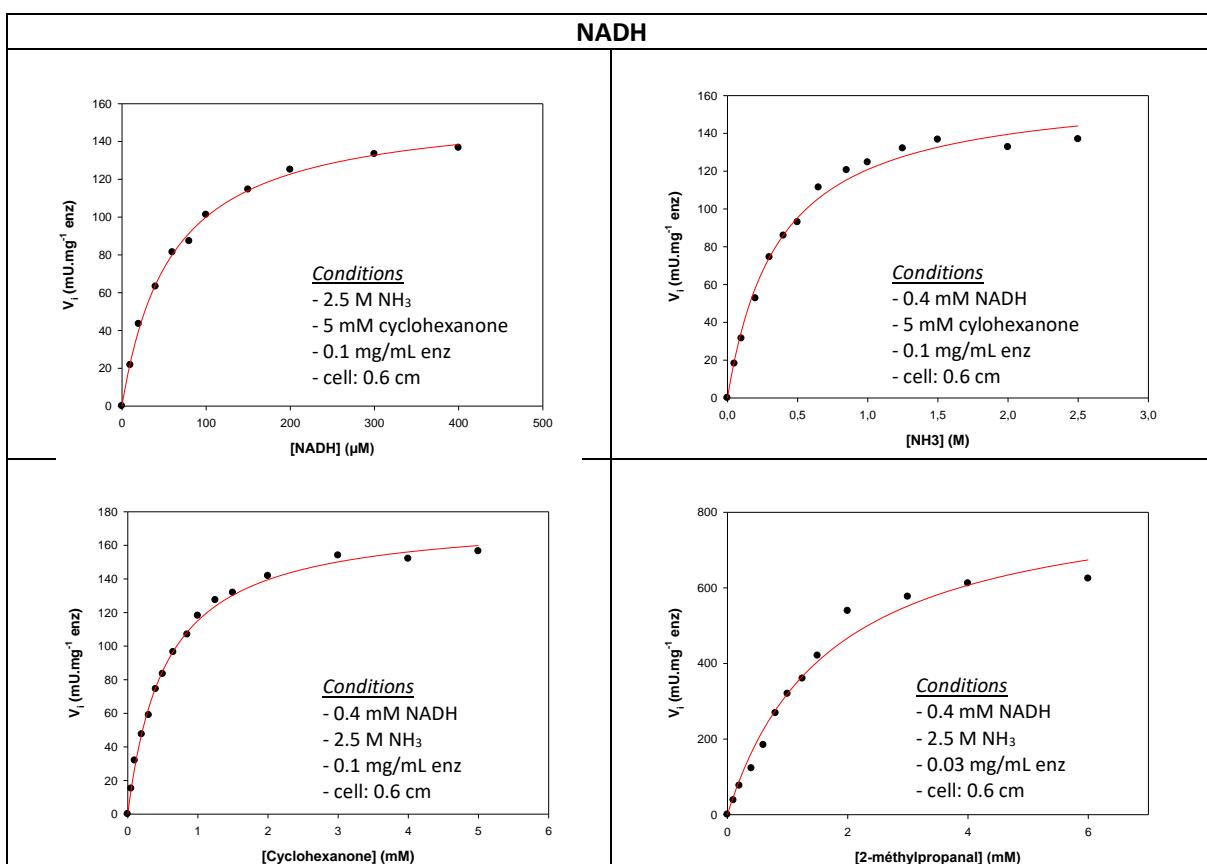


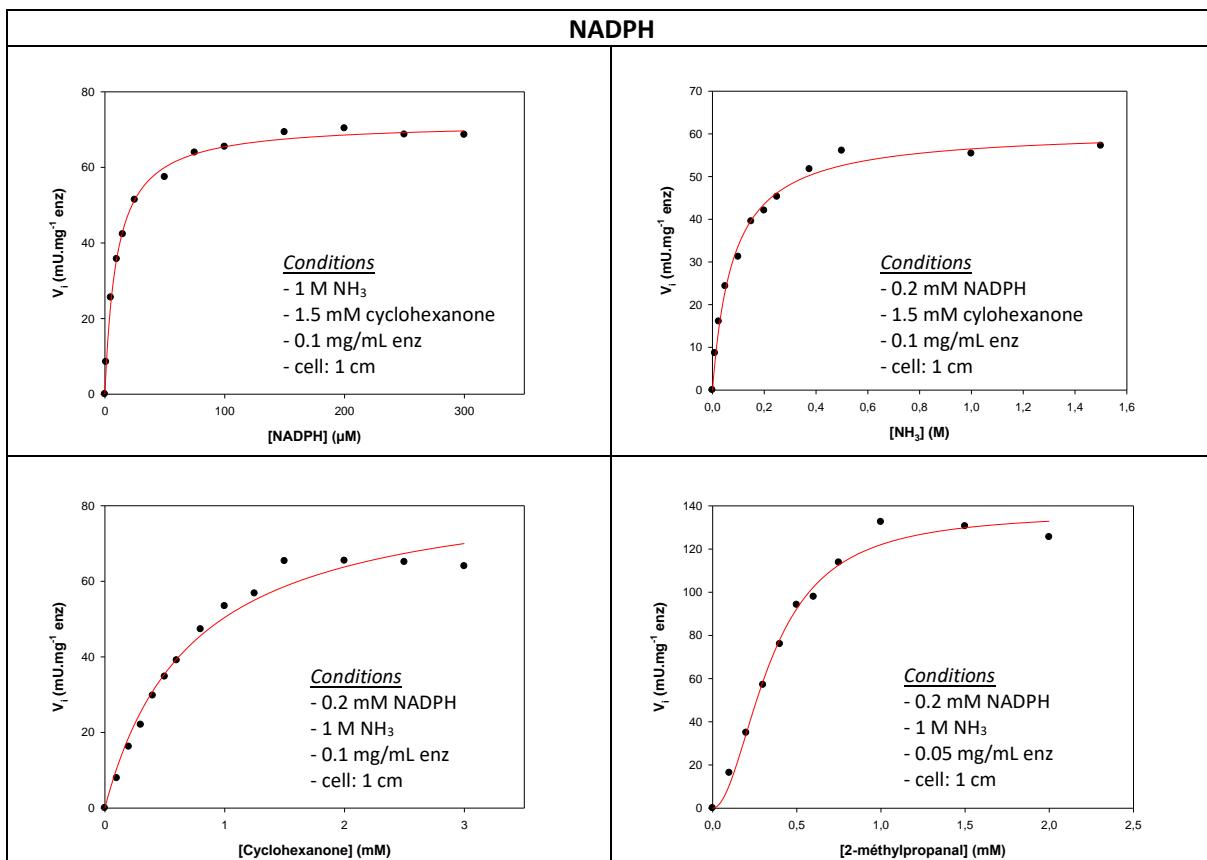
9.1.3. DH13B5



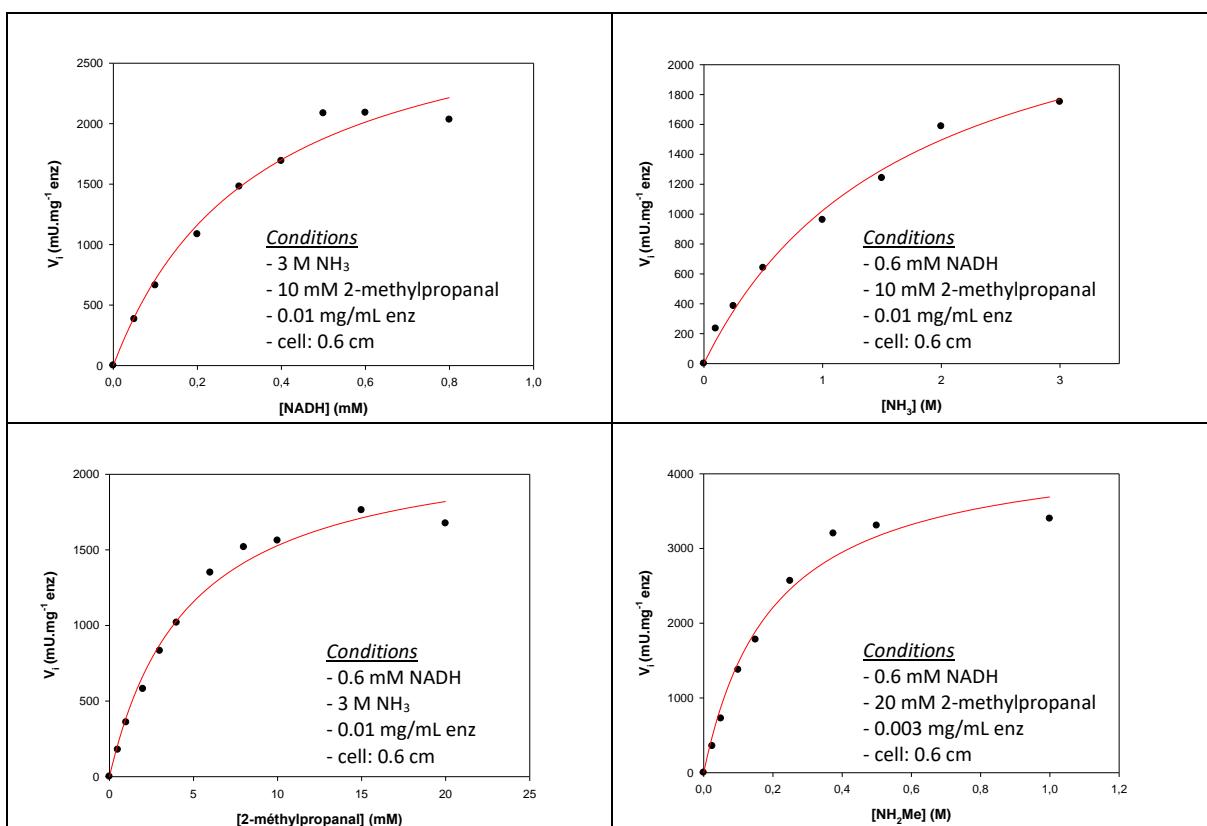


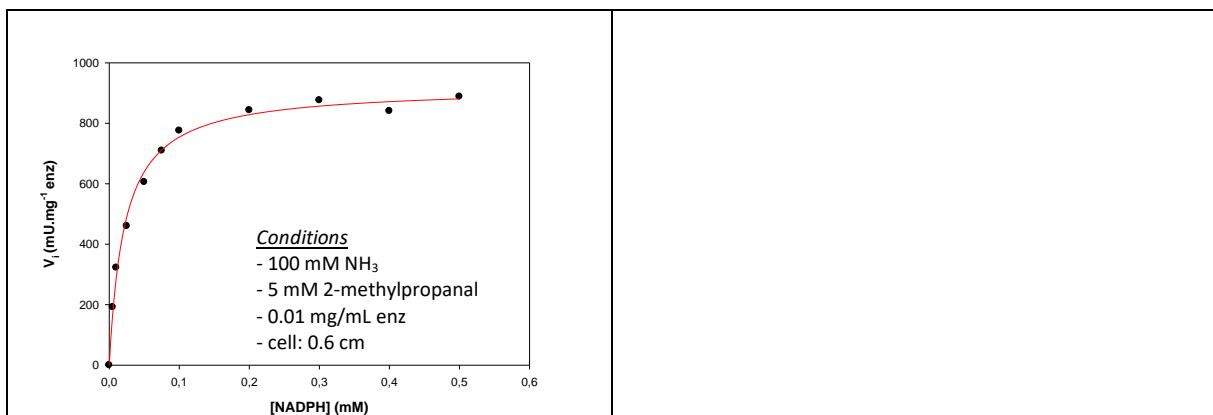
9.1.4. DH13F8





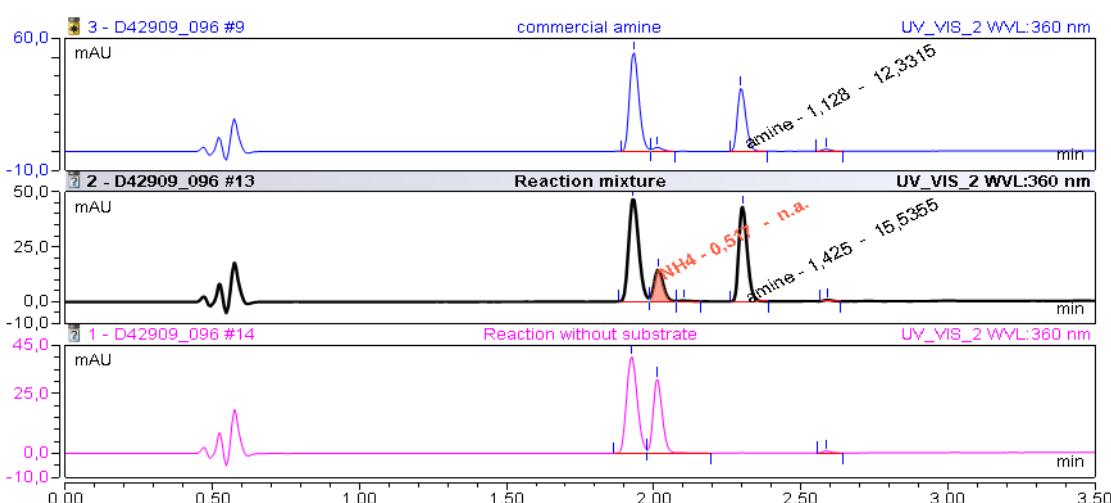
9.1.5. C3UMY1



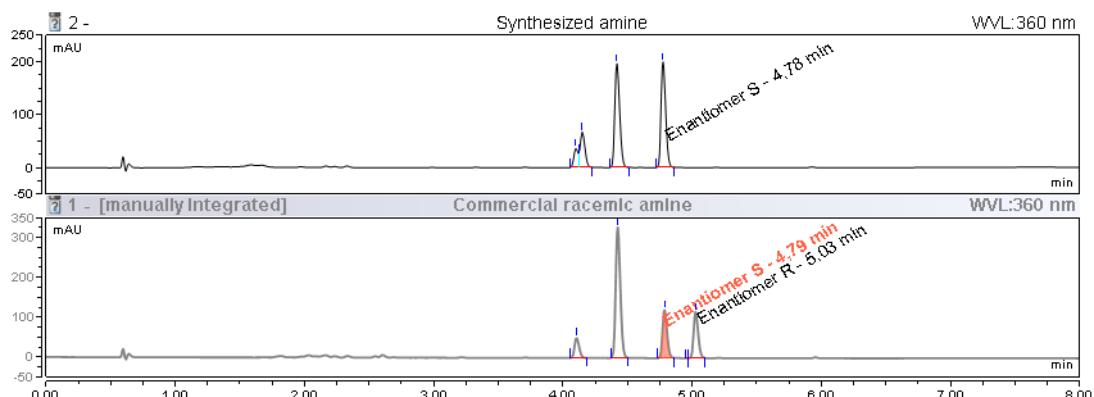


9.2. UHPLC-UV

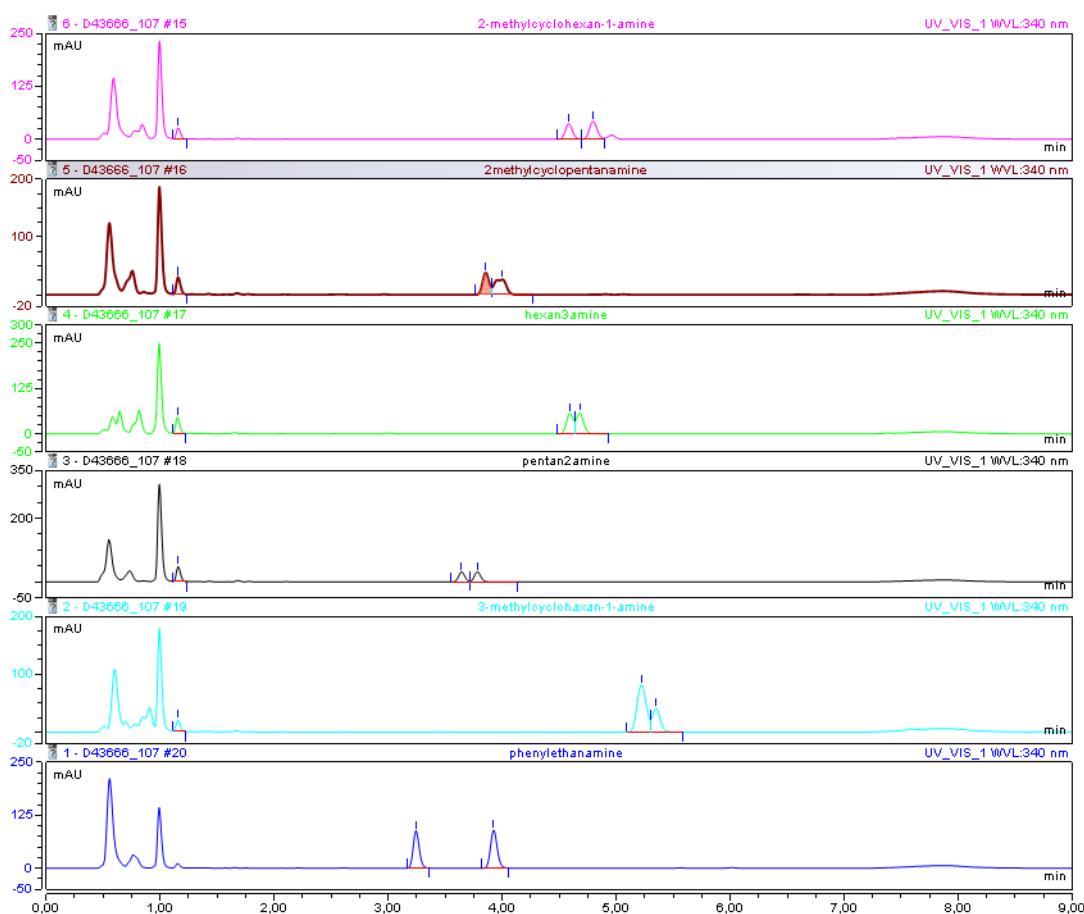
9.2.1. DNFB – 4-aminopentanoate (97)



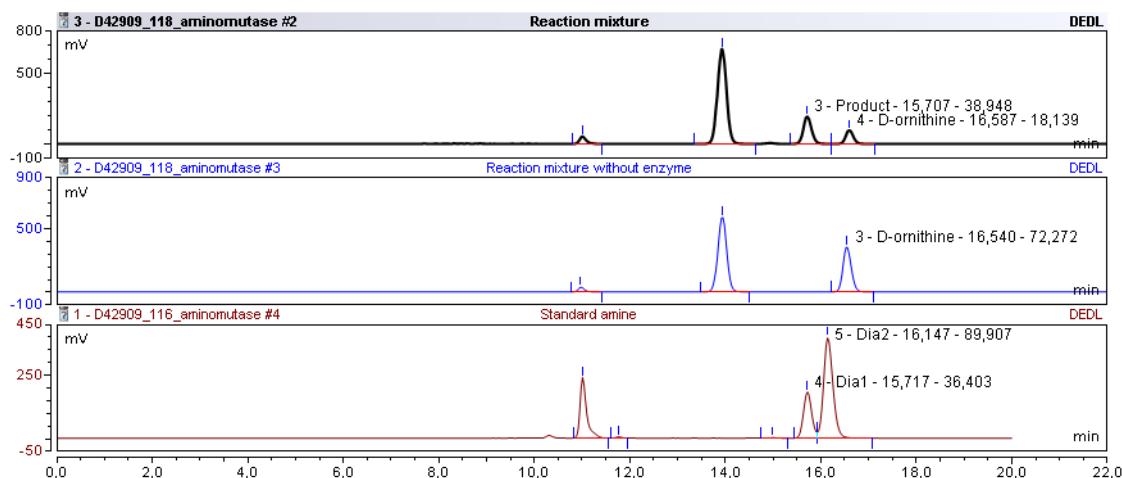
9.2.2. FDAA condition F – 4-aminopentanoate (97)



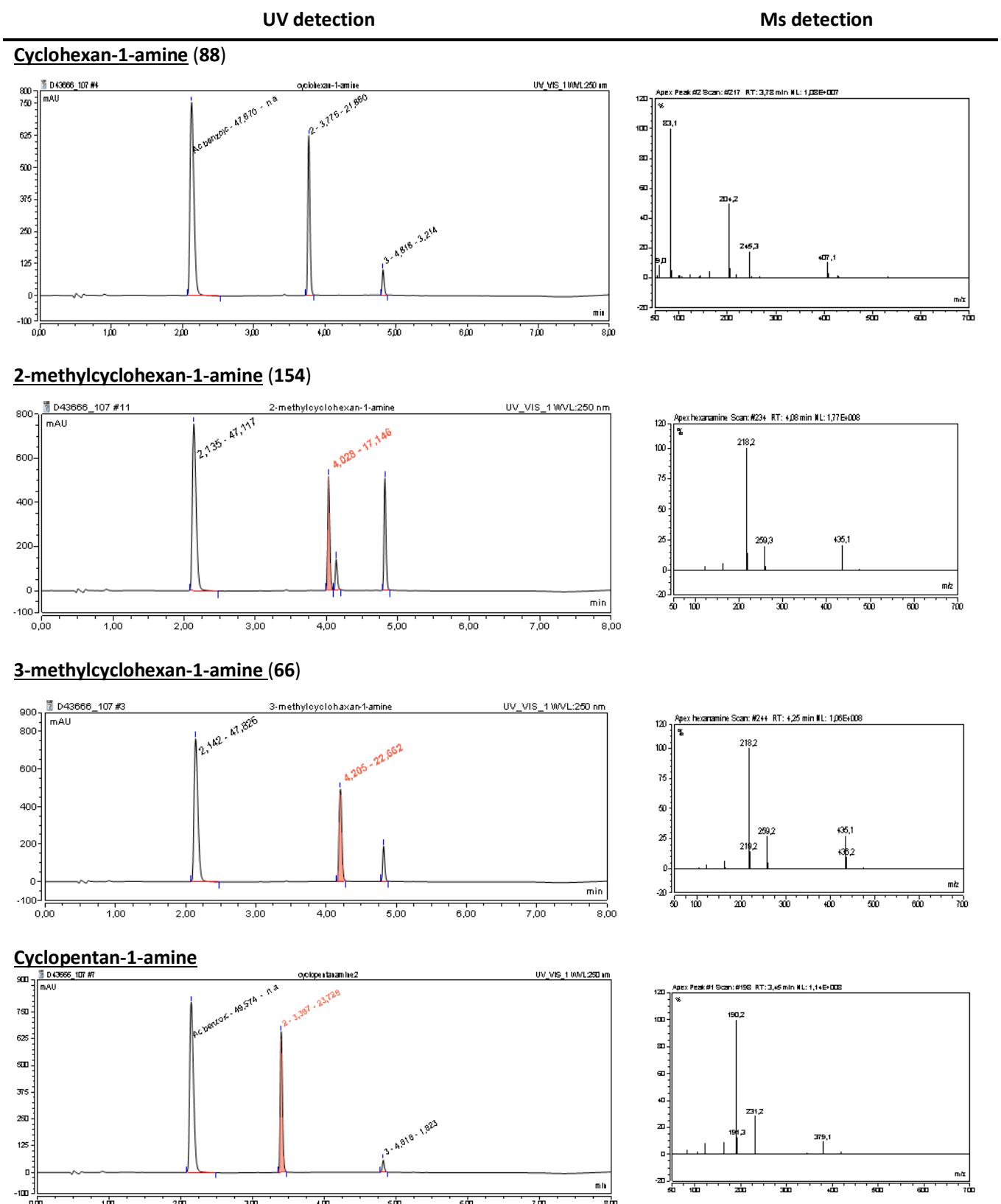
9.2.3. FDAA - condition G

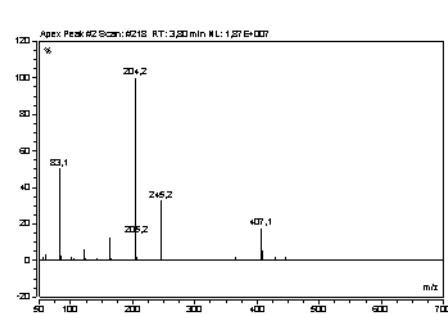
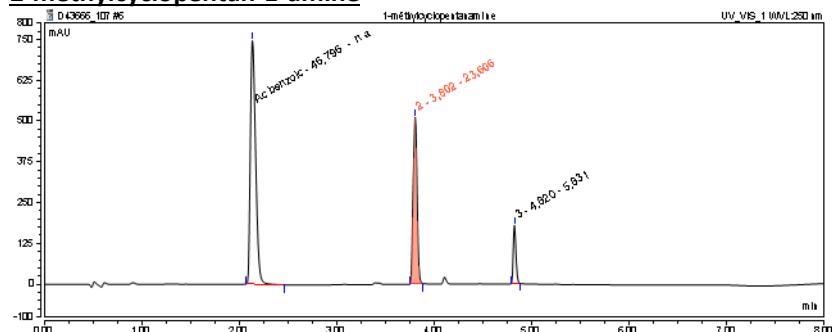
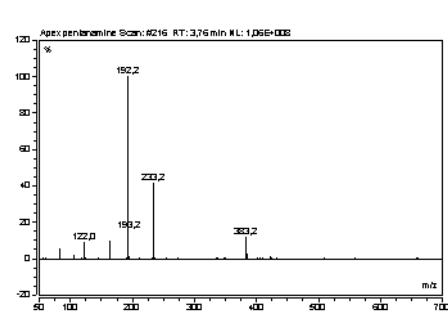
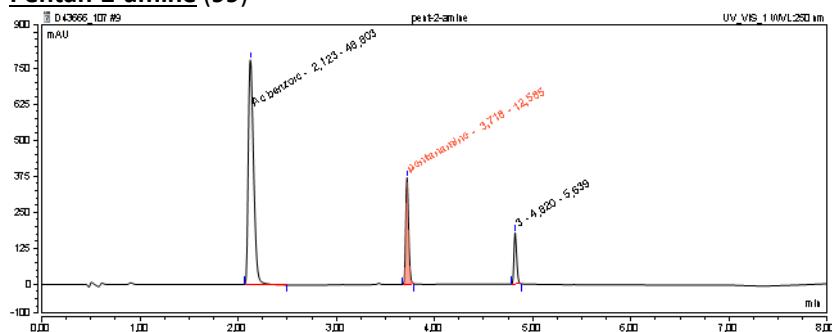
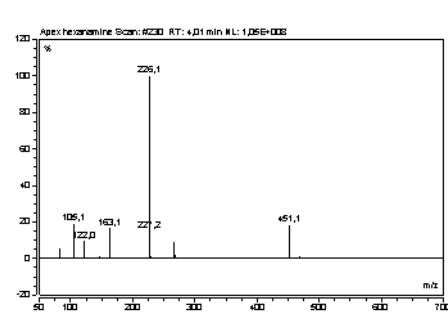
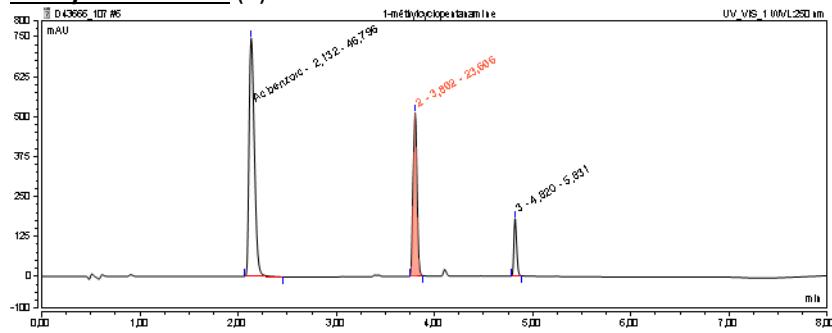
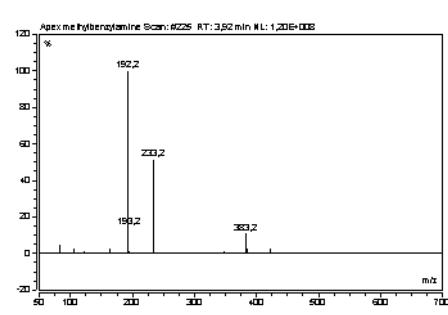
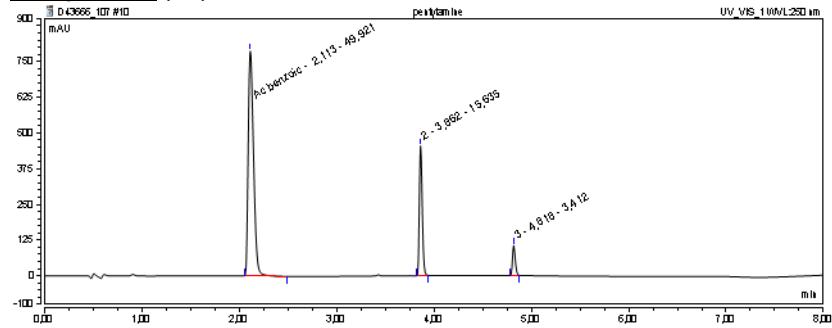


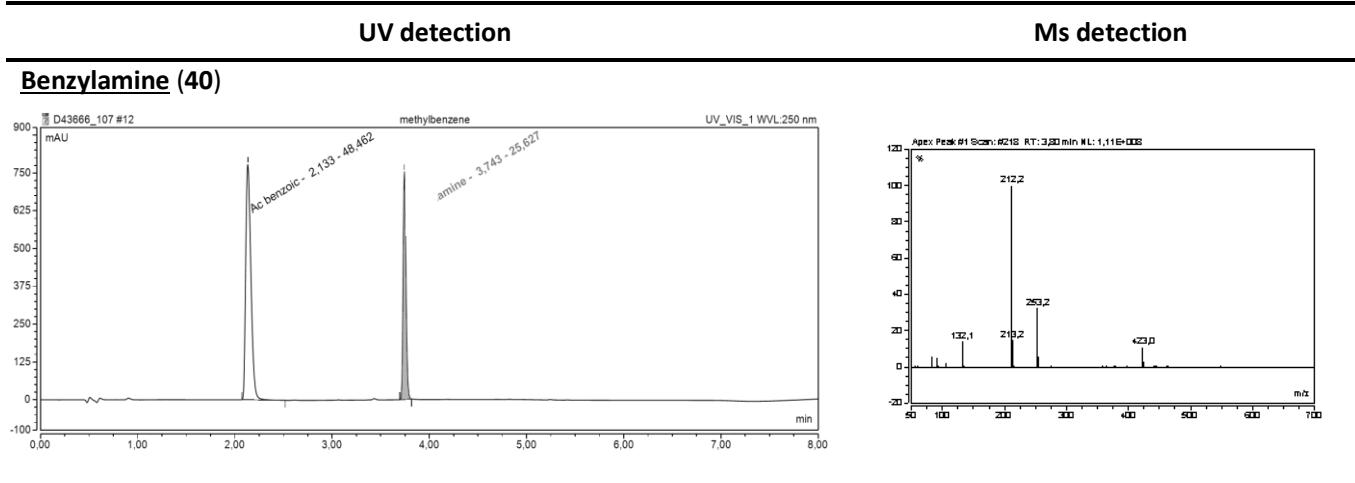
9.2.4. D-ornithine (113) and 91



9.2.5. BzCl - Condition H

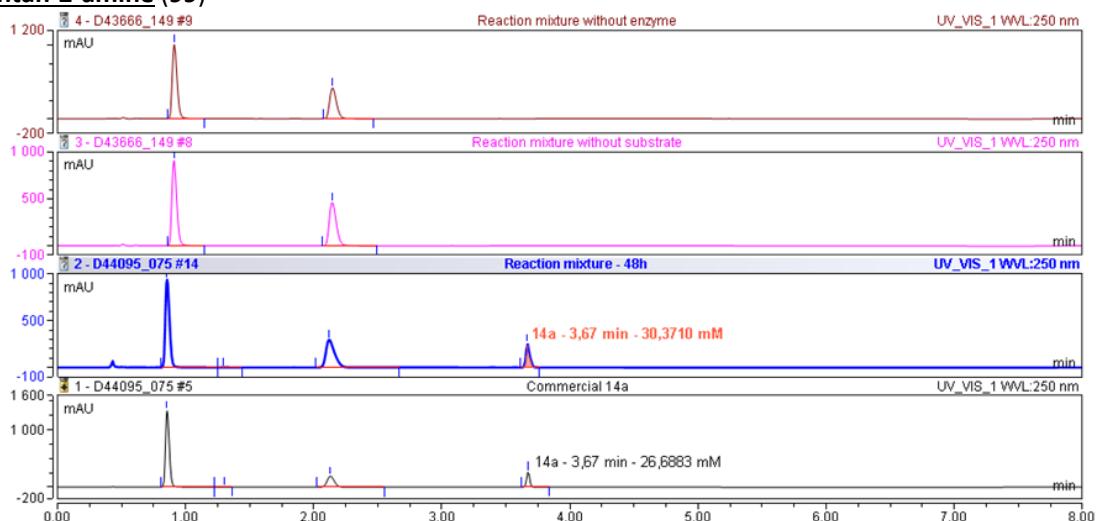


UV detection**Ms detection****2-methylcyclopentan-1-amine****Pentan-2-amine (99)****Phenylethanamine (1)****Pentylamine (65)**

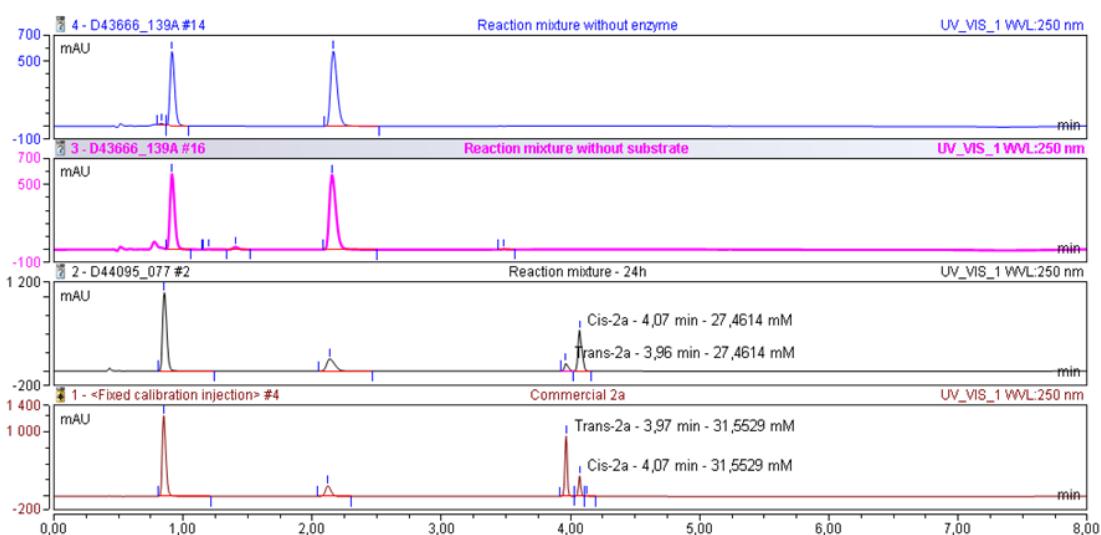


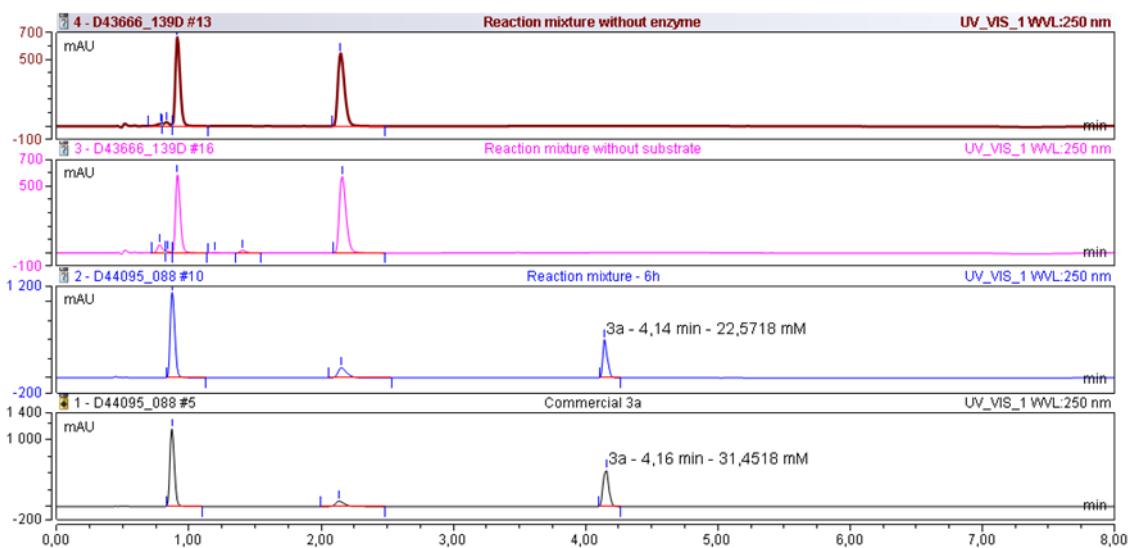
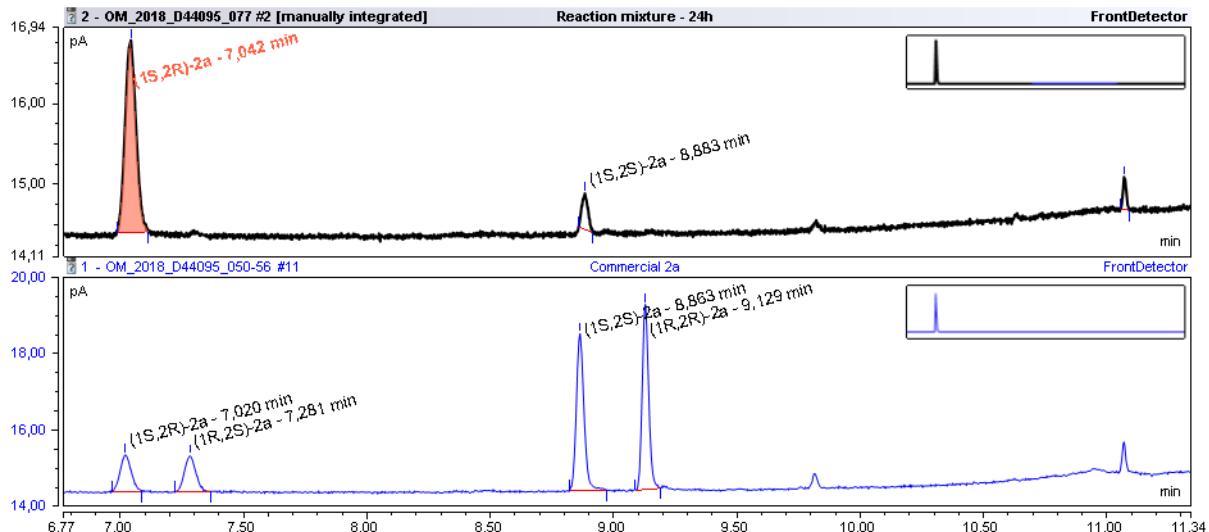
9.2.6. BzCl (Condition I) – 99, 154 and 66

Pentan-2-amine (99)

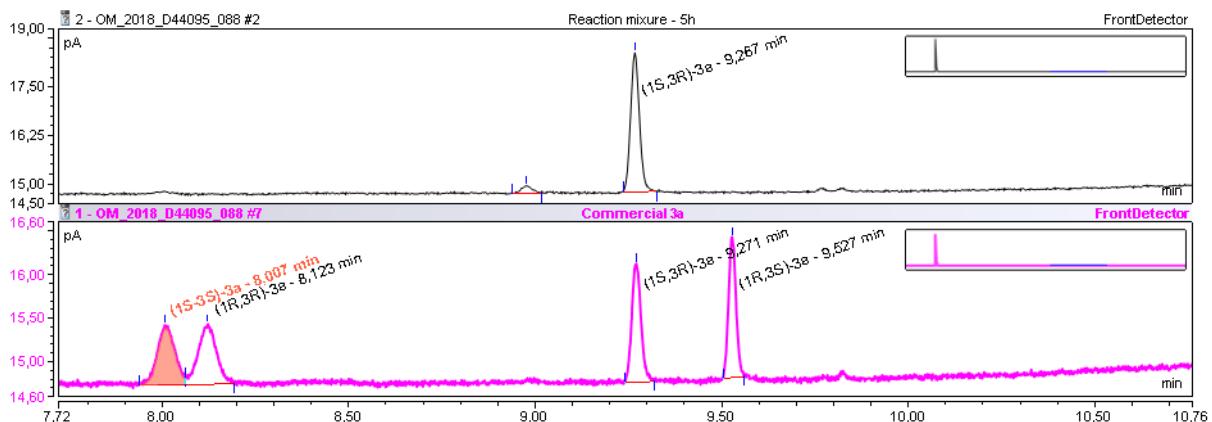


2-méthylcyclohexylamine (154)

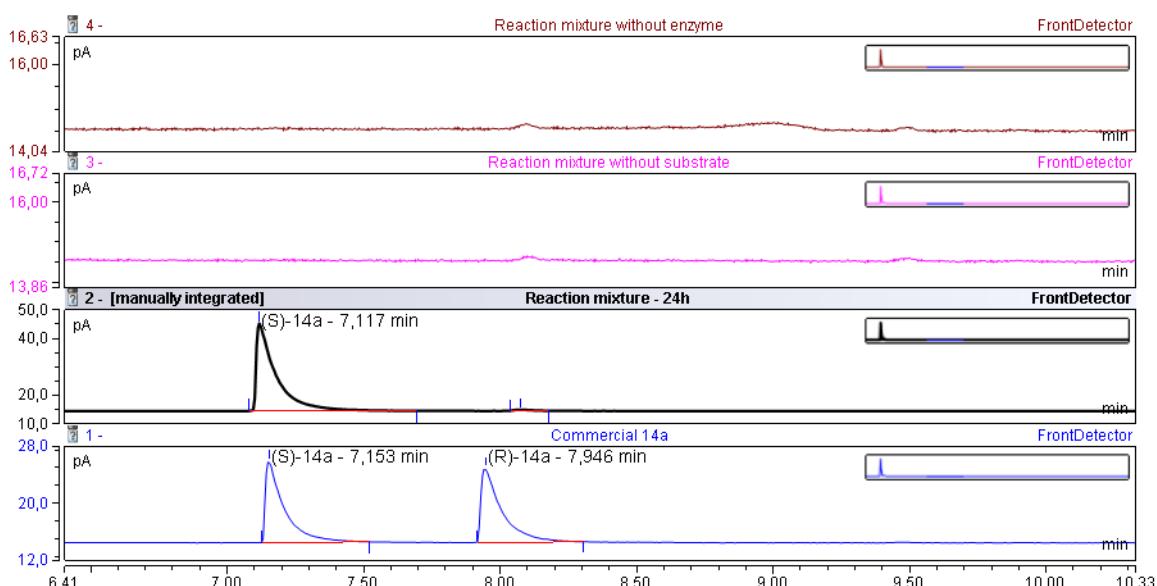


3-méthylcyclohexylamine (66)**9.3. CHIRAL GC-FID****9.3.1. *cis*-(*1S, 2R*)-2-methylcyclohexylamine hydrochloride ((*1S, 2R*)-154)**

9.3.2. *cis*-(*1S, 3R*)-3-methylcyclohexylamine hydrochloride ((*1S, 3R*)-66)

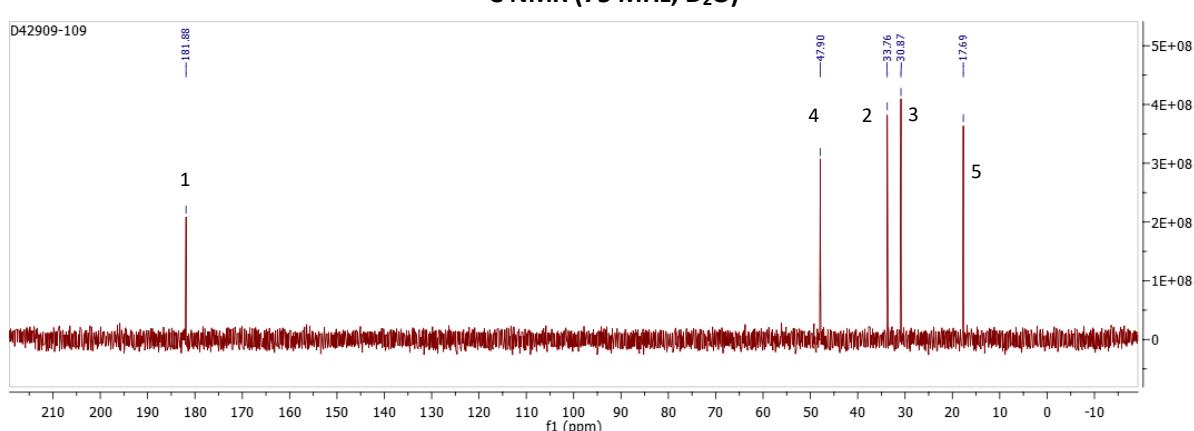
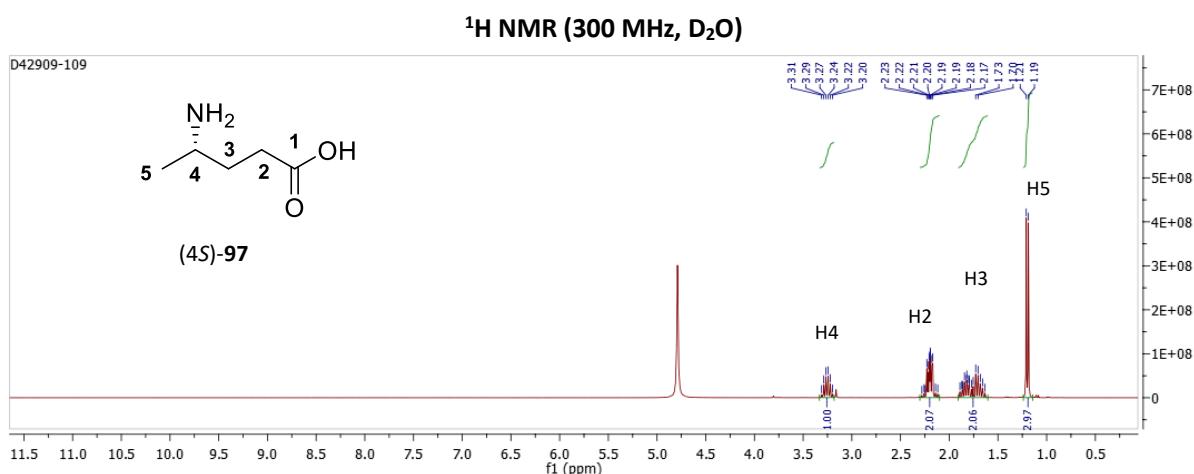


9.3.3. *(2S*)-Pentan-2-amine hydrochloride (*(2S*)-99)

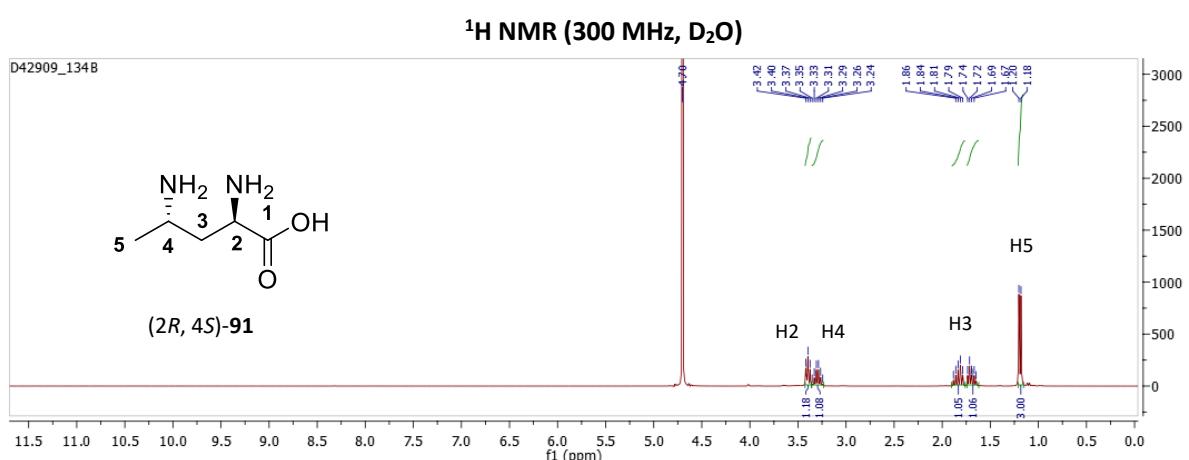


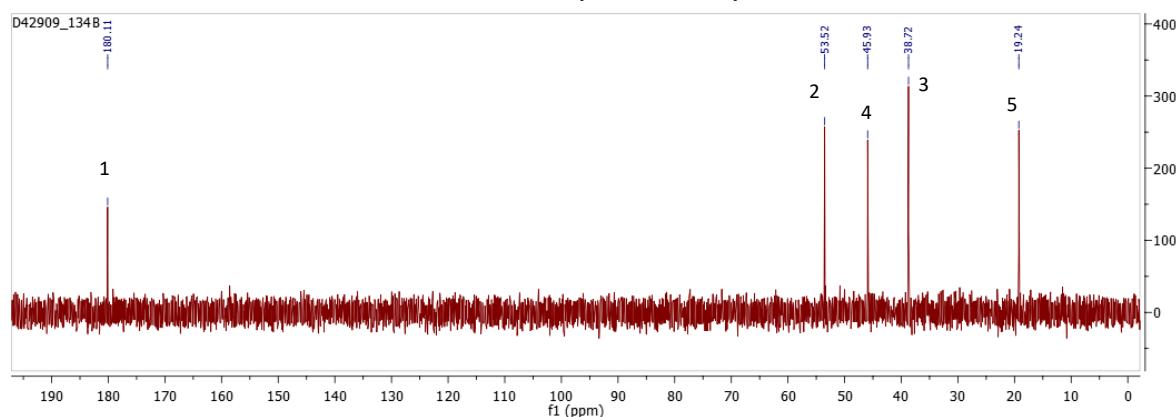
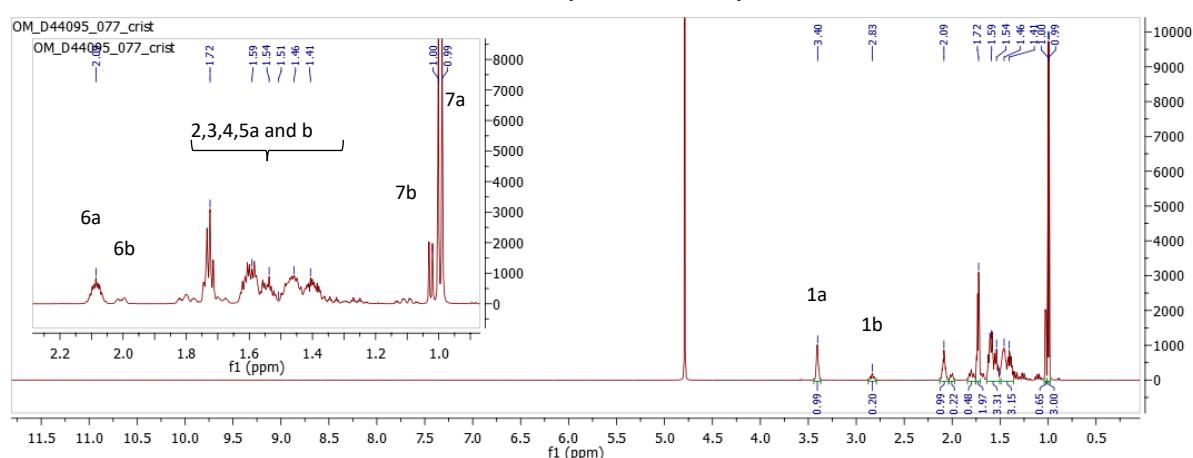
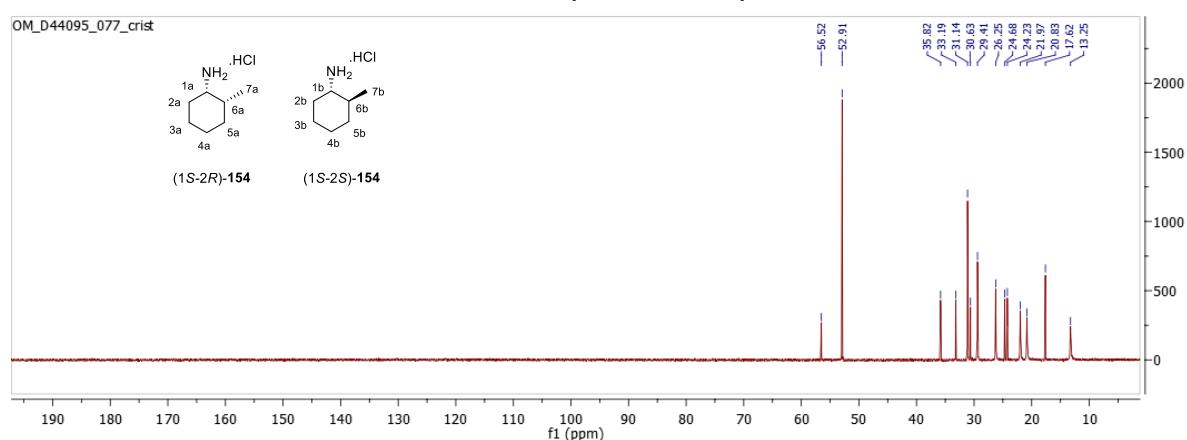
9.4. NMR

9.4.1. (*4S*)-4-aminopentanoic acid ((*4S*)-97)

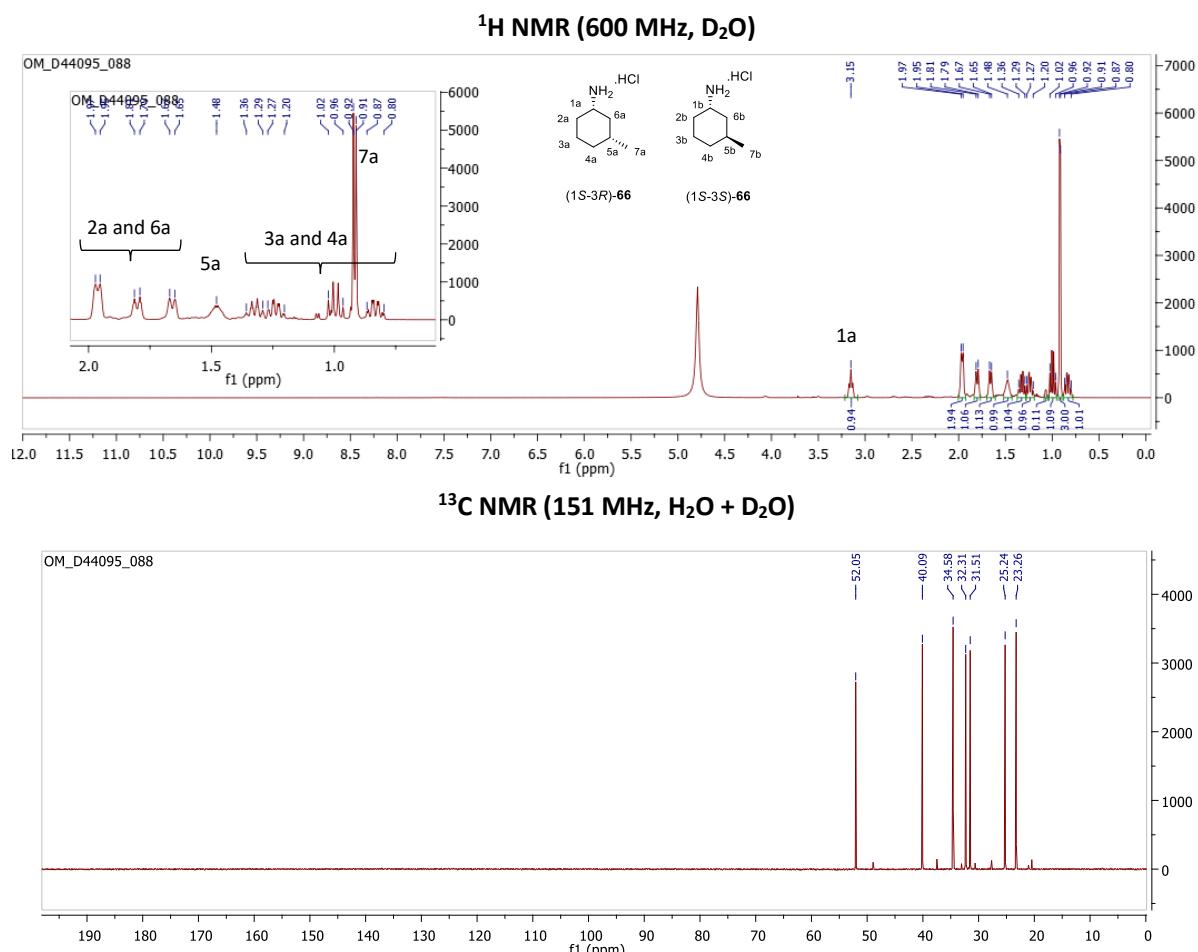


9.4.2. (*2R, 4S*)-2,4-diaminopentanoate ((*2R, 4S*)-91)

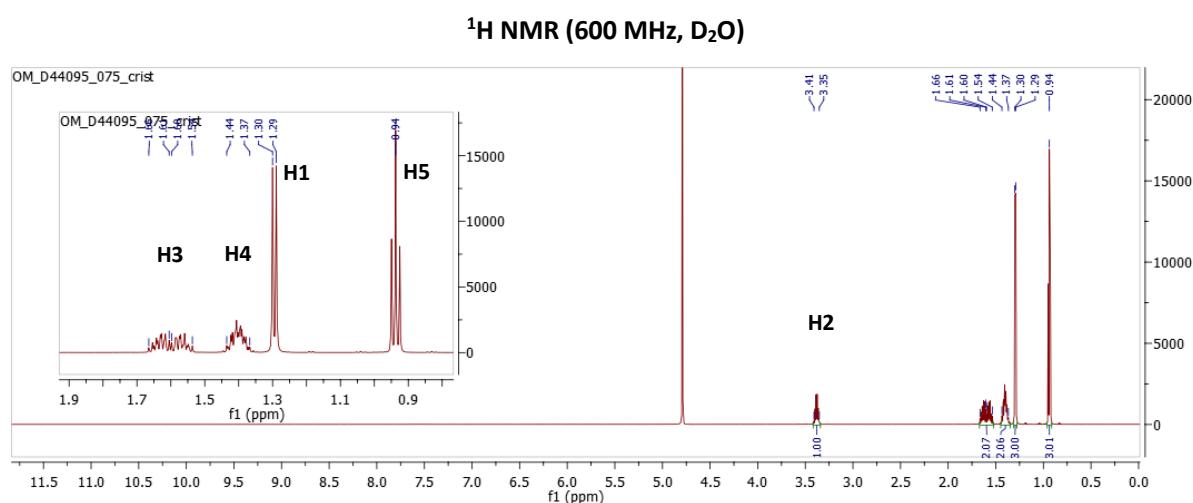


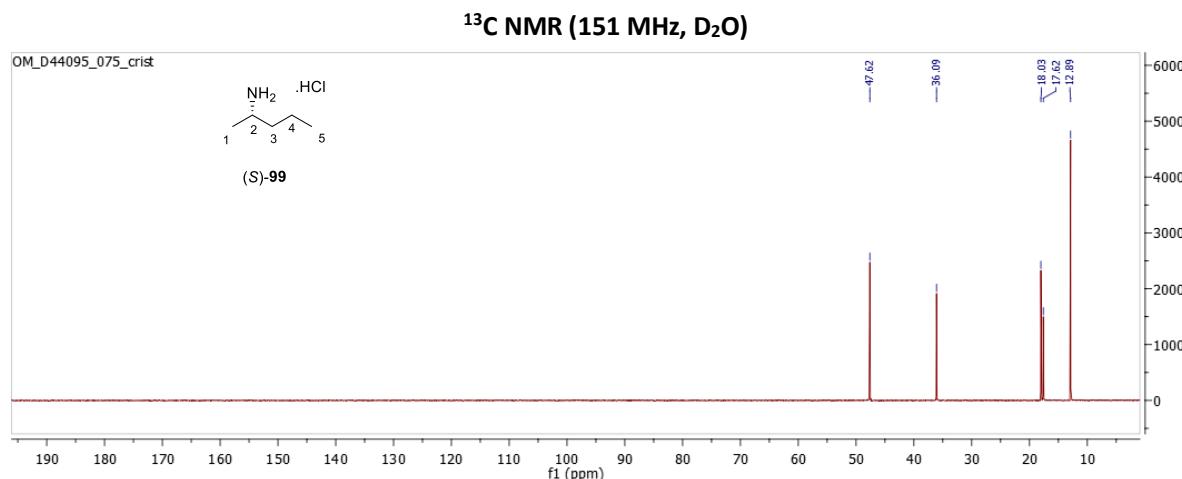
¹³C NMR (75 MHz, D₂O)**9.4.3. *cis*-(1*S*, 2*R*)-2-methylcyclohexylamine hydrochloride ((1*S*, 2*R*)-154)****¹H NMR (600 MHz, D₂O)****¹³C NMR (151 MHz, D₂O)**

9.4.4. *cis*-(1*S*, 3*R*)-3-methylcyclohexylamine hydrochloride ((1*S*, 3*R*)-66)



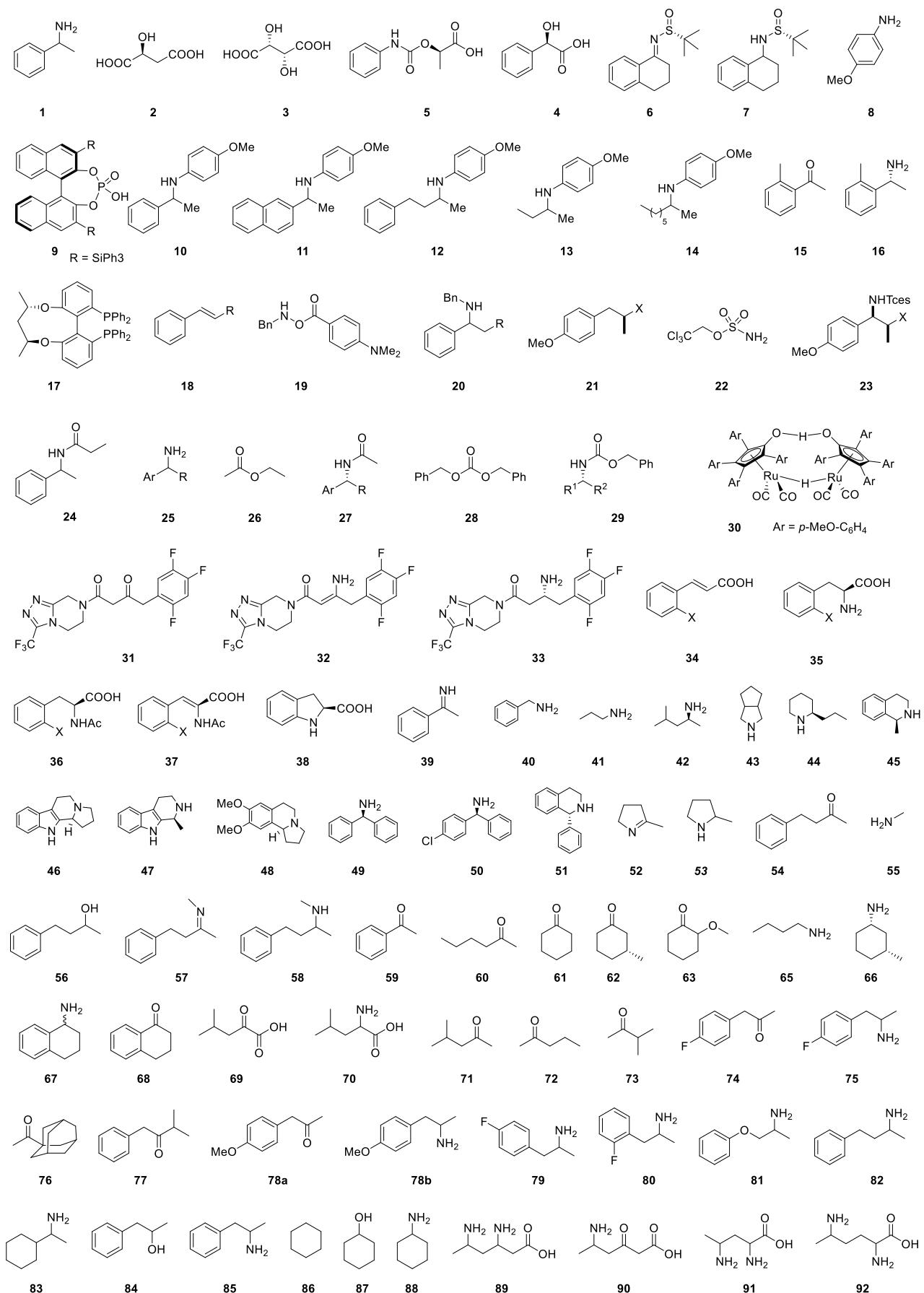
9.4.5. (2*S*)-Pentan-2-amine hydrochloride ((2*S*)-99)

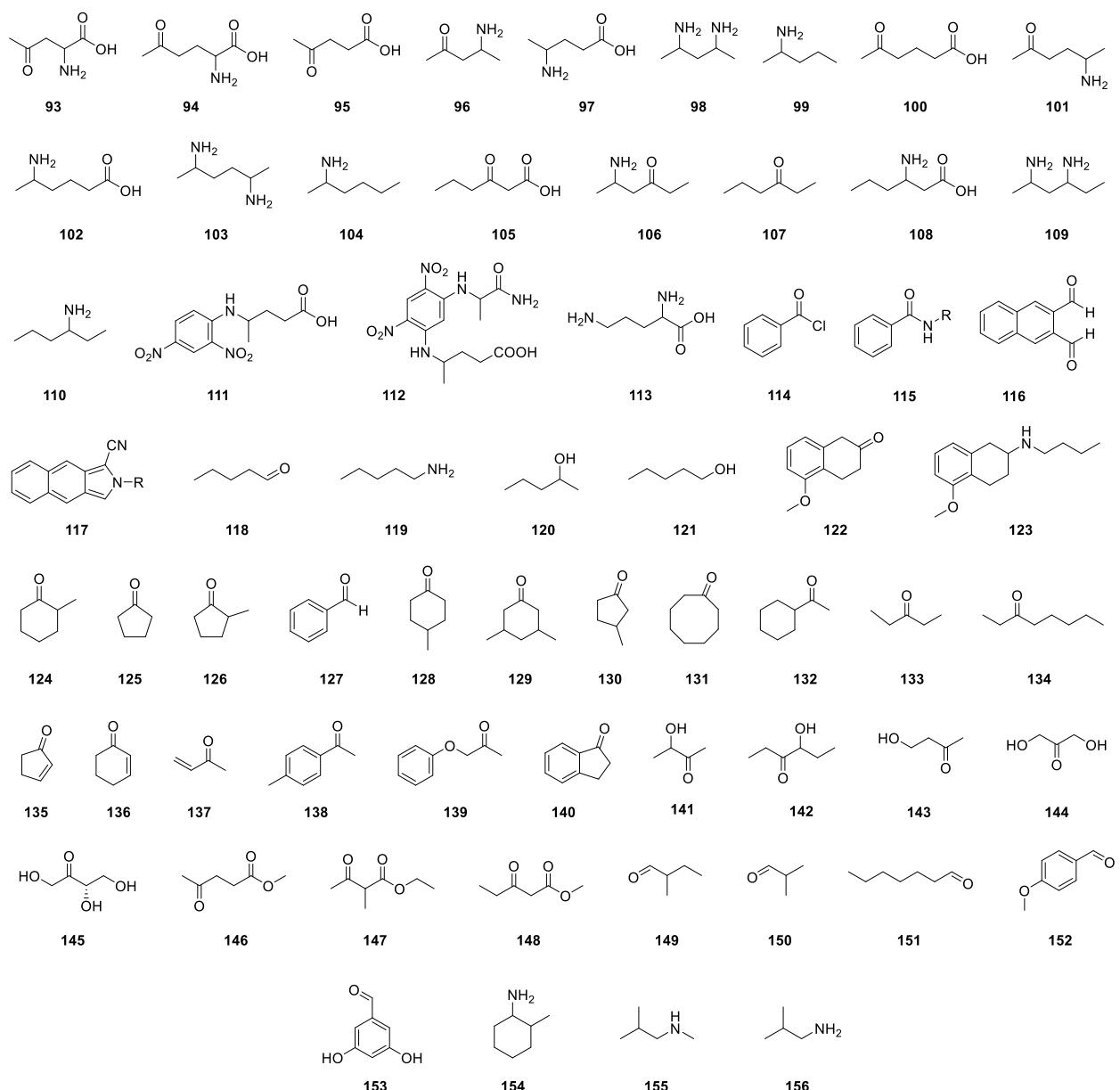




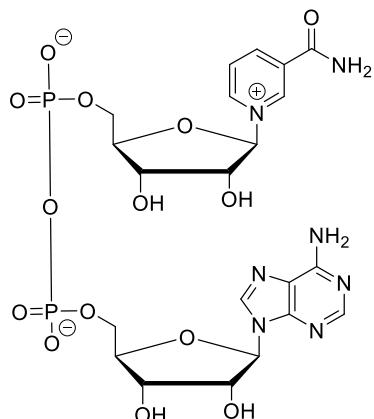
Annexes

Annexe 1 : Liste des molécules

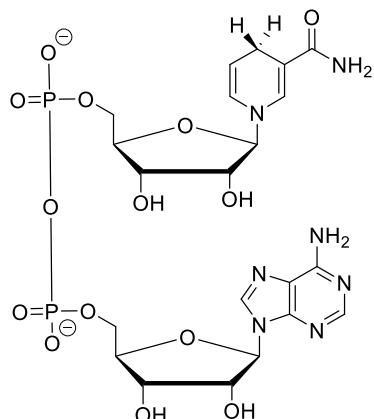




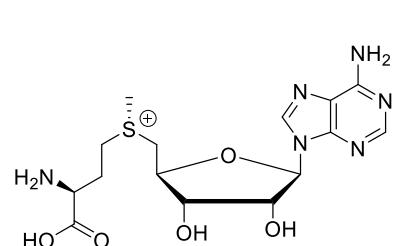
Annexe 2 : Structure des différents cofacteurs/coenzymes



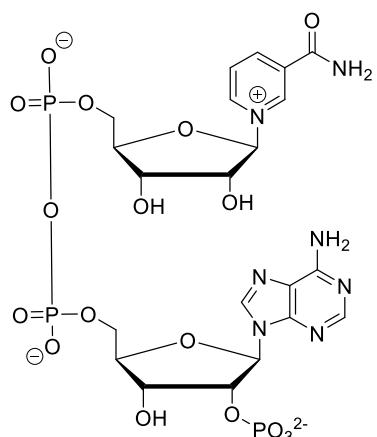
NAD⁺



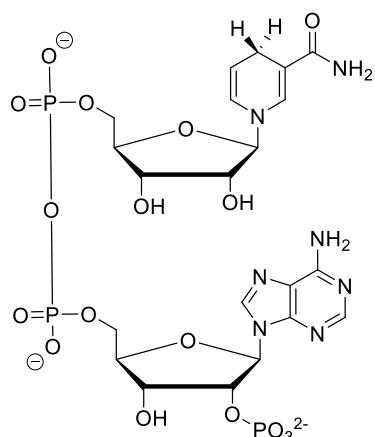
NADH



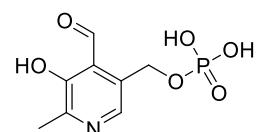
S-Adénosylméthionine (SAM)



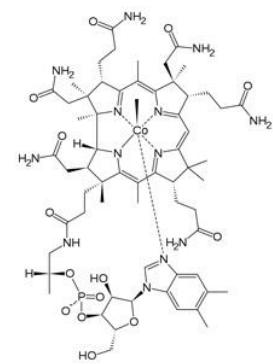
NADP⁺



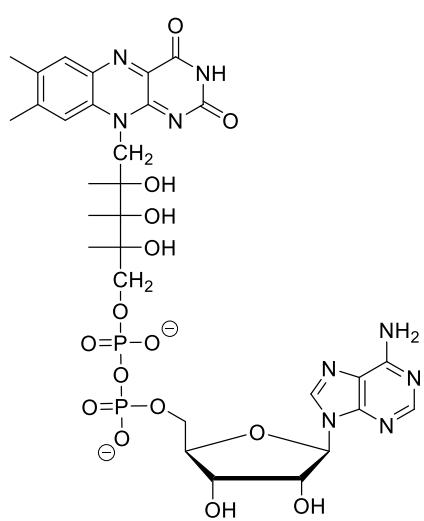
NADPH



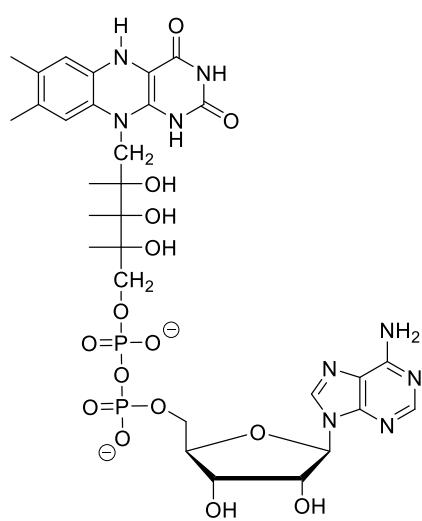
PLP



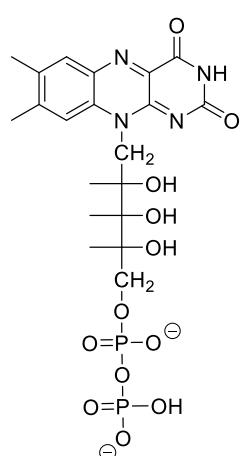
Coenzyme B12



FAD



FADH₂



FMN

Annexe 3 : Résultats du criblage de la plaque DH2

Best hit = enzyme du set de référence ayant ramener l'enzyme candidate. Rouge : Hit négatif ; Vert : hit positif ; Gris : activité non vérifiée en HPLC-UVMS.

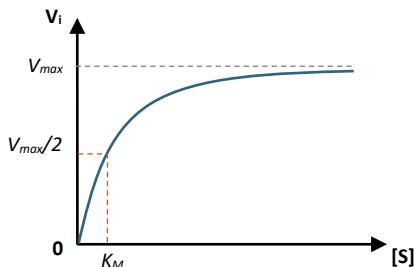
ID plaque	Id uniprot	Annotation	Génome	PCR	Best hit	95		100		105	
						spectro	Qtrap	spectro	Qtrap	Spectro	Qtrap
DH_2_A1	A7HJJ2		Fervidobacterium nodosum	+	E3PRJ9						
DH_2_A2	C6K83	Uncharacterized protein	Fusobacterium varium	+	E3PRJ9						
DH_2_A3	H2J562	Threonine dehydrogenase-like	Marinotoga piezophila	+	E3PRJ9						
DH_2_A4	Q8RHX3	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase	Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum	+	E3PRJ9						
DH_2_A5	A3DKP5	Dihydrodipicolinate reductase	Staphylothermus marinus	+	E3PY99						
DH_2_A6	A6LIG7	Uncharacterized protein	Thermosiphon melanesiensis	+	E3PRJ9						
DH_2_A7	A6LLG5	Dihydrodipicolinate reductase	Thermosiphon melanesiensis	+	E3PY99						
DH_2_A8	A7HNJ8	Dihydrodipicolinate reductase	Fervidobacterium nodosum	+	E3PY99						
DH_2_A9	A8F7T4	Alcohol dehydrogenase	Thermotoga lettingae	+	E3PRJ9						
DH_2_A10	A8MGL6	Dihydrodipicolinate reductase	Alkaliphilus oremlandii	+	E3PY99						
DH_2_A11	A8MLR2	Alcohol dehydrogenase zinc	Alkaliphilus oremlandii	+	E3PRJ9						
DH_2_A12	A9BG42	Uncharacterized protein	Petrotoga mobilis	+	E3PRJ9						
DH_2_B1	A9BHL2	Dihydrodipicolinate reductase	Petrotoga mobilis	+	E3PY99						
DH_2_B2	B2A1K9	Dihydrodipicolinate reductase	Natranaerobius thermophilus	+	E3PY99						
DH_2_B3	B2A638	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase	Natranaerobius thermophilus	+	E3PRJ9						
DH_2_B4	B2A656	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase	Natranaerobius thermophilus	+	E3PRJ9						
DH_2_B5	D6BCX0	Dihydrodipicolinate reductase	Fusobacterium nucleatum	-	E3PY99						
DH_2_B6	E3DP58	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase	Halanaerobium praevalens	+	E3PRJ9						
DH_2_B7	E3PRJ9	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase	Clostridium sticklandii	?	E3PRJ9						
DH_2_B8	E3PY99	(2R,4S)-2,4-diaminopentanoate dehydrogenase	Clostridium sticklandii	+	E3PY99						
DH_2_B9	H2J4B2	Uncharacterized protein	Marinotoga piezophila	-	E3PY99						
DH_2_B10	J8VJ32	Dihydrodipicolinate reductase	Fusobacterium nucleatum	+	E3PY99						
DH_2_B11	M5DWV1	3,5-diaminobenzoate dehydrogenase	Halanaerobium saccharolyticum	+	E3PRJ9						
DH_2_B12	254_182_235802	Putative uncharacterized protein	cloaca	+	E3PRJ9						
DH_2_C1	A1HN4	Dihydrodipicolinate reductase	Thermosinus carboxydovorans	+	E3PY99						
DH_2_C2	B0MVA9	Uncharacterized protein	Alistipes putredinis	?	E3PRJ9						
DH_2_C3	BOV11	3,5-diaminohexanoate dehydrogenase	Cloacamonas acidaminovorans (strain Evny).	+	E3PRJ9						
DH_2_C4	B2RY9	Putative uncharacterized protein	Porphyromonas gingivalis	+	E3PRJ9						
DH_2_C5	B8D005	Dihydrodipicolinate reductase	Halothermothrix orenii	+	E3PY99						
DH_2_C6	COGE84	Alcohol dehydrogenase, zinc-binding	Dethiobacter alkaliphilus AHT 1.	+	E3PRJ9						
DH_2_C7	C5CDJ7	Dihydrodipicolinate reductase	Kosmotoga olearia	+	E3PY99						
DH_2_C8	C5CH07	Zinc-binding alcohol dehydrogenase	Kosmotoga olearia	+	E3PRJ9						
DH_2_C9	D2RES1	Putative uncharacterized protein	Archaeoglobus profundus	+	E3PY99						
DH_2_C10	D2Z5Z0	Dihydrodipicolinate reductase	Dethiosulfovibrio peptidovorans	+	E3PY99						
DH_2_C11	D7DCF5	Dihydrodipicolinate reductase	Staphylothermus hellenicus	+	E3PY99						
DH_2_C12	D9RY14	Dihydrodipicolinate reductase	Thermosediminibacter oceanii	+	E3PY99						
DH_2_D1	F7NFK3	Zinc-binding alcohol dehydrogenase	Acetonebacter longum	?	E3PRJ9						
DH_2_D2	F7NI02	Dihydrodipicolinate reductase	Acetonebacter longum	+	E3PY99						
DH_2_D3	Q21RL4	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase	Rhodoferax ferrireducens	+	E3PRJ9						
DH_2_D4	Q8RAI4	Putative uncharacterized protein	Thermoanaerobacter tengcongensis	+	E3PY99						
DH_2_D5	Q8RBT7	Putative uncharacterized protein	Thermoanaerobacter tengcongensis	+	E3PRJ9						
DH_2_D6	2240_12_12473	Putative uncharacterized protein	cloaca	-	E3PY99						
DH_2_D7	A7NN21	Dihydrodipicolinate reductase	Roseiflexus castenholzii	?	E3PY99						
DH_2_D8	B9KZ11	Dihydrodipicolinate reductase	Thermomicrombium roseum	+	E3PY99						
DH_2_D9	C1B6H2	Uncharacterized protein	Rhodococcus opacus	-	E3PY99						
DH_2_D10	H8MLV8	Uncharacterized protein	Coralloccoccus coralloides	+	E3PRJ9						
DH_2_D11	Q1D459	Putative uncharacterized protein	Myxococcus xanthus	+	E3PRJ9						
DH_2_D12	Q5ZOC1	Uncharacterized protein	Nocardia farcinica	-	E3PY99						
DH_2_E1	Q6A511	Conserved oxidoreductase	Propionibacterium acnes	+	E3PY99						
DH_2_E2	A4X763	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase	Salinispora tropica	+	E3PRJ9						
DH_2_E3	B8JHN3	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase	Anaeromyxobacter dehalogenans	+	E3PRJ9						
DH_2_E4	C4RBF4	Putative uncharacterized protein	Micromonospora	-	E3PRJ9						
DH_2_E5	D1A2V8	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase	Thermomonospora curvata	+	E3PRJ9						
DH_2_E6	D2PMV9	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase	Kribbella flavidia	+	E3PRJ9						
DH_2_E7	D3PZR7	Zinc-binding alcohol dehydrogenase	Stackebrandtia nassauensis	+	E3PRJ9						
DH_2_E8	D9TCF1	Putative uncharacterized protein	Micromonospora aurantiaca	+	E3PRJ9						
DH_2_E9	E6SAM9	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase	Intrasporangium calvum	+	E3PRJ9						
DH_2_E10	F2RIU2	Dihydrodipicolinate reductase	Streptomyces venezuelae	-	E3PY99						
DH_2_E11	I0HAE5	Uncharacterized protein	Actinoplanes missouriensis	-	E3PRJ9						
DH_2_E12	K0K231	Uncharacterized protein	Saccharothrix espanaensis	?	E3PRJ9						
DH_2_F1	Q08SM6	Conserved uncharacterized protein	Stigmatella aurantiaca	-	E3PRJ9						
DH_2_F2	Q2S1R9	Conserved oxidoreductase	Salinibacter ruber	+	E3PY99						
DH_2_F3	pet										
DH_2_F4	glutamate DH										

Annexe 4 : Enzymes michaeliennes

Les enzymes dites michaeliennes suivent une cinétique de réaction hyperbolique, décrite par l'équation de Michaëlis et Menten qui relie la concentration initiale en substrat à la vitesse maximale de la catalyse enzymatique.

Equation de Michaëlis et Menten

$$V_i = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M + [S]}$$



Avec V_i = vitesse initiale de la réaction ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ prot), V_{max} = vitesse maximale ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ prot), $[S]$ = concentration initiale en substrat (M), K_M = constante de Michaëlis (M).

Ce type de cinétique signifie que les sites actifs des enzymes sont indépendants, qu'ils se trouvent ou non sur le même monomère. Trois paramètres sont définis pour de telles cinétiques :

- **La constante cinétique ou constante de Michaëlis K_M (M).** C'est la concentration en substrat pour laquelle l'enzyme est à la moitié de sa vitesse catalytique maximale. Elle traduit l'affinité de l'enzyme pour son substrat : plus sa valeur est faible, plus l'affinité est grande. Inversement, plus cette constante est grande, plus son affinité est faible.
- **La constante catalytique k_{cat} ou turn over number (s^{-1}).** Elle caractérise la vitesse de la catalyse et s'exprime en s^{-1} . C'est la vitesse de transformation du substrat (ou apparition du produit) par minute et par mole de protéine. Plus le k_{cat} est élevé, plus la réaction est rapide.
- **La constante de spécificité k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$).** Elle est donnée par le rapport de la constante catalytique sur la constante cinétique et détermine l'efficacité de l'enzyme. Plus sa valeur est grande plus la catalyse est efficace.

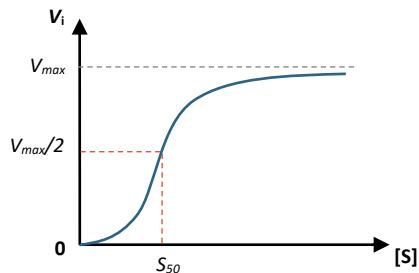
Le calcul de ces constantes permet notamment la comparaison des substrats, mais rend compte aussi de l'efficacité d'une enzyme par rapport à d'autres. Dans le cas où une enzyme n'est pas caractérisée, il est possible grâce aux valeurs de ces constantes de savoir si la réaction étudiée peut être la réaction métabolique de l'enzyme (k_{cat}/K_M élevé) ou si au contraire, ce n'est qu'une activité secondaire (k_{cat}/K_M faible).

Annexe 5 : Enzymes allostériques

Les enzymes allostériques suivent une cinétique sigmoïdale, caractérisée par l'équation de Hill. Cette équation ressemble à celle définie par Michaëlis et Menten, mais fait apparaître le coefficient de Hill n . Ce dernier décrit le degré de coopérativité de fixation du ligand : lorsqu'un substrat se fixe dans son site actif, il favorise la fixation d'un second sur un autre monomère. Ceci peut se traduire notamment par un changement de conformation. Contrairement aux enzymes michaéliennes, les sites ne sont donc pas indépendants et une allostérie implique que l'enzyme soit au moins dimérique.

Equation de Hill

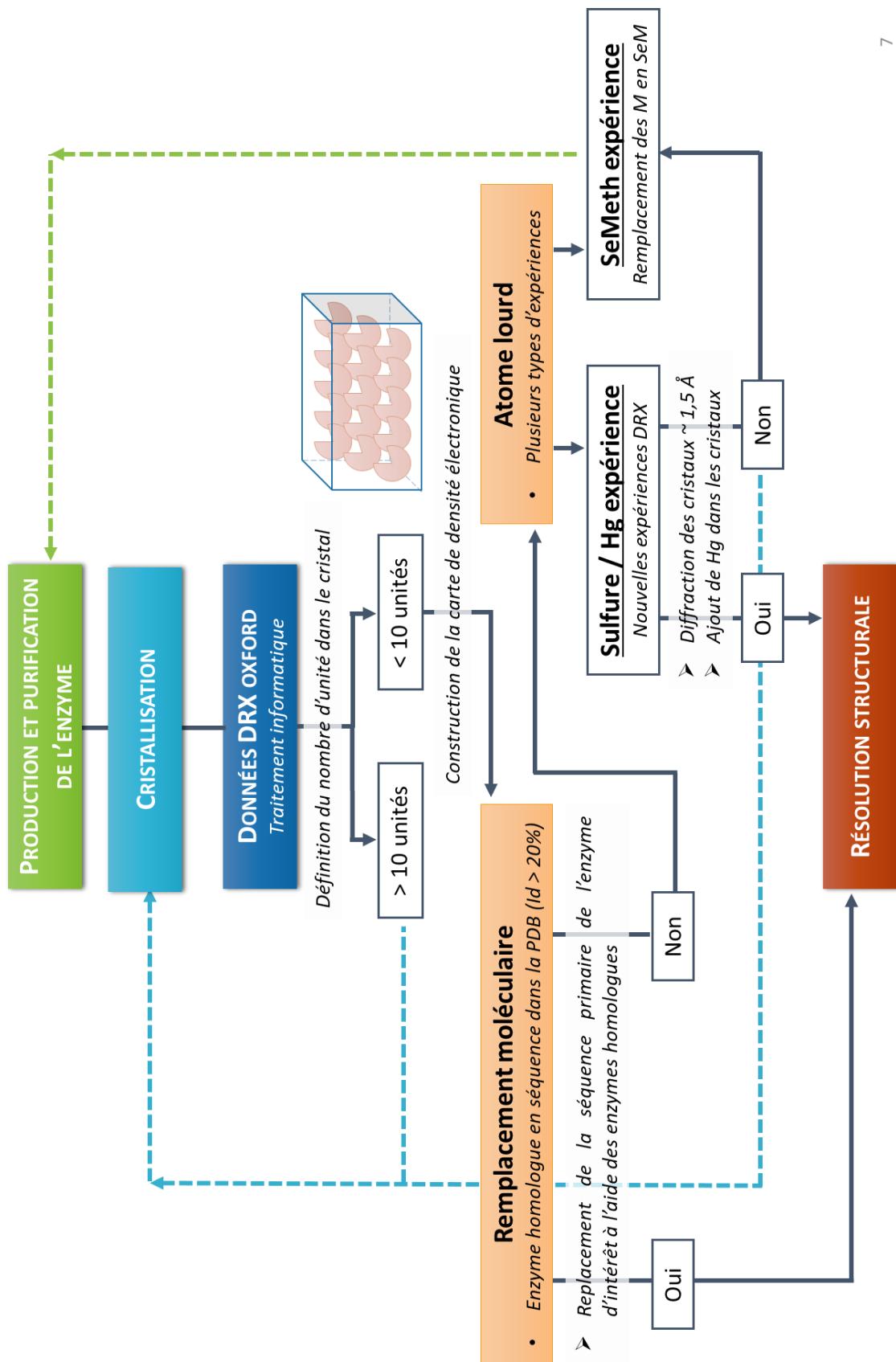
$$V_i = \frac{V_{max} \times [S]^n}{S_{50} + [S]^n}$$



Avec V_i = vitesse initiale de la réaction ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$), V_{max} = vitesse maximale ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$), $[S]$ = concentration initiale en substrat (M), S_{50} = concentration initiale en S pour laquelle $V_i = V_{max}/2$, n = coefficient de Hill.

Les paramètres cinétiques diffèrent également de ceux définis pour une enzyme michaélienne. On détermine dans ce cas-là, le S_{50} , correspondant à la concentration en substrat pour laquelle l'enzyme est à la moitié de sa vitesse catalytique maximale, et la vitesse maximale V_{max} exprimée en s^{-1} .

Annexe 6 : Etapes de la résolution structurale d'une enzyme par cristallisation



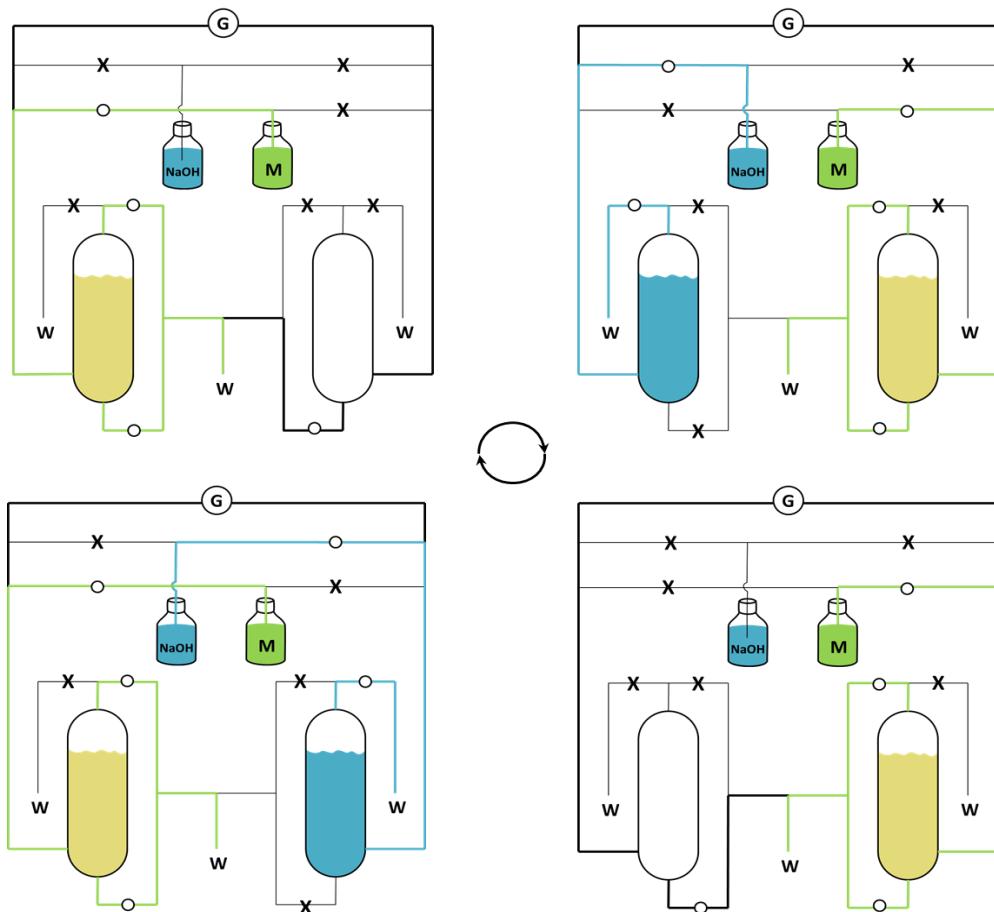
Annexe 7 : Contexte génomique des enzymes hits de la plaque DH2

Contexte génomique de DH2A8/C10/D4, hits du criblage spectrophotométrique, et de DH2A7/C5/C7/A10, trouvées par homologie modélisation. Contexte génomique réalisé avec l'interface Microscope (<http://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/>) (Vallenet *et al.*, 2017). AKTP et OA : Gène caractéristique de la voie de fermentation de l'ornithine. C5CDJ7 = DH2C7 ; A7HNJ8 = DH2A8 ; A6LLG5 = DH2A7 ; Q8RAI4 = DH2D4 ; B8D005 = DH2C5 ; E3PY99 = DH2B8* ; D2Z5Z0 = DH2C10 ; A8MGL6 = DH2A10.



Annexe 8 : Système de double chambre de l'automate GM3

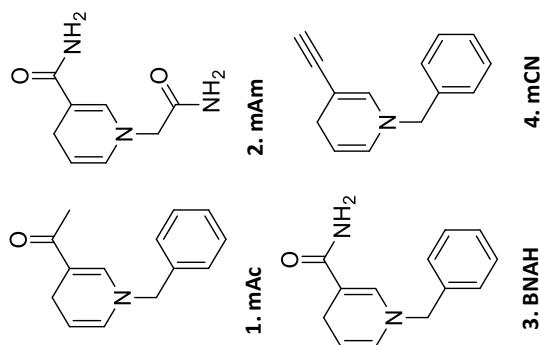
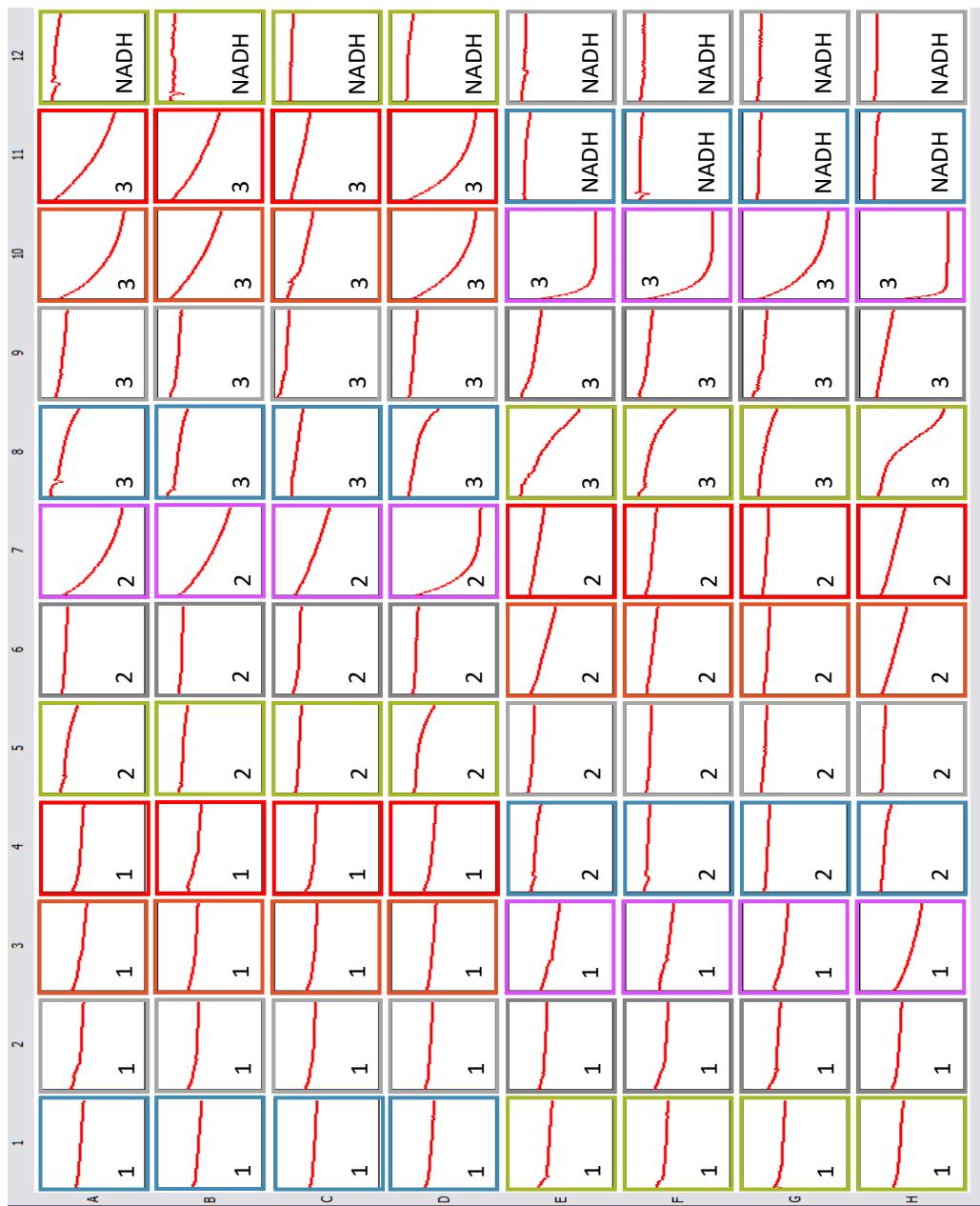
Alimentation en gaz (G), réserve de milieu (M en vert), agent stérilisant (NaOH 5M en bleu), déchet (W), culture bactérienne (en beige). Les valves sont indiquées par X ou O, respectivement pour les positions fermées et ouvertes. Les flux sont indiqués par les lignes en gras. © T.Souterre, thèse de doctorat 2017.



Annexe 9 : Suivi spectrophotométrique de la dégradation des cofacteurs

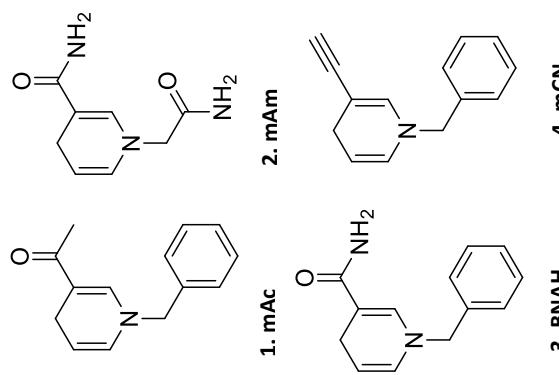
Plaque 1

Buffer 1	NH ₄ Cl/NH ₄ OH pH 8,9,10 – 200 mM
Buffer 2	NH ₄ COOH/NH ₄ Cl pH 8,9,10 – 200 mM
Buffer 3	NaHCO ₃ / Na ₂ CO ₃ pH 9,10,11 – 200 mM
Buffer 4	TRIS pH 7,8,9 – 200 mM
Buffer 5	MOPS pH 6,7,8 – 200 mM
Buffer 6	H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻ pH 5,6,7 – 200 mM
Buffer 7	HEPES pH 6,5,7,5,8,5 – 200 mM



Plaque 2.

Buffer 1 NH₄Cl/NH₄OH pH 8,9,10 – 200 mM
 Buffer 2 NH₄COOH/NH₄Cl pH 8,9,10 – 200 mM
 Buffer 3 NaHCO₃/Na₂CO₃ pH 9,10,11 – 200 mM
 Buffer 4 TRIS pH 7,8,9 – 200 mM
 Buffer 5 MOPS pH 6,7,8 – 200 mM
 Buffer 6 H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ pH 5,6,7 – 200 mM
 Buffer 7 HEPES pH 6,5,7,5,8,5 – 200 mM



Annexe 10 : Liste de l'ensemble des enzymes ciblées par la plateforme du LCAB

* Enzyme appartenant au set de référence. Vert : enzymes hits purifiées dont l'activité AmDH a été validée.
Rouge : enzymes hits purifiées dont l'activité AmDH n'a pas été validée.

N°	Id plaque	Id Uniprot	Genome	Annotation
1	DH_2_A1	A7HJJ2	<i>Fervidobacterium nodosum</i>	Uncharacterized protein
2	DH_2_A2	C6JK83	<i>Fusobacterium varium</i>	Uncharacterized protein
3	DH_2_A3	H2J562	<i>Marinitoga piezophila</i>	Threonine dehydrogenase
4	DH_2_A4	Q8RHX3	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase
5	DH_2_A5	A3DKP5	<i>Staphylothermus marinus</i>	Dihydrodipicolinate reductase
6	DH_2_A6	A6LJG7	<i>Thermosiphon melanesiensis</i>	Uncharacterized protein
7	DH_2_A7	A6LLG5	<i>Thermosiphon melanesiensis</i>	Dihydrodipicolinate reductase
8	DH_2_A8	A7HNJ8	<i>Fervidobacterium nodosum</i>	Dihydrodipicolinate reductase
9	DH_2_A9	A8F7T4	<i>Thermotoga lettingae</i>	Alcohol dehydrogenase zinc-binding domain protein
10	DH_2_A10	A8MGL6	<i>Clostridium oremlandii</i>	Dihydrodipicolinate reductase
11	DH_2_A11	A8MLR2	<i>Clostridium oremlandii</i>	Alcohol dehydrogenase zinc-binding domain protein
12	DH_2_A12	A9BG42	<i>Petrotoga mobilis</i>	Uncharacterized protein
13	DH_2_B1	A9BHL2	<i>Petrotoga mobilis</i>	Dihydrodipicolinate reductase
14	DH_2_B2	B2A1K9	<i>Natranaeaerobius thermophilus</i>	Dihydrodipicolinate reductase
15	DH_2_B3	B2A638	<i>Natranaeaerobius thermophilus</i>	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase
16	DH_2_B4	B2A656	<i>Natranaeaerobius thermophilus</i>	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase
17	DH_2_B5	D6BCX0	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Dihydrodipicolinate reductase
18	DH_2_B6	E3DP58	<i>Halanaerobium prævalens</i>	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase
19	DH_2_B7*	E3PRJ9	<i>Clostridium sticklandii</i>	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase
20	DH_2_B8*	E3PY99	<i>Clostridium sticklandii</i>	(2R,4S)-2,4-diaminopentanoate dehydrogenase
21	DH_2_B9	H2J4B2	<i>Marinitoga piezophila</i>	Uncharacterized protein
22	DH_2_B10	J8VJ32	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Dihydrodipicolinate reductase
23	DH_2_B11	M5DWV1	<i>Halanaerobium saccharolyticum</i>	3,5-diaminobexanoate dehydrogenase
24	DH_2_B12	254_182_235802	cloaca	Putative uncharacterized protein
25	DH_2_C1	A1HNV4	<i>Thermosinus carboxydovorans Nor1.</i>	Dihydrodipicolinate reductase
26	DH_2_C2	B0MVA9	<i>Alistipes putredinis</i>	Uncharacterized protein
27	DH_2_C3	B0VJ11	<i>Cloacamonas acidaminovorans</i>	3,5-diaminohexanoate dehydrogenase
28	DH_2_C4	B2RJY9	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Putative uncharacterized protein
29	DH_2_C5	B8D005	<i>Halothermothrix orenii</i>	Dihydrodipicolinate reductase
30	DH_2_C6	COGEBA4	<i>Dethiobacter alkalinophilus AHT 1.</i>	Alcohol dehydrogenase, zinc-binding
31	DH_2_C7	C5CDJ7	<i>Kosmotoga olearia</i>	Dihydrodipicolinate reductase
32	DH_2_C8	C5CH07	<i>Kosmotoga olearia</i>	Zinc-binding alcohol dehydrogenase
33	DH_2_C9	D2RES1	<i>Archaeoglobus profundus</i>	Putative uncharacterized protein
34	DH_2_C10	D2Z5Z0	<i>Dethiosulfovibrio peptidorovans .</i>	Dihydrodipicolinate reductase
35	DH_2_C11	D7DCF5	<i>Staphylothermus hellenicus</i>	Dihydrodipicolinate reductase
36	DH_2_C12	D9RY14	<i>Thermosediminibacter oceanii</i>	Dihydrodipicolinate reductase
37	DH_2_D1	F7NFK3	<i>Acetonema longum</i>	Zinc-binding alcohol dehydrogenase
38	DH_2_D2	F7NI02	<i>Acetonema longum</i>	Dihydrodipicolinate reductase
39	DH_2_D3	Q21RL4	<i>Rhodoferax ferrireducens</i>	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase
40	DH_2_D4	Q8RAI4	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	Putative uncharacterized protein
41	DH_2_D5	Q8RBT7	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	Putative uncharacterized protein
42	DH_2_D6	2240_12_12473	cloaca	Putative uncharacterized protein
43	DH_2_D7	A7NN21	<i>Roseiflexus castenholzii</i>	Dihydrodipicolinate reductase
44	DH_2_D8	B9KZJ1	<i>Thermomicrobium roseum</i>	Dihydrodipicolinate reductase
45	DH_2_D9	C1B6H2	<i>Rhodococcus opacus</i>	Uncharacterized protein
46	DH_2_D10	H8MLV8	<i>Corallococcus coralloides</i>	Uncharacterized protein
47	DH_2_D11	Q1D459	<i>Myxococcus xanthus</i>	Putative uncharacterized protein
48	DH_2_D12	Q5Z0C1	<i>Nocardia farcinica</i>	Uncharacterized protein
49	DH_2_E1	Q6A511	<i>Propionibacterium acnes</i>	Conserved oxidoreductase
50	DH_2_E2	A4X763	<i>Salinispora tropica</i>	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase
51	DH_2_E3	B8JHN3	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase
52	DH_2_E4	C4RBF4	<i>Micromonospora sp.</i>	Putative uncharacterized protein
53	DH_2_E5	D1A2V8	<i>Thermomonospora curvata</i>	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase
54	DH_2_E6	D2PMV9	<i>Kribbella flavida</i>	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase
55	DH_2_E7	D3PZR7	<i>Stackebrandtia nassauensis</i>	Zinc-binding alcohol dehydrogenase
56	DH_2_E8	D9TCF1	<i>Micromonospora aurantiaca</i>	Putative uncharacterized protein
57	DH_2_E9	E6SAM9	<i>Intrasporangium calvum</i>	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase
58	DH_2_E10	F2RIU2	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Dihydrodipicolinate reductase
59	DH_2_E11	I0HAE5	<i>Actinoplanes missouriensis</i>	Uncharacterized protein
60	DH_2_E12	KOK231	<i>Saccharothrix espanaensis</i>	Uncharacterized protein
61	DH_2_F1	Q08SM6	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	Conserved uncharacterized protein
62	DH_2_F2	Q2S1R9	<i>Salinibacter ruber .</i>	Conserved oxidoreductase
63	DH_12_A1	A0A00914T1	<i>Acinetobacter baumannii 1295259</i>	Shikimate / quinate 5-dehydrogenase family protein
64	DH_12_A2	A0A068E7C9	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Ornithine cyclodeaminase
65	DH_12_A3	A0A0G9LEA1	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Dihydrodipicolinate reductase
66	DH_12_A4	A0AOH1RPV7	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Alanine dehydrogenase, ala
67	DH_12_A5	A0AOH21693	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ornithine cyclodeaminase

68	DH_12_A6	A0A0K2FUW4	Bacillus clausii	Deleted.
69	DH_12_A7	A0A0Q1BRH0	Staphylococcus haemolyticus	Deleted.
70	DH_12_A8	B6G0X9	Clostridium hiranonis	Ornithine cyclodeaminase
71	DH_12_A9	C2EJL7	Lactobacillus salivarius	Ornithine cyclodeaminase
72	DH_12_A10	C3BLM8	Bacillus pseudomycoides	Ornithine cyclodeaminase
73	DH_12_A11	C6A254	Thermococcus sibiricus	Alanine dehydrogenase
74	DH_12_A12	D3P8P8	Deferrribacter desulfuricans	Ornithine cyclodeaminase
75	DH_12_B1	D5T6S7	Legionella pneumophila serogroup 1	Deleted.
76	DH_12_B2	D5VS75	Methanocaldococcus infernus	Alanine dehydrogenase
77	DH_12_B3	D7E6K1	Methanohalobium evestigatum	Alanine dehydrogenase
78	DH_12_B4	E0SNY7	Ignisphaera aggregans	Alanine dehydrogenase
79	DH_12_B5	E0SRW7	Ignisphaera aggregans	Dihydrodipicolinate reductase
80	DH_12_B6	E2NVH2	Catenibacterium mitsuokai	Dihydrodipicolinate reductase domain protein
81	DH_12_B7	E3PS69	Clostridium sticklandii	Ornithine cyclodeaminase family protein
82	DH_12_B8	G4L788	Tetragenococcus halophilus	Putative ornithine cyclodeaminase
83	DH_12_B9	I0A1N3	Fervidicoccus fontis	Dihydrodipicolinate reductase
84	DH_12_B10	R8KQV2	Bacillus cereus	Uncharacterized protein
85	DH_12_B11	T2F5S7	Lactococcus lactis subsp.	Ornithine cyclodeaminase mu-crystallin-like protein
86	DH_12_B12	U2D1Z0	Clostridiales bacterium oral taxon 876	Dihydrodipicolinate reductase domain protein
87	DH_12_C1	U2EGL8	Clostridiales bacterium oral taxon 876 s	Uncharacterized protein
88	DH_12_C2	W7RS35	Bacillus licheniformis	Ornithine cyclodeaminase
89	DH_12_C3	A0A023CTA8	Geobacillus stearothermophilus	Ornithine cyclodeaminase
90	DH_12_C4	A0A095XI83	Clostridiales bacterium	Dihydrodipicolinate reductase
91	DH_12_C5	A0A095XYJ3	Clostridiales bacterium	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase
92	DH_12_C6	A0A095YU29	Clostridiales bacterium	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase
93	DH_12_C7	A0AOA5HZK0	Vibrio sinaloensis	Ornithine cyclodeaminase
94	DH_12_C8	A0A0B4XV44	Thalassospira xiamenensis	Ectoine utilization protein EutC
95	DH_12_C9	A0A0B4XVM1	Thalassospira xiamenensis	Ornithine cyclodeaminase
96	DH_12_C10	A0AAC5CKZ3	Bacillus coagulans	Ornithine cyclodeaminase/mu-crystallin
97	DH_12_C11	A0AO0DKJ88	Rhizobium radiobacter	Ornithine cyclodeaminase
98	DH_12_C12	A0A0E3SJU6	Methanosarcina barkeri 3	Alanine dehydrogenase
99	DH_12_D1	A0AOG9M4H3	Vibrio alginolyticus	Ornithine cyclodeaminase
100	DH_12_D2	A0AOAM1PHN3	Geobacillus stearothermophilus	Deleted.
101	DH_12_D3	A0AOAM2U443	Clostridiales bacterium PH28_bin88	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase
102	DH_12_D4	A0AOAM2U770	Clostridiales bacterium PH28_bin88	Uncharacterized protein
103	DH_12_D5	A0AOAM4K161	Streptococcus gordoni	Dihydrodipicolinate reductase
104	DH_12_D6	A0AOP1CGB4	Chthonomonas calidirosea	Deleted.
105	DH_12_D7	A0A0R1ZEZ3	Lactobacillus casei	Ornithine cyclodeaminase
106	DH_12_D8	A0B729	Methanosaeta thermophila	Alanine dehydrogenase
107	DH_12_D9	A0NQ11	Labrenzia aggregata	Ornithine cyclodeaminase
108	DH_12_D10	A1ZHM7	Microscilla marina	Ornithine cyclodeaminase/mu-crystallin family protein
109	DH_12_D11	A2BMP4	Hyperthermus butylicus	Universally conserved protein
110	DH_12_D12	A3QH73	Shewanella loihica	Ornithine cyclodeaminase
111	DH_12_E1	A4A9T0	Congregibacter litoralis	Putative ornithine cyclodeaminase
112	DH_12_E2	A6BGH5	Dorea longicatena	Putative ornithine cyclodeaminase
113	DH_12_E3	A6F2E2	Marinobacter algicola	Ornithine cyclodeaminase protein
114	DH_12_E4	A7VSZ0	Clostridium leptum	Dihydrodipicolinate reductase domain protein
115	DH_12_E5	A8FZ34	Shewanella sediminis	Ornithine cyclodeaminase
116	DH_12_E6	A8MDJ0	Caldivirga maquilingensis	Dihydrodipicolinate reductase
117	DH_12_E7	B1KDY4	Shewanella woodyi	Ornithine cyclodeaminase
118	DH_12_E8	B6XF54	Providencia alcalifaciens	Dihydrodipicolinate reductase domain protein
119	DH_12_E9	B8J4D1	Desulfovibrio desulfuricans	Dihydrodipicolinate reductase
120	DH_12_E10	B9JXZ2	Agrobacterium vitis	Ornithine cyclodeaminase
121	DH_12_E11	B9QUD6	Labrenzia alexandrii	Ornithine cyclodeaminase/mu-crystallin family
122	DH_12_E12	C0BXX0	Clostridium hylemonae	Putative ornithine cyclodeaminase
123	DH_12_F1	C0C1U3	Clostridium hylemonae	Ornithine cyclodeaminase
124	DH_12_F2	C7CZQ4	Enterococcus faecalis	Ornithine cyclodeaminase
125	DH_12_F3	D2RES0	Archaeoglobus profundus	Alanine dehydrogenase
126	DH_12_F4	D3AE01	Hungatella hathewayi	Dihydrodipicolinate reductase domain protein
127	DH_12_F5	D3S051	Ferroglobus placidus	Alanine dehydrogenase
128	DH_12_F6	D9S1G7	Thermosediminibacter oceanii	Ornithine cyclodeaminase
129	DH_12_F7	E1QRK4	Vulcanisaeta distributa	Dihydrodipicolinate reductase
130	DH_12_F8	E1QUL7	Vulcanisaeta distributa	Ornithine cyclodeaminase
131	DH_12_F9	E1R7U2	Spirochaeta smaragdinae	Dihydrodipicolinate reductase
132	DH_12_F10	E8MAC3	Vibrio sinaloensis	Ornithine cyclodeaminase
133	DH_12_F11	E8RLH0	Asticcacaulis eccentricus	Ornithine cyclodeaminase/mu-crystallin
134	DH_12_F12	F2KPW3	Archaeoglobus veneficus	Dihydrodipicolinate reductase
135	DH_12_G1	F2KSQ3	Archaeoglobus veneficus	Alanine dehydrogenase
136	DH_12_G2	F2NEM8	Desulfobacca acetoxidans	Putative alanine dehydrogenase
137	DH_12_G3	F4LTF2	Tepidanaerobacter acetatoxydans	Dihydrodipicolinate reductase
138	DH_12_G4	F6D7E2	Methanobacterium paludis	Alanine dehydrogenase
139	DH_12_G5	F7NKL3	Acetonema longum	Ornithine cyclodeaminase
140	DH_12_G6	F7XPJ1	Methanosalsum zhilinae	Alanine dehydrogenase
141	DH_12_G7	F8EM66	Ruella silthyformis	Ornithine cyclodeaminase
142	DH_12_G8	F9Z407	Odoribacter splanchnicus	Ornithine cyclodeaminase
143	DH_12_G9	GOEDT8	Pyrollobus fumarii	Alanine dehydrogenase
144	DH_12_G10	G7V7P9	Thermovirga lienii	Ornithine cyclodeaminase

145	DH_12_G11	I4D4X2	Desulfosporosinus acidiphilus	L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase
146	DH_12_G12	I4D4X6	Desulfosporosinus acidiphilus	Uncharacterized protein
147	DH_12_H1	I4X8G6	Planococcus antarcticus	Ornithine cyclodeaminase/mu-crystallin family protein
148	DH_12_H2	K4KJ06	Simiduia agarivorans	Ornithine cyclodeaminase
149	DH_12_H3	L0HJ77	Methanoregula formicata	Alanine dehydrogenase
150	DH_12_H4	O28608	Archaeoglobus fulgidus	Alanine dehydrogenase
151	DH_12_H5	O29621	Archaeoglobus fulgidus	Uncharacterized protein
152	DH_12_H6	Q12W11	Methanococcoides burtonii	Alanine dehydrogenase
153	DH_12_H7	Q2FM65	Methanospirillum hungatei	Alanine dehydrogenase
154	DH_12_H8	Q480R0	Colwellia psychrerythraea	Putative ornithine cyclodeaminase
155	DH_12_H9	Q81HB0	Bacillus cereus	Delta(1)-pyrroline-2-carboxylate reductase
156	DH_13_A1	Q8KU39	Enterococcus faecalis	EFO124
157	DH_13_A2	R2V735	Enterococcus gilvus	Uncharacterized protein
158	DH_13_A3	S0FWL5	Desulfotignum phosphitoxidans	Ornithine cyclodeaminase
159	DH_13_A4	S4CWM2	Enterococcus faecalis	Ornithine cyclodeaminase/mu-crystallin family protein
160	DH_13_A5	S9T6L6	Paenibacillus alvei	Dihydrodipicolinate reductase
161	DH_13_A6	U0F2Y9	Vibrio coralliilyticus	Ornithine cyclodeaminase
162	DH_13_A7	V4XGB8	Lactobacillus fermentum	Ornithine cyclodeaminase
163	DH_13_A8	V8BXB7	Ruminococcus gnavus	Uncharacterized protein
164	DH_13_A9	W8QUU8	Pseudomonas stutzeri	Ornithine cyclodeaminase
165	DH_13_A10	W9DMT5	Methanolobus tindarius	Alanine dehydrogenase
166	DH_13_A11	X7E7D6	Marinomonas ushuiensis	Ornithine cyclodeaminase
167	DH_13_A12	A0A024J2Z0	Rhizobium radiobacter	Putative ornithine cyclodeaminase, mu-crystallin
168	DH_13_B1	A0A051JT9	Mycobacterium tuberculosis	Uncharacterized protein
169	DH_13_B2	A0A076ETTO	Rhodococcus opacus	Diacylglycerol kinase
170	DH_13_B3	A0A084EP05	Sphingobium yanoikuyae	Dihydrodipicolinate reductase
171	DH_13_B4	A0A085VDE6	Pseudomonas syringae	Ornithine cyclodeaminase
172	DH_13_B5	A0A0D618P6	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Dihydrodipicolinate reductase
173	DH_13_B6	A0A0D61DF4	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Dihydrodipicolinate reductase
174	DH_13_B7	A0A0D9ASC5	Pseudomonas fluorescens	Ectoine utilization protein EutC
175	DH_13_B8	A0A0E3TU66	<i>Mycobacterium chelonae</i>	Dihydrodipicolinate reductase
176	DH_13_B9	A0A0E3XLCS	<i>Mycobacterium chelonae</i>	Dihydrodipicolinate reductase
177	DH_13_B10	A0AOFOFLW7	Burkholderiaceae bacterium 16	Ornithine cyclodeaminase
178	DH_13_B11	A0AOH2MZ88	Rhodococcus erythropolis	Deleted.
179	DH_13_B12	A0A0L6IE13	Achromobacter piechaudii	Ornithine cyclodeaminase
180	DH_13_C1	A0AON9J4C9	Arthrobacter arikaitensis	Ornithine cyclodeaminase
181	DH_13_C2	A0AOPOF860	Azospirillum brasiliense	Ornithine cyclodeaminase
182	DH_13_C3	A0AOOP9AJZ2	Variovorax paradoxus	Ornithine cyclodeaminase
183	DH_13_C4	A0AOAR2MIZ2	Olsenella uli	Deleted.
184	DH_13_C5	A1T9F6	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	Dihydrodipicolinate reductase
185	DH_13_C6	A1TF03	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	Dihydrodipicolinate reductase
186	DH_13_C7	A1WQJ5	Verminephrobacter eiseniae	Ornithine cyclodeaminase
187	DH_13_C8	A3CU87	Methanoculleus marisnigri	Alanine dehydrogenase
188	DH_13_C9	A3PMP9	Rhodobacter sphaeroides	Ornithine cyclodeaminase
189	DH_13_C10	A4TE93	<i>Mycobacterium gilvum</i>	Dihydrodipicolinate reductase
190	DH_13_C11	A6FOU0	Marinobacter algicola	Ornithine cyclodeaminase
191	DH_13_C12	A7NQU8	Roseiflexus castenholzii	Ornithine cyclodeaminase
192	DH_13_D1	A8I3D2	Azorhizobium caulinodans	Ornithine cyclodeaminase
193	DH_13_D2	B8G764	Chloroflexus aggregans	Ornithine cyclodeaminase
194	DH_13_D3	B9KZ81	Thermomicrobium roseum	Putative ornithine cyclodeaminase
195	DH_13_D4	D1BBJ9	Thermaanaerobacter acidaminovorans	Ornithine cyclodeaminase
196	DH_13_D5	D1C354	Sphaerotilus thermophilus	Ornithine cyclodeaminase
197	DH_13_D6	D1YVC7	Methanocella paludicola	Alanine dehydrogenase
198	DH_13_D7	D3R5W5	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Lactis</i>	Dihydrodipicolinate reductase
199	DH_13_D8	D3SR77	Natrialba magadii	Alanine dehydrogenase
200	DH_13_D9	E1SMS8	Ferrimonas balearica	Ornithine cyclodeaminase
201	DH_13_D10	E1V3T4	Halomonas elongata	Ornithine cyclodeaminase
202	DH_13_D11	E3CZE3	Aminomonas paucivorans	Dihydrodipicolinate reductase
203	DH_13_D12	FORPA0	Deinococcus protolyticus	Ornithine cyclodeaminase
204	DH_13_E1	F5XHU3	Microlunatus phosphovorus	Putative ornithine cyclodeaminase
205	DH_13_E2	H0UP43	Thermaanaerobacter velox	Putative ornithine cyclodeaminase, mu-crystallin
206	DH_13_E3	H6QZF3	Nocardia cyriacigeorgica	Uncharacterized protein
207	DH_13_E4	H6R368	Nocardia cyriacigeorgica	Putative dihydrodipicolinate reductase
208	DH_13_E5	H8I6G1	Methanocella conradii	Alanine dehydrogenase
209	DH_13_E6	H8IJ86	Mycobacterium intracellularare	Uncharacterized protein
210	DH_13_E7	H8IRA4	Mycobacterium intracellularare	Dihydrodipicolinate reductase
211	DH_13_E8	IOI150	Caldilinea aerophila	Ornithine cyclodeaminase/mu-crystallin family protein
212	DH_13_E9	J0CJ85	Rhizobium leguminosarum bv. Trifolii	Ectoine utilization protein EutC
213	DH_13_E10	J0RZB8	Methanofolliis liminatans	Alanine dehydrogenase
214	DH_13_E11	K0EWZ9	Nocardia brasiliensis	Ornithine cyclodeaminase
215	DH_13_E12	LOIQN6	Mycobacterium smegmatis	Putative dihydrodipicolinate reductase-like protein
216	DH_13_F1	L0J3B1	Mycobacterium smegmatis	Putative dihydrodipicolinate reductase-like protein
217	DH_13_F2	L7UC00	Myxococcus stipitatus	Dihydrodipicolinate reductase
218	DH_13_F3	L9XAM0	Natronococcus amylolyticus	Alanine dehydrogenase
219	DH_13_F4	M0MDT6	Halococcus morrhuae	Alanine dehydrogenase
220	DH_13_F5	Q2KE45	Rhizobium etli	Ornithine cyclodeaminase protein
221	DH_13_F6	S2KHD8	Halomonas anticariensis	Uncharacterized protein

222	DH_13_F7	S2LHD8	Halomonas anticariensis	Ornithine cyclodeaminase
223	DH_13_F8	S9Q235	<i>Cystobacter fuscus</i>	Uncharacterized protein
224	DH_13_F9	V4PKI5	Asticcacaulis benevestitus	Uncharacterized protein
225	DH_13_F10	W5WR74	Corynebacterium falserii	Ornithine cyclodeaminase
226	DH_13_F11	W8QXP6	Pseudomonas stutzeri	Ornithine cyclodeaminase
227	DH_13_F12	A0A058YWB9	Bordetella bronchiseptica	Shikimate/quinate 5-dehydrogenase
228	DH_13_G1	A0A060DNM1	Azospirillum brasiliense	Uncharacterized protein
229	DH_13_G2	A0A063UC68	Bordetella bronchiseptica	Ornithine cyclodeaminase
230	DH_13_G3	A0A0C6F7I2	Pseudomonas aeruginosa	Deleted.
231	DH_13_G4	A0A0H5NKP8	Nocardia farcinica	Dihydrodipicolinate reductase
232	DH_13_G5	A0A0L8LD12	Streptomyces viridochromogenes	Ornithine cyclodeaminase
233	DH_13_G6	A0A0P9ATE3	Variovorax paradoxus	Ornithine cyclodeaminase
234	DH_13_G7	A7IL42	Xanthobacter autotrophicus	Ornithine cyclodeaminase/mu-crystallin
235	DH_13_G8	B1VRH1	Streptomyces griseus subsp. griseus	Putative ornithine cyclodeaminase
236	DH_13_G9	B2GGT5	Kocuria rhizophila	Ornithine cyclodeaminase/mu-crystallin family protein
237	DH_13_G10	B8JAK0	Anaeromyxobacter dehalogenans	Dihydrodipicolinate reductase
238	DH_13_G11	D1ACE7	Thermomonospora curvata	Dihydrodipicolinate reductase
239	DH_13_G12	D2AYX7	Streptosporangium roseum	Dihydrodipicolinate reductase
240	DH_13_H1	D3F894	Conexibacter woesei	Oxidoreductase domain protein
241	DH_13_H2	E3CYH8	Aminomonas paucivorans	Ornithine cyclodeaminase
242	DH_13_H3	E4U8R1	Oceanithermus profundus	Ornithine cyclodeaminase
243	DH_13_H4	H8MPZ5	Corallococcus coralloides	Putative alanine dehydrogenase
244	DH_13_H5	K6QCH2	Thermaerobacter subterraneus 5	Putative ornithine cyclodeaminase, mu-crystallin
245	DH_13_H6	L8MKJ4	Pseudomonas pseudoalcaligenes	Ornithine cyclodeaminase
246	DH_13_H7	W5WGR5	Kutzneria albida	Uncharacterized protein
247	DH_14_A1	A0A0D1H7B3	Staphylococcus aureus subsp. aureus	Octopine dehydrogenase
248	DH_14_A2	A0A0H2VJ15	Staphylococcus epidermidis	D-octopine dehydrogenase
249	DH_14_A3	A0A0Q1GEK1		Deleted.
250	DH_14_A4	A6L947	Parabacteroides distasonis	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
251	DH_14_A5	A6LJ59	<i>Thermosiphon melanesiensis</i>	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
252	DH_14_A6	A9BJW3	Petrotoga mobilis	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
253	DH_14_A7	C9LAR0	Blautia hansenii	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase,
254	DH_14_A8	D5EFN9	Aminobacterium colombiense	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
255	DH_14_A9	D9TQS3	Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
256	DH_14_A10	E6LD40	Enterococcus italicus	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase,
257	DH_14_A11	I4BY52	Anaerobaculum mobile	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
258	DH_14_A12	Q49ZM0	Staphylococcus saprophyticus	Uncharacterized protein
259	DH_14_B1	A0A009KV17	Acinetobacter baumannii	glycerol-3-phosphate dehydrogenase
260	DH_14_B2	A0AOE2GKL6	Acinetobacter radioresistens	Uncharacterized protein
261	DH_14_B3	A0AF4THZ1	Pseudomonas fluorescens	Uncharacterized protein
262	DH_14_B4	A1A2W0	Bifidobacterium adolescentis	Uncharacterized protein
263	DH_14_B5	A4G233	Herminiimonas arsenicoxydans	2-dehydropantoate 2-reductase
264	DH_14_B6	A8F5N2	Pseudothermotoga lettingae	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
265	DH_14_B7	A8FR09	Shewanella sediminis	Uncharacterized protein
266	DH_14_B8*	A9CL08	<i>Agrobacterium fabrum</i>	D-nopaline dehydrogenase
267	DH_14_B9	B0PA59	Anaerotruncus colihominis	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
268	DH_14_B10	BOPH60	Anaerotruncus colihominis	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
269	DH_14_B11	B2UMLO	Akkermansia muciniphila	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
270	DH_14_B12	B3E5C1	Geobacter lovleyi	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
271	DH_14_C1	B8CWRI	Halothermothrix orenii	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
272	DH_14_C2	B9K3Z5	Agrobacterium vitis	D-nopaline dehydrogenase
273	DH_14_C3	COC1C8	Clostridium hylemoniae	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
274	DH_14_C4	COD912	Clostridium asparagiforme	glycerol-3-phosphate dehydrogenase
275	DH_14_C5	COWYP9	<i>Lactobacillus fermentum</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase
276	DH_14_C6	C5CGN8	Kosmotoga olearia	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
277	DH_14_C7	C5T7Q9	Acidovorax delafieldii 2AN	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
278	DH_14_C8	C7T9S9	Lactobacillus rhamnosus	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
279	DH_14_C9	C8WZA2	Desulfovibrio retbaense	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
280	DH_14_C10	C9LPET7	Dialister invisus	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
281	DH_14_C11	D5EH84	Aminobacterium colombiense	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
282	DH_14_C12	D9QPL4	Acetobacterium arabaticum	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
283	DH_14_D1	D9S089	Thermosediminibacter oceanii	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
284	DH_14_D2	E6UFA6	Ruminococcus albus	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
285	DH_14_D3	F4A2G3	Mahella australiensis	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
286	DH_14_D4	F4LU38	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>	Opine dehydrogenase
287	DH_14_D5	F7YTY0	Pseudothermotoga thermarum	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
288	DH_14_D6	G0VN9	Megasphaera elsdenii	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
289	DH_14_D7	G7V7B3	Thermovirga lienii	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
290	DH_14_D8	G7V8A2	Thermovirga lienii	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
291	DH_14_D9	G7W8I3	Desulfosporosinus orientis	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
292	DH_14_D10	H0RRX7	Bradyrhizobium	Putative NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
293	DH_14_D11	H6LG64	Acetobacterium woodii	Opine dehydrogenase Odh
294	DH_14_D12	H9UBG7	Fervidobacterium pennivorans	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
295	DH_14_E1	O26350	Methanothermobacter thermautotrophicus	F420-dependent NADP reductase
296	DH_14_E2	O88164	Rhizobium radiobacter	Putative opine synthase
297	DH_14_E3	Q04554	Agrobacterium vitis	Vitopine synthase
298	DH_14_E4	Q05139	Rhizobium radiobacter	40 kDa protein

299	DH_14_E5	Q2K2H6	Rhizobium etli	D-lysopine dehydrogenase/D-octopine dehydrogenase protein
300	DH_14_E6*	Q88ELO	Pseudomonas putida	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase family protein
301	DH_14_E7	Q8RB99	<i>Caldanaerobacter subterraneus</i>	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
302	DH_14_E8	Q9R692	Rhizobium radiobacter	Tiorf189 protein
303	DH_14_E9	A0A037XTI6	Rhizobium radiobacter	Deleted.
304	DH_14_E10	A0A0A3XJV5	Bradyrhizobium japonicum	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
305	DH_14_E11	A0A0D0LK23		Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
306	DH_14_E12	A0A0L616C3	Achromobacter piechautii	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
307	DH_14_F1	A0A0M9B7Y2	Bradyrhizobium japonicum	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
308	DH_14_F2	A1HPU2	<i>Thermosinus carboxydivorans</i> Nor1	2-dehydropantoate 2-reductase
309	DH_14_F3	A1WI24	<i>Verminephrobacter eiseniae</i>	Opine dehydrogenase
310	DH_14_F4	A1WI65	<i>Verminephrobacter eiseniae</i>	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
311	DH_14_F5	A4YQHO	Bradyrhizobium sp.	Putative opine dehydrogenase
312	DH_14_F6	A4Z2I3	Bradyrhizobium sp.	Tartronate semialdehyde reductase
313	DH_14_F7	A5V487	<i>Sphingomonas wittichii</i>	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
314	DH_14_F8	A7NLM7	<i>Roseiflexus castenholzii</i>	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
315	DH_14_F9	A9CL83	<i>Agrobacterium fabrum</i>	Opine/octopine dehydrogenase
316	DH_14_F10	B3QB54	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	2-dehydropantoate 2-reductase
317	DH_14_F11	E6VDT3	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	2-dehydropantoate 2-reductase
318	DH_14_F12	E8MYZ6	<i>Anaerolinea thermophila</i>	Putative opine dehydrogenase
319	DH_14_G1	F7ZI64	<i>Roseobacter litoralis</i>	Coenzyme 420-dependent octopine/nopaline dehydrogenase
320	DH_14_G2	H0S087	Bradyrhizobium sp.	Putative opine dehydrogenase
321	DH_14_G3	I0I7A9	<i>Caldilinea aerophila</i>	Putative opine dehydrogenase
322	DH_14_G4	Q5LTE8	<i>Ruegeria pomeroyi</i>	Opine dehydrogenase, putative
323	DH_14_G5	S9P8J0	<i>Cystobacter fuscus</i>	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
324	DH_14_G6	WOWXD8	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Deleted.
325	DH_14_G7	A0A034UIZO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	Putative opine dehydrogenase
326	DH_14_G8	A0A0D0M578	<i>Variovorax paradoxus</i>	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
327	DH_14_G9	A0A0H5NLQ3	<i>Nocardia farcinica</i>	Opine dehydrogenase
328	DH_14_G10	A4FJ06	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
329	DH_14_G11	B1YZY0	<i>Burkholderia ambifaria</i>	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
330	DH_14_G12	C5C421	<i>Beutenbergia cavernae</i>	Opine dehydrogenase
331	DH_14_H1	C5CJ83	<i>Variovorax paradoxus</i>	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
332	DH_14_H2	H8MTV7	<i>Corallococcus coralloides</i>	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase family protein
333	DH_14_H3	K6PLK0	<i>Thermaerobacter subterraneus</i>	Ketopantoate reductase
334	DH_14_H4	Q2T8G2	<i>Burkholderia thailandensis</i>	Uncharacterized protein
335	DH_14_H5	S9Q5M4	<i>Salipiger mucosus</i>	D-octopine dehydrogenase
336	DH_str_A1	I6ZQW6	ElxO	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
337	DH_str_A2	Q96YK6	Isocitrate dehydrogenase	
338	DH_str_A3	A0A0H3JLH9	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase	<i>Staphylococcus aureus</i>
339	DH_str_A4	Q0PBZ1	Thioredoxin reductase	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> serotype O:2
340	DH_str_A5	Q8EY89	Ferrodoxin-NADP reductase	<i>Leptospira interrogans</i>
341	DH_str_A6	Q5E8L1	UDP-N-acetylglucosamine 4,6-dehydratase	<i>Vibrio fischeri</i>
342	DH_str_A7	Q93L51	TetX family tetracycline inactivation enzyme	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
343	DH_str_A8	Q833L5	Oxidoreductase	<i>Enterococcus faecalis</i>
344	DH_str_A9	Q4JA33	Conserved Archaeal protein	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
345	DH_str_A10	Q816V9	NAD(FAD)-utilizing dehydrogenases	<i>Bacillus cereus</i>
346	DH_str_A11	Q8U1K9	NADH oxidase /nitrite reductase	<i>Pyrococcus furiosus</i>
347	DH_str_A12	Q929L3	Lin2262 protein	<i>Listeria innocua</i> serovar 6a
348	DH_str_B1	Q97XZ3	Dihydrolipoamide dehydrogenase (PdhD-3)	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
349	DH_str_B2	A0A0H2UR04	Oxidoreductase, Gfo/Idh/MocA family	<i>Streptococcus pneumoniae</i> serotype 4
350	DH_str_B3	A3DC45	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	<i>Clostridium thermocellum</i>
351	DH_str_B4	O58802	homoserine dehydrogenase	<i>Pyrococcus horikoshii</i>
352	DH_str_B5	Q9X0A2	Oxidoreductase, aldo/keto reductase family	<i>Thermotoga maritima</i>
353	DH_str_B6	Q46E80	Uncharacterized protein	<i>Methanoscarcina barkeri</i>
354	DH_str_B7	O58151	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	<i>Pyrococcus horikoshii</i>
355	DH_str_B8	M5B0V2	NADH oxidase	<i>Lactobacillus brevis</i> KB290
356	DH_str_B9	Q9HIZ7	Homoserine dehydrogenase related protein	<i>Thermoplasma acidophilum</i>
357	DH_str_B10	Q9HJ4	Probable thioredoxin reductase	<i>Thermoplasma acidophilum</i>
358	DH_str_B11	Q9WYE8	Uncharacterized protein	<i>Thermotoga maritima</i>
359	DH_str_B12	Q87R42	Uncharacterized protein	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotype
360	DH_str_C1	Q6AQ66	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	<i>Desulfotalea psychrophila</i>
361	DH_str_C2	S6C8IO	Inositol dehydrogenase	<i>Lactobacillus casei</i>
362	DH_str_C3	Q9X1D6	Inositol-1-phosphate synthase	<i>Thermotoga maritima</i>
363	DH_str_C4	Q9WZ12	Malate oxidoreductase	<i>Thermotoga maritima</i>
364	DH_str_C5	B1YKJ9	Protoporphyrinogen oxidase	<i>Exiguobacterium sibiricum</i>
365	DH_str_C6	O28480	Myo-inositol-1-phosphate synthase	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
366	DH_str_C7	C6A190	Short-chain alcohol dehydrogenase	<i>Thermococcus sibiricus</i>
367	DH_str_C8	O29327	Homoserine dehydrogenase	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
368	DH_str_C9	O28603	Adenylylsulfate reductase, subunit A	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
369	DH_str_C10	C3UMY1	Dihydripicolinate reductase	<i>Microbacterium</i> sp. MA1
370	DH_str_C11	A0A174CKL7	Uncharacterized conserved protein	<i>Flavonifractor plautii</i>
371	DH_str_C12	Q88H32	Putative ornithine cyclodeaminase	<i>Pseudomonas putida</i>
372	DH_str_D1	I6YEC9	Alanine dehydrogenase	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
373	DH_str_D2	Q9RSY7	Thioredoxin reductase	<i>Deinococcus radiodurans</i>
374	DH_str_D3	Q92NR7	Putative oxidoreductase	<i>Rhizobium meliloti</i>
375	DH_str_D4	KOUKT5	Dihydripicolinate reductase	<i>Mycobacterium vaccae</i>

376	DH_str_D5	Q9RA02	3-ketosteroid dehydrogenase	Rhodococcus erythropolis
377	DH_str_D6	Q92RY0	Uncharacterized protein	<i>Rhizobium meliloti</i>
378	DH_str_D7	B1P3E1	Diketoreductase	<i>Acinetobacter baylyi</i>
379	DH_str_D8	A0AOE3VYE5	NADH-dependent quinuclidinone reductase	<i>Rhizobium radiobacter</i>
380	DH_str_D9	Q72GS0	NAD(P) transhydrogenase subunit beta	<i>Thermus thermophilus</i>
381	DH_str_D10	Q9HTD9	Alcohol dehydrogenase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
382	DH_str_D11	Q72IC1	Glutamate dehydrogenase	<i>Thermus thermophilus</i>
383	DH_str_D12	I6Y120	Probable shikimate 5-dehydrogenase AroE	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
384	DH_str_E1	A4JGH3	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>
385	DH_str_E2	L8EUQ6	Polyketide oxygenase/hydroxylase	<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i>
386	DH_str_E3	Q194P4	Oxygenase	<i>Streptomyces argillaceus</i>

Références bibliographiques

1. Abrahamson M. J., Bommarius A. S., Vázquez-Figueroa E., Woodall N. B., and Moore J. C., (2012), Development of an Amine Dehydrogenase for Synthesis of Chiral Amines. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**(16), 3969–3972.
2. Abrahamson M. J., Bommarius A. S., and Wong J. W., (2013), The Evolution of an Amine Dehydrogenase Biocatalyst for the Asymmetric Production of Chiral Amines. *Adv. Synth. Catal.*, **355**(9), 1780–1786.
3. Adolfsson H., (2005), Organocatalytic Hydride Transfers: A New Concept in Asymmetric Hydrogenations. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**(22), 3340–3342.
4. Aghaie A., Lechaplain C., Sirven P., Tricot S., Besnard-Gonnet M., Muselet D., et al., (2008), New Insights into the Alternative d-Glucarate Degradation Pathway. *J. Biol. Chem.*, **283**(23), 15638–15646.
5. Ahmed M., Kelly T., and Ghanem A., (2012), Applications of enzymatic and non-enzymatic methods to access enantiomerically pure compounds using kinetic resolution and racemisation. *Tetrahedron*, **68**(34), 6781–6802.
6. Ahmed S. T., Parmeggiani F., Weise N. J., Flitsch S. L., and Turner N. J., (2018), Engineered Ammonia Lyases for the Production of Challenging Electron-Rich l-Phenylalanines. *ACS Catal.*
7. Aleku G. A., France S. P., Man H., Mangas-Sánchez J., Montgomery S. L., Sharma M., et al., (2017), A reductive aminase from *Aspergillus oryzae*. *Nat. Chem.*, **9**(10), 961–969.
8. Aleku G. A., Mangas-Sánchez J., Citoler J., France S. P., Montgomery S. L., Heath R. S., et al., (2018), Kinetic Resolution and Deracemization of Racemic Amines Using a Reductive Aminase. *ChemCatChem*, **10**(3), 515–519.
9. Alexeeva M., Enright A., Dawson M. J., Mahmoudian M., and Turner N. J., (2002), Deracemization of α -Methylbenzylamine Using an Enzyme Obtained by In Vitro Evolution. *Angew. Chem.*, **114**(17), 3309–3312.
10. Alivisatos S. G. A., Ungar F., and Abraham G. J., (1965), Spontaneous Reactions of 1,3-Substituted 1,4-Dihydropyridines with Acids in Water at Neutrality. I. Kinetic Analysis and Mechanism of the Reactions of Dihydronicotinamide-Adenine Dinucleotide with Orthophosphates*. *Biochemistry*, **4**(12), 2616–2630.
11. Anastas P. and Eghbali N., (2010), Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.*, **39**(1), 301–312.
12. Anderson M., (2017), Amine Transaminases in Multi-Step One-Pot Reactions. *DIVA*.
13. Asano Y., Yamaguchi K., and Kondo K., (1989), A new NAD⁺-dependent opine dehydrogenase from Arthrobacter sp. strain 1C. *J. Bacteriol.*, **171**(8), 4466–4471.
14. Au S. K., Bommarius B. R., and Bommarius A. S., (2014), Biphasic Reaction System Allows for Conversion of Hydrophobic Substrates by Amine Dehydrogenases. *ACS Catal.*, **4**(11), 4021–4026.
15. Baker P. J., Turnbull A. P., Sedelnikova S. E., Stillman T. J., and Rice D. W., (1995), A role for quaternary structure in the substrate specificity of leucine dehydrogenase. *Struct. Lond. Engl. 1993*, **3**(7), 693–705.
16. Bar-Even A., Noor E., Savir Y., Liebermeister W., Davidi D., Tawfik D. S., and Milo R., (2011), The Moderately Efficient Enzyme: Evolutionary and Physicochemical Trends Shaping Enzyme Parameters. *Biochemistry*, **50**(21), 4402–4410.
17. Bea H.-S., Park H.-J., Lee S.-H., and Yun H., (2011), Kinetic resolution of aromatic β -amino acids by ω -transaminase. *Chem. Commun.*, **47**(20), 5894–5896.
18. Behrens G. A., Hummel A., Padhi S. K., Schätzle S., and Bornscheuer U. T., (2011), Discovery and Protein Engineering of Biocatalysts for Organic Synthesis. *Adv. Synth. Catal.*, **353**(13), 2191–2215.
19. Böhmer W., Knaus T., and Mutti F. G., (2018), Hydrogen-Borrowing Alcohol Bioamination with Coimmobilized Dehydrogenases. *ChemCatChem*, **10**(4), 731–735.
20. Bommarius A. S., (2005), Introduction to Biocatalysis. in *Biocatalysis*. Wiley-Blackwell, pp. 1–18.
21. Bommarius B. R., Schürmann M., and Bommarius A. S., (2014), A novel chimeric amine dehydrogenase shows altered substrate specificity compared to its parent enzymes. *Chem Commun*, **50**(95), 14953–14955.

22. Bornscheuer U. T., (2016), Biocatalysis: Successfully Crossing Boundaries. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**(14), 4372–4373.
23. Bornscheuer U. T. and Höhne M., (2009), Biocatalytic Routes to Optically Active Amines. *ChemCatChem*, **1**(1), 42–51.
24. Breuer M., Ditrich K., Habicher T., Hauer B., Keßeler M., Stürmer R., and Zelinski T., (2004), Industrial Methods for the Production of Optically Active Intermediates. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**(7), 788–824.
25. Brown H. C., Kim K. W., Cole T. E., and Singaram B., (1986), Chiral synthesis via organoboranes. 8. Synthetic utility of boronic esters of essentially 100% optical purity. Synthesis of primary amines of very high enantiomeric purities. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**(21), 6761–6764.
26. Brunhuber N. M. W., Thoden J. B., Blanchard J. S., and Vanhooke J. L., (2000), Rhodococcus L-Phenylalanine Dehydrogenase: Kinetics, Mechanism, and Structural Basis for Catalytic Specificity. *Biochemistry*, **39**(31), 9174–9187.
27. Buß O., Buchholz P. C. F., Gräff M., Klausmann P., Rudat J., and Pleiss J., (2018), The ω -transaminase engineering database (oTAED): A navigation tool in protein sequence and structure space. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, **86**(5), 566–580.
28. Cainelli G., Engel P. C., Galletti P., Giacomini D., Gualandi A., and Paradisi F., (2005), Engineered phenylalanine dehydrogenase in organic solvents: homogeneous and biphasic enzymatic reactions. *Org. Biomol. Chem.*, **3**(24), 4316–4320.
29. Calvelage S., Dörr M., Höhne M., and Bornscheuer U. T., (2017), A Systematic Analysis of the Substrate Scope of (S)- and (R)-Selective Amine Transaminases. *Adv. Synth. Catal.*, **359**(23), 4235–4243.
30. Chen F.-F., Liu Y.-Y., Zheng G.-W., and Xu J.-H., (2015), Asymmetric Amination of Secondary Alcohols by using a Redox-Neutral Two-Enzyme Cascade. *ChemCatChem*, **7**(23), 3838–3841.
31. Chen F.-F., Zheng G.-W., Liu L., Li H., Chen Q., Li F.-L., et al., (2018), Reshaping the Active Pocket of Amine Dehydrogenases for Asymmetric Synthesis of Bulky Aliphatic Amines. *ACS Catal.*, 2622–2628.
32. Chen H., Collier S. J., Nazor J., SUKUMARAN J., Smith D., Moore J. C., et al., (2015), Engineered imine reductases and methods for the reductive amination of ketone and amine compounds.
33. Chenault H. K. and Whitesides G. M., (1987), Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **14**(2), 147–197.
34. Christianson C. V., Montavon T. J., Festin G. M., Cooke H. A., Shen B., and Bruner S. D., (2007), The Mechanism of MIO-Based Aminomutases in β -Amino Acid Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**(51), 15744–15745.
35. Claver C. and Fernández E., (2008), Imine Hydrogenation. in *Modern Reduction Methods*. Wiley-Blackwell, pp. 235–269.
36. Clayden, Greeves, and Warren, (2013), Chimie organique, 2nd ed. de boeck.
37. Clouthier C. M. and Pelletier J. N., (2012), Expanding the organic toolbox: a guide to integrating biocatalysis in synthesis. *Chem. Soc. Rev.*, **41**(4), 1585–1605.
38. Colyer J. T., Andersen N. G., Tedrow J. S., Soukup T. S., and Faul M. M., (2006), Reversal of Diastereofacial Selectivity in Hydride Reductions of N-tert-Butanesulfinyl Imines. *J. Org. Chem.*, **71**(18), 6859–6862.
39. Constable D. J. C., Dunn P. J., Hayler J. D., Humphrey G. R., Johnnie L. Leazer J., Linderman R. J., et al., (2007), Key green chemistry research areas—a perspective from pharmaceutical manufacturers. *Green Chem.*, **9**(5), 411–420.
40. Cosgrove S. C., Brzezniak A., France S. P., Ramsden J. I., Mangas-Sánchez J., Montgomery S. L., et al., (2018), Imine Reductases, Reductive Aminases, and Amine Oxidases for the Synthesis of Chiral Amines: Discovery, Characterization, and Synthetic Applications. in *Enzymology* B.-M. in (ed.), Academic Press.
41. Cosgrove Sebastian C., Hussain S., Turner N. J., and Marsden S. P., (2018), Synergistic Chemo/Biocatalytic Synthesis of Alkaloidal Tetrahydroquinolines. *ACS Catal.*, 5570–5573.
42. Cox B. M., Bilsborrow J. B., and Walker K. D., (2009), Enhanced Conversion of Racemic α -Arylalanines to (R)- β -Arylalanines by Coupled Racemase/Aminomutase Catalysis. *J. Org. Chem.*, **74**(18), 6953–6959.

43. D. Patil M., Grogan G., Bommarius A., and Yun H., (2018), Recent Advances in ω -Transaminase-Mediated Biocatalysis for the Enantioselective Synthesis of Chiral Amines. *Catalysts*, **8**(7), 254.
44. Datta S., Mori Y., Takagi K., Kawaguchi K., Chen Z.-W., Okajima T., et al., (2001), Structure of a quinohemoprotein amine dehydrogenase with an uncommon redox cofactor and highly unusual crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**(25), 14268–14273.
45. Davids T., Schmidt M., Böttcher D., and Bornscheuer U. T., (2013), Strategies for the discovery and engineering of enzymes for biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **17**(2), 215–220.
46. De Montigny P., Stobaugh J. F., Givens R. S., Carlson R. G., Srinivasachar K., Sternson L. A., and Higuchi T., (1987), Naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde/cyanide ion: a rationally designed fluorogenic reagent for primary amines. *Anal. Chem.*, **59**(8), 1096–1101.
47. de Lange B., Hyett D. J., Maas P. J. D., Mink D., van Assema F. B. J., Sereinig N., et al., (2011), Asymmetric Synthesis of (S)-2-Indolinecarboxylic Acid by Combining Biocatalysis and Homogeneous Catalysis. *ChemCatChem*, **3**(2), 289–292.
48. Deslauriers M. G., (2017), Considerations for implementation of novel enzyme-based processes.
49. de Souza R. O. M. A., Miranda L. S. M., and Bornscheuer U. T., (2017), A Retrosynthesis Approach for Biocatalysis in Organic Synthesis. *Chem. – Eur. J.*, **23**, 1–25.
50. Donnelly A. E., Murphy G. S., Digianantonio K. M., and Hecht M. H., (2018), A *de novo* enzyme catalyzes a life-sustaining reaction in *Escherichia coli*. *Nat. Chem. Biol.*, **14**(3), 253–255.
51. Dostert P. L., Benedetti M. S., and Tipton K. F., (1989), Interactions of monoamine oxidase with substrates and inhibitors. *Med. Res. Rev.*, **9**(1), 45–89.
52. Dwivedee B. P., Soni S., Sharma M., Bhaumik J., Laha J. K., and Banerjee U. C., (2018), Promiscuity of Lipase-Catalyzed Reactions for Organic Synthesis: A Recent Update. *ChemistrySelect*, **3**(9), 2441–2466.
53. Edmondson D. E., Mattevi A., Binda C., Li M., and Hubálek F., (2005), Structure and Mechanism of Monoamine Oxidase. in *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. American Cancer Society.
54. Eng W. W. H., Gan H. M., Gan H. Y., Hudson A. O., and Savka M. A., (2015), Whole-Genome Sequence and Annotation of Octopine-Utilizing *Pseudomonas kilonensis* (Previously *P. fluorescens*) Strain 1855-344. *Genome Announc.*, **3**(3), e00463-15.
55. Engelmark Cassimjee K., Manta B., and Himo F., (2015), A quantum chemical study of the ω -transaminase reaction mechanism. *Org. Biomol. Chem.*, **13**(31), 8453–8464.
56. Eriksson T., Björkman S., Roth B., Fyge Å., and Höglund P., (1995), Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. *Chirality*, **7**(1), 44–52.
57. Fademrecht S., Scheller P. N., Nestl B. M., Hauer B., and Pleiss J., (2016), Identification of imine reductase-specific sequence motifs. *Proteins*, **84**(5), 600–610.
58. Finn R. D., Attwood T. K., Babbitt P. C., Bateman A., Bork P., Bridge A. J., et al., (2017), InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Res.*, **45**(D1), D190–D199.
59. Fogassy E., Nógrádi M., Kozma D., Egri G., Pállovics E., and Kiss V., (2006), Optical resolution methods. *Org. Biomol. Chem.*, **4**(16), 3011–3030.
60. Fonknechten N., Chaussenonnerie S., Tricot S., Lajus A., Andreesen J. R., Perchat N., et al., (2010), *Clostridium sticklandii*, a specialist in amino acid degradation:revisiting its metabolism through its genome sequence. *BMC Genomics*, **11**, 555.
61. Fonknechten N., Perret A., Perchat N., Tricot S., Lechaplain C., Vallenet D., et al., (2009), A Conserved Gene Cluster Rules Anaerobic Oxidative Degradation of 1-Ornithine. *J. Bacteriol.*, **191**(9), 3162–3167.
62. Fraaije M. W., Wu J., Heuts D. P. H. M., Hellemond E. W. van, Spelberg J. H. L., and Janssen D. B., (2005), Discovery of a thermostable Baeyer–Villiger monooxygenase by genome mining. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**(4), 393–400.
63. France S. P., Howard R. M., Steflík J., Weise N. J., Mangas-Sánchez J., Montgomery S. L., et al., (2018), Identification of Novel Bacterial Members of the Imine Reductase Enzyme Family that Perform Reductive Amination. *ChemCatChem*, **10**(3), 510–514.
64. Frey P. A. and Ruzicka F. J., (2008), Method for producing L- β -lysine.

65. Fuchs M., Farnberger J. E., and Kroutil W., (2015), The Industrial Age of Biocatalytic Transamination. *Eur. J. Org. Chem.*, **2015**(32), 6965–6982.
66. Furnham N., Holliday G. L., Beer D., P T. A., Jacobsen J. O. B., Pearson W. R., and Thornton J. M., (2014), The Catalytic Site Atlas 2.0: cataloging catalytic sites and residues identified in enzymes. *Nucleic Acids Res.*, **42**(D1), D485–D489.
67. Gallagher D. T., Monbouquette H. G., Schröder I., Robinson H., Holden M. J., and Smith N. N., (2004), Structure of Alanine Dehydrogenase from Archaeoglobus: Active Site Analysis and Relation to Bacterial Cyclodeaminases and Mammalian mu Crystallin. *J. Mol. Biol.*, **342**(1), 119–130.
68. Ghislieri D., Green A. P., Pontini M., Willies S. C., Rowles I., Frank A., et al., (2013), Engineering an Enantioselective Amine Oxidase for the Synthesis of Pharmaceutical Building Blocks and Alkaloid Natural Products. *J. Am. Chem. Soc.*, **135**(29), 10863–10869.
69. Ghislieri D. and Turner N. J., (2014), Biocatalytic Approaches to the Synthesis of Enantiomerically Pure Chiral Amines. *Top. Catal.*, **57**(5), 284–300.
70. Girdlestone C. and Hayward S., (2015), The DynDom3D Webserver for the Analysis of Domain Movements in Multimeric Proteins. *J. Comput. Biol.*, **23**(1), 21–26.
71. Godoy Alcántar C., Yatsimirsky A. K., and Lehn J.-M., (2005), Structure-stability correlations for imine formation in aqueous solution. *J. Phys. Org. Chem.*, **18**(10), 979–985.
72. Gomm A. and O'Reilly E., (2018), Transaminases for chiral amine synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **43**, 106–112.
73. Gotor Fernández V., Bustos E., and Gotor V., (2006), Candida antarctica Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. *Adv. Synth. Catal.*, **348**(7–8), 797–812.
74. Grogan G., (2018), Synthesis of chiral amines using redox biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **43**, 15–22.
75. Grogan G. and Turner N. J., (2016), InspIRED by Nature: NADPH-Dependent Imine Reductases (IREDs) as Catalysts for the Preparation of Chiral Amines. *Chem. - Eur. J.*, **22**(6), 1900–1907.
76. Guérard Hélaine C., de Berardinis V., Besnard-Gonnet M., Darii E., Debäcker M., Debard A., et al., (2015), Genome Mining for Innovative Biocatalysts: New Dihydroxyacetone Aldolases for the Chemist's Toolbox. *ChemCatChem*, **7**(12), 1871–1879.
77. Gundersen M. T., Abu R., Schürmann M., and Woodley J. M., (2015), Amine donor and acceptor influence on the thermodynamics of ω -transaminase reactions. *Tetrahedron Asymmetry*, **26**(10), 567–570.
78. Guo X., Okamoto Y., R. Schreier M., R. Ward T., and S. Wenger O., (2018), Enantioselective synthesis of amines by combining photoredox and enzymatic catalysis in a cyclic reaction network. *Chem. Sci.*
79. Hanson R. L., Davis B. L., Chen Y., Goldberg S. L., Parker W. L., Tully T. P., et al., (2008), Preparation of (R)-Amines from Racemic Amines with an (S)-Amine Transaminase from *Bacillus megaterium*. *Adv. Synth. Catal.*, **350**(9), 1367–1375.
80. Heberling M. M., Wu B., Bartsch S., and Janssen D. B., (2013), Priming ammonia lyases and aminomutases for industrial and therapeutic applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **17**(2), 250–260.
81. Hernandez K., Berenguer-Murcia A., C. Rodrigues R., and Fernandez-Lafuente R., (2012), Hydrogen Peroxide in Biocatalysis. A Dangerous Liaison. *Curr. Org. Chem.*, **16**(22).
82. Hoben C. E., Kanupp L., and Bäckvall J.-E., (2008), Practical chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of primary amines via transfer of a readily removable benzyloxycarbonyl group. *Tetrahedron Lett.*, **49**(6), 977–979.
83. Höhne M., Kühl S., Robins K., and Bornscheuer U. T., (2008), Efficient Asymmetric Synthesis of Chiral Amines by Combining Transaminase and Pyruvate Decarboxylase. *ChemBioChem*, **9**(3), 363–365.
84. Holm L. and Laakso L. M., (2016), Dali server update. *Nucleic Acids Res.*, **44**(W1), W351–W355.
85. Hopmann K. H. and Bayer A., (2014), Enantioselective imine hydrogenation with iridium-catalysts: Reactions, mechanisms and stereocontrol. *Coord. Chem. Rev.*, **268**, 59–82.
86. Hou G., Gosselin F., Li W., McWilliams J. C., Sun Y., Weisel M., et al., (2009), Enantioselective Hydrogenation of N–H Imines. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**(29), 9882–9883.

87. Huber T., Schneider L., Präg A., Gerhardt S., Einsle O., and Müller M., (2014), Direct Reductive Amination of Ketones: Structure and Activity of S-Selective Imine Reductases from *Streptomyces*. *ChemCatChem*, **6**(8), 2248–2252.
88. Huisman G. W. and Collier S. J., (2013), On the development of new biocatalytic processes for practical pharmaceutical synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **17**(2), 284–292.
89. Itoh N., Yachi C., and Kudome T., (2000), Determining a novel NAD⁺-dependent amine dehydrogenase with a broad substrate range from *Streptomyces virginiae* IFO 12827: purification and characterization. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **10**(1–3), 281–290.
90. Wu B., Janssen D. B., Szymbański W., Heberling M. M., and Feringa B. L., (2011), Aminomutases: mechanistic diversity, biotechnological applications and future perspectives. *Trends Biotechnol.*, **29**(7), 352–362.
91. Jeon H., Yoon S., Ahsan M. M., Sung S., Kim G.-H., Sundaramoorthy U., et al., (2017), The Kinetic Resolution of Racemic Amines Using a Whole-Cell Biocatalyst Co-Expressing Amine Dehydrogenase and NADH Oxidase. *Catalysts*, **7**(9), 251.
92. Jones J. B. and Taylor K. E., (1976), Nicotinamide coenzyme regeneration. Flavin mononucleotide (riboflavin phosphate) as an efficient, economical, and enzyme-compatible recycling agent. *Can. J. Chem.*, **54**(19), 2969–2973.
93. Kaiser F., Eisold A., Bittrich S., and Labudde D., (2016), Fit3D: a web application for highly accurate screening of spatial residue patterns in protein structure data. *Bioinformatics*, **32**(5), 792–794.
94. Kaiser F., Eisold A., and Labudde D., (2015), A Novel Algorithm for Enhanced Structural Motif Matching in Proteins. *J. Comput. Biol.*, **22**(7), 698–713.
95. Kato Y., Yamada H., and Asano Y., (1996), Stereoselective synthesis of opine-type secondary amine carboxylic acids by a new enzyme opine dehydrogenase use of recombinant enzymes. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **1**(3), 151–160.
96. Kim Y., Park J., and Kim M.-J., (2010), Fast racemization and dynamic kinetic resolution of primary benzyl amines. *Tetrahedron Lett.*, **51**(42), 5581–5584.
97. Klettke K. L., Sanyal S., Mutatu W., and Walker K. D., (2007), β-Styryl- and β-Aryl-β-alanine Products of Phenylalanine Aminomutase Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**(22), 6988–6989.
98. Knaus T., Böhmer W., and Mutti F. G., (2017), Amine dehydrogenases: efficient biocatalysts for the reductive amination of carbonyl compounds. *Green Chem.*
99. Knaus T., Cariati L., Masman M. F., and Mutti F. G., (2017), In vitro biocatalytic pathway design: orthogonal network for the quantitative and stereospecific amination of alcohols. *Org. Biomol. Chem.*, **15**(39), 8313–8325.
100. Kohls H., Steffen-Munsberg F., and Höhne M., (2014), Recent achievements in developing the biocatalytic toolbox for chiral amine synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **19**, 180–192.
101. Koszelewski D., Clay D., Rozzell D., and Kroutil W., (2009), Deracemisation of α-Chiral Primary Amines by a One-Pot, Two-Step Cascade Reaction Catalysed by ω-Transaminases. *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**(14), 2289–2292.
102. Koszelewski D., Tauber K., Faber K., and Kroutil W., (2010), ω-Transaminases for the synthesis of non-racemic α-chiral primary amines. *Trends Biotechnol.*, **28**(6), 324–332.
103. Kroutil W., Fischereder E.-M., Fuchs C. S., Lechner H., Mutti F. G., Pressnitz D., et al., (2013), Asymmetric Preparation of prim-, sec-, and tert-Amines Employing Selected Biocatalysts. *Org. Process Res. Dev.*, **17**(5), 751–759.
104. Leisch H., Grosse S., Iwaki H., Hasegawa Y., and Lau P. C. K., (2011), Cyclohexylamine oxidase as a useful biocatalyst for the kinetic resolution and deracemization of amines. *Can. J. Chem.*, **90**(1), 39–45.
105. Lenz M., Borlinghaus N., Weinmann L., and Nestl B. M., (2017), Recent advances in imine reductase-catalyzed reactions. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **33**(11), 199.
106. Li G., Yao P., Cong P., Ren J., Wang L., Feng J., et al., (2016), New recombinant cyclohexylamine oxidase variants for deracemization of secondary amines by orthogonally assaying designed mutants with structurally diverse substrates. *Sci. Rep.*, **6**, 24973.
107. Li X., Jia X., Lu G., Au-Yeung T. T.-L., Lam K.-H., Lo T. W. H., and Chan A. S. C., (2003), Highly enantioselective hydrogenation of enamides catalyzed by rhodium-monodentate

- phosphoramidite complex derived from H8-BINOL. *Tetrahedron Asymmetry*, **14**(18), 2687–2691.
108. Lien T., Madsen M., Rainey F. A., and Birkeland N. K., (1998), *Petrotoga mobilis* sp. nov., from a North Sea oil-production well. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48 Pt 3**, 1007–1013.
109. Liu J., Pang B. Q. W., Adams J. P., Snajdrova R., and Li Z., (2017), Coupled Immobilized Amine Dehydrogenase and Glucose Dehydrogenase for Asymmetric Synthesis of Amines by Reductive Amination with Cofactor Recycling. *ChemCatChem*, **9**(3), 425–431.
110. Liu W., Li Z., Huang C.-H., Guo R.-T., Zhao L., Zhang D., et al., (2014), Structural and Mutational Studies on the Unusual Substrate Specificity of meso-Diaminopimelate Dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum*. *ChemBioChem*, **15**(2), 217–222.
111. Lloret S., Andres J., Legua C., and Falco P., (2005), Determination of ammonia and primary amine compounds and Kjeldahl nitrogen in water samples with a modified Roth's fluorimetric method. *Talanta*, **65**(4), 869–875.
112. Lorillière M., Sousa M. D., Bruna F., Heuson E., Gefflaut T., Berardinis V. de, et al., (2017), One-pot, two-step cascade synthesis of naturally rare L-erythro (3S,4S) ketoses by coupling a thermostable transaminase and transketolase. *Green Chem.*, **19**(2), 425–435.
113. Louie G. V., Bowman M. E., Moffitt M. C., Baiga T. J., Moore B. S., and Noel J. P., (2006), Structural Determinants and Modulation of Substrate Specificity in Phenylalanine-Tyrosine Ammonia-Lyases. *Chem. Biol.*, **13**(12), 1327–1338.
114. Lovelock S. L., Lloyd R. C., and Turner N. J., (2014), Phenylalanine Ammonia Lyase Catalyzed Synthesis of Amino Acids by an MIO-Cofactor Independent Pathway. *Angew. Chem.*, **126**(18), 4740–4744.
115. Löwe J., Ingram A. A., and Gröger H., (2018), Enantioselective synthesis of amines via reductive amination with a dehydrogenase mutant from *Exigobacterium sibiricum*: Substrate scope, co-solvent tolerance and biocatalyst immobilization. *Bioorg. Med. Chem.*, **26**(7), 1387–1392.
116. Lowry O. H., PASSONNEAU J. V., and ROCK M. K., (1961), The Stability of Pyridine Nucleotides". *J. Biol. Chem.*, **236**(10), 5.
117. Ma G., Xu Z., Zhang P., Liu J., Hao X., Ouyang J., et al., (2014), A Novel Synthesis of Rasagiline via a Chemoenzymatic Dynamic Kinetic Resolution. *Org. Process Res. Dev.*, **18**(10), 1169–1174.
118. Mangas-Sanchez J., France S. P., Montgomery S. L., Aleku G. A., Man H., Sharma M., et al., (2017), Imine reductases (IREDs). *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **37**, 19–25.
119. Mayol O., David S., Darii E., Debard A., Mariage A., Pellouin V., et al., (2016), Asymmetric reductive amination by a wild-type amine dehydrogenase from the thermophilic bacteria *Petrotoga mobilis*. *Catal. Sci. Technol.*, **6**(20), 7421–7428.
120. Milmo S., (2012), The enzyme makers. *Chem. Ind.*, **76**(11), 28–31.
121. de Miranda A. S., Miranda L. S. M., and de Souza R. O. M. A., (2015), Lipases: Valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions. *Biotechnol. Adv.*, **33**(5), 372–393.
122. Mitsukura K., Kuramoto T., Yoshida T., Kimoto N., Yamamoto H., and Nagasawa T., (2013), A NADPH-dependent imine reductase from *Streptomyces* sp. GF3546 for asymmetric synthesis of optically active amines: purification, characterization, gene cloning, and expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**(18), 8079–8086.
123. Mitsukura K., Suzuki M., Shinoda S., Kuramoto T., Yoshida T., and Nagasawa T., (2011), Purification and characterization of a novel (R)-imine reductase from *Streptomyces* sp. GF3587. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**(9), 1778–1782.
124. Monti D., Forchin M. C., Crotti M., Parmeggiani F., Gatti F. G., Brenna E., and Riva S., (2015), Cascade Coupling of Ene-Reductases and ω -Transaminases for the Stereoselective Synthesis of Diastereomerically Enriched Amines. *ChemCatChem*, **7**(19), 3106–3109.
125. Morris G. M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M. F., Belew R. K., Goodsell D. S., and Olson A. J., (2009), AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.*, **30**(16), 2785–2791.
126. Mutti F. G., Knaus T., Scrutton N. S., Breuer M., and Turner N. J., (2015), Conversion of alcohols to enantiopure amines through dual-enzyme hydrogen-borrowing cascades. *Science*, **349**(6255), 1525–1529.

127. Mutzel R., DE, Marliere P., and FR, (2004), United States Patent: 6686194 - Method and device for selecting accelerated proliferation of living cells in suspension.
128. Niu D. and Buchwald S. L., (2015), Design of Modified Amine Transfer Reagents Allows the Synthesis of α -Chiral Secondary Amines via CuH-Catalyzed Hydroamination. *J. Am. Chem. Soc.*, **137**(30), 9716–9721.
129. Nörder A., Herrmann P., Herdtweck E., and Bach T., (2010), Acyclic Stereocontrol in the Catalytic C–H Amination of Benzylic Methylene Groups. *Org. Lett.*, **12**(16), 3690–3692.
130. Nugent T. C. ed., (2010), Chiral amine synthesis: methods, developments and applications, Weinheim: Wiley-VCH-Verl.
131. Nugent T. C. and El Shazly M., (2010), Chiral Amine Synthesis – Recent Developments and Trends for Enamide Reduction, Reductive Amination, and Imine Reduction. *Adv. Synth. Catal.*, **352**(5), 753–819.
132. Otsuka M., Masuda T., Haupt A., Ohno M., Shiraki T., Sugiura Y., and Maeda K., (1990), Synthetic studies on antitumor antibiotic, bleomycin. 27. Man-designed bleomycin with altered sequence specificity in DNA cleavage. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**(2), 838–845.
133. Pablo Ó., Guijarro D., Kovács G., Lledós A., Ujaque G., and Yus M., (2012), A Versatile Ru Catalyst for the Asymmetric Transfer Hydrogenation of Both Aromatic and Aliphatic Sulfinylimines. *Chem. – Eur. J.*, **18**(7), 1969–1983.
134. Park Y., Kim Y., and Chang S., (2017), Transition Metal-Catalyzed C–H Amination: Scope, Mechanism, and Applications. *Chem. Rev.*, **117**(13), 9247–9301.
135. Parmeggiani F., Weise N. J., Ahmed S. T., and Turner N. J., (2017), Synthetic and Therapeutic Applications of Ammonia-lyases and Aminomutases. *Chem. Rev.*
136. Paul C. E., Gargiulo S., Opperman D. J., Lavandera I., Gotor-Fernández V., Gotor V., et al., (2013), Mimicking Nature: Synthetic Nicotinamide Cofactors for C=C Bioreduction Using Enoate Reductases. *Org. Lett.*, **15**(1), 180–183.
137. Paul C. E. and Hollmann F., (2016), A survey of synthetic nicotinamide cofactors in enzymatic processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**(11), 4773–4778.
138. Paul C. E., Tischler D., Riedel A., Heine T., Itoh N., and Hollmann F., (2015), Nonenzymatic Regeneration of Styrene Monooxygenase for Catalysis. *ACS Catal.*, **5**(5), 2961–2965.
139. Pietruszka J. and Schölzel M., (2012), Ene Reductase-Catalysed Synthesis of (R)-Profen Derivatives. *Adv. Synth. Catal.*, **354**(4), 751–756.
140. Pirnot M. T., Wang Y.-M., and Buchwald S. L., (2016), Copper Hydride Catalyzed Hydroamination of Alkenes and Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**(1), 48–57.
141. Polaina J. ed., (2007), Industrial enzymes: structure, function and applications, Dordrecht: Springer.
142. Porter J. L., Rusli R. A., and Ollis D. L., (2016), Directed Evolution of Enzymes for Industrial Biocatalysis. *ChemBioChem*, **17**(3), 197–203.
143. Pushpanath A., Siirola E., Bornadel A., Woodlock D., and Schell U., (2017), Understanding and Overcoming the Limitations of *Bacillus badius* and *Caldalkalibacillus thermarum* Amine Dehydrogenases for Biocatalytic Reductive Amination. *ACS Catal.*, 3204–3209.
144. Puthan Veetil V., Fibriansah G., Raj H., Thunnissen A.-M. W. H., and Poelarends G. J., (2012), Aspartase/Fumarase Superfamily: A Common Catalytic Strategy Involving General Base-Catalyzed Formation of a Highly Stabilized aci-Carboxylate Intermediate. *Biochemistry*, **51**(21), 4237–4243.
145. Reetz M. T., (2013), Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future. *J. Am. Chem. Soc.*, **135**(34), 12480–12496.
146. Reetz M. T. and Schimossek K., (1996), Lipase-Catalyzed Dynamic Kinetic Resolution of Chiral Amines: Use of Palladium as the Racemization Catalyst. *Chimia*, **50**, 668–669.
147. Reignier T., Berardinis V. de, Petit J.-L., Mariage A., Hamzé K., Duquesne K., and Alphand V., (2014), Broadening the scope of Baeyer–Villiger monooxygenase activities toward α,β -unsaturated ketones: a promising route to chiral enol-lactones and ene-lactones. *Chem. Commun.*, **50**(58), 7793–7796.
148. Ren H., Zhang Y., Su J., Lin P., Wang B., Fang B., and Wang S., (2017), Encapsulation of amine dehydrogenase in hybrid titania nanoparticles by polyethylenimine coating and templated biomineratization. *J. Biotechnol.*, **241**, 33–41.

149. Reß T., Hummel W., Hanlon S. P., Iding H., and Gröger H., (2015), The Organic–Synthetic Potential of Recombinant Ene Reductases: Substrate-Scope Evaluation and Process Optimization. *ChemCatChem*, **7**(8), 1302–1311.
150. Ricca E., Brucher B., and Schrittwieser J. H., (2011), Multi-Enzymatic Cascade Reactions: Overview and Perspectives. *Adv. Synth. Catal.*, **353**(13), 2239–2262.
151. Richter N., C. Simon R., Lechner H., Kroutil W., M. Ward J., and C. Hailes H., (2015), ω -Transaminases for the amination of functionalised cyclic ketones. *Org. Biomol. Chem.*, **13**(33), 8843–8851.
152. Rodríguez Mata M., Frank A., Wells E., Leipold F., Turner N. J., Hart S., et al., (2013), Structure and Activity of NADPH-Dependent Reductase Q1EQE0 from Streptomyces kanamyceticus, which Catalyses the R-Selective Reduction of an Imine Substrate. *ChemBioChem*, **14**(11), 1372–1379.
153. Roiban G.-D., Kern M., Liu Z., Hyslop J., Tey P. L., Levine M. S., et al., (2017), Efficient Biocatalytic Reductive Aminations by Extending the Imine Reductase Toolbox. *ChemCatChem*, **9**(24), 4475–4479.
154. Rover L., Fernandes J. C. B., Neto G. de O., Kubota L. T., Katekawa E., and Serrano S. H. P., (1998), Study of NADH Stability Using Ultraviolet–Visible Spectrophotometric Analysis and Factorial Design. *Anal. Biochem.*, **260**(1), 50–55.
155. Rueping M., Sugiono E., Azap C., Theissmann T., and Bolte M., (2005), Enantioselective Brønsted Acid Catalyzed Transfer Hydrogenation: Organocatalytic Reduction of Imines. *Org. Lett.*, **7**(17), 3781–3783.
156. Savile C. K., Janey J. M., Mundorff E. C., Moore J. C., Tam S., Jarvis W. R., et al., (2010), Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture. *Science*, **329**(5989), 305–309.
157. Sayer C., J. Martinez-Torres R., Richter N., Isupov M., C. Hailes H., Littlechild J., and Ward J., (2014), The substrate specificity, enantioselectivity and structure of the (R)-selective amine: Pyruvate transaminase from *Nectria haematococca*. *FEBS J.*, **281**.
158. Schmidtke P., Bidon-Chanal A., Luque F. J., and Barril X., (2011), MDpocket: open-source cavity detection and characterization on molecular dynamics trajectories. *Bioinformatics*, **27**(23), 3276–3285.
159. Scholtissek A., Tischler D., Westphal A. H., van Berkel W. J. H., and Paul C. E., (2017), Old Yellow Enzyme-Catalysed Asymmetric Hydrogenation: Linking Family Roots with Improved Catalysis. *Catalysts*, **7**(5), 130.
160. Schrittwieser J. H., Velikogne S., and Kroutil W., (2015), Biocatalytic Imine Reduction and Reductive Amination of Ketones. *Adv. Synth. Catal.*, **357**(8), 1655–1685.
161. Schrödinger and LLC, The Pymol Molecular Graphic System.,
162. Schulze B. and Wubbolts M. G., (1999), Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **10**(6), 609–615.
163. Seah S. Y. K., Britton K. L., Rice D. W., Asano Y., and Engel P. C., (2002), Single Amino Acid Substitution in *Bacillus sphaericus* Phenylalanine Dehydrogenase Dramatically Increases Its Discrimination between Phenylalanine and Tyrosine Substrates. *Biochemistry*, **41**(38), 11390–11397.
164. Seddig Z. S., Malik M. S., Ahmed S. A., Babalghith A. O., and Kamal A., (2017), Lipases in asymmetric transformations: Recent advances in classical kinetic resolution and lipase–metal combinations for dynamic processes. *Coord. Chem. Rev.*, **348**, 54–70.
165. Sellés Vidal L., Kelly C. L., Mordaka P. M., and Heap J. T., (2018), Review of NAD(P)H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*, **1866**(2), 327–347.
166. Sevillano Cabeza A., Moliner Martinez Y., Molins Legua C., and Campins Falco P., (2003), Rapid fluorimetric assay for primary amine groups in water samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, **376**(6), 918–922.
167. Sharma M., Mangas-Sánchez J., Turner N. J., and Grogan G., (2017), NAD(P)H-Dependent Dehydrogenases for the Asymmetric Reductive Amination of Ketones: Structure, Mechanism, Evolution and Application. *Adv. Synth. Catal.*, **359**(12), 2011–2025.

168. Sheldon R. A. and Brady D., (2018), The Limits to Biocatalysis: Pushing the Envelope. *Chem. Commun.*
169. Sheldon R. A. and Pereira P. C., (2017), Biocatalysis engineering: the big picture. *Chem. Soc. Rev.*, **46**(10), 2678–2691.
170. Sheldon R. A. and Woodley J. M., (2017), Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem. Rev.*
171. Simon R. C., Richter N., Bustos E., and Kroutil W., (2014), Recent Developments of Cascade Reactions Involving ω -Transaminases. *ACS Catal.*, **4**(1), 129–143.
172. Skalden L., Peters C., Ratz L., and Bornscheuer U. T., (2016), Synthesis of (1R,3R)-1-amino-3-methylcyclohexane by an enzyme cascade reaction. *Tetrahedron*, **72**(46), 7207–7211.
173. Slabu I., Galman J. L., Lloyd R. C., and Turner N. J., (2017), Discovery, Engineering, and Synthetic Application of Transaminase Biocatalysts. *ACS Catal.*, **7**(12), 8263–8284.
174. Song Y., DiMaio F., Wang R. Y.-R., Kim D., Miles C., Brunette T., et al., (2013), High resolution comparative modeling with RosettaCM. *Struct. Lond. Engl. 1993*, **21**(10).
175. Souterre T., (2017), Optimization of enzymes via directed evolution in vivo.
176. Steffen-Munsberg F., Vickers C., Kohls H., Land H., Mallin H., Nobili A., et al., (2015), Bioinformatic analysis of a PLP-dependent enzyme superfamily suitable for biocatalytic applications. *Biotechnol. Adv.*, **33**(5), 566–604.
177. Steinkellner G., Gruber C. C., Pavkov-Keller T., Binter A., Steiner K., Winkler C., et al., (2014), Identification of promiscuous ene-reductase activity by mining structural databases using active site constellations. *Nat. Commun.*, **5**, 4150.
178. Storer R. I., Carrera D. E., Ni Y., and MacMillan D. W. C., (2006), Enantioselective Organocatalytic Reductive Amination. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**(1), 84–86.
179. Svedendahl M., Branneby C., Lindberg L., and Berglund P., (2010), Reversed Enantiopreference of an α -Transaminase by a Single-Point Mutation. *ChemCatChem*, **2**(8), 976–980.
180. Tan X., Gao S., Zeng W., Xin S., Yin Q., and Zhang X., (2018), Asymmetric Synthesis of Chiral Primary Amines by Ruthenium-Catalyzed Direct Reductive Amination of Alkyl Aryl Ketones with Ammonium Salts and Molecular H₂. *J. Am. Chem. Soc.*, **140**(6), 2024–2027.
181. Tararov V. I. and Börner A., (2005), Approaching Highly Enantioselective Reductive Amination. *Synlett*, **2005**(2), 203–211.
182. Taylor K. E. and Jones J. B., (1976), Nicotinamide coenzyme regeneration by dihydropyridine and pyridinium compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, **98**(18), 5689–5694.
183. Thompson M. P. and Turner N. J., (2017), Two-Enzyme Hydrogen-Borrowing Amination of Alcohols Enabled by a Cofactor-Switched Alcohol Dehydrogenase. *ChemCatChem*, **9**(20), 3833–3836.
184. Timsina Y. N., Gupton B. F., and Ellis K. C., (2018), Palladium-Catalyzed C-H Amination of C(sp₂) and C(sp₃)-H Bonds: Mechanism and Scope for N-Based Molecule Synthesis. *ACS Catal.*
185. Tufvesson P., Lima-Ramos J., Jensen J. S., Al-Haque N., Neto W., and Woodley J. M., (2011), Process considerations for the asymmetric synthesis of chiral amines using transaminases. *Biotechnol. Bioeng.*, **108**(7), 1479–1493.
186. Turner N. J., (2011), Ammonia lyases and aminomutases as biocatalysts for the synthesis of α -amino and β -amino acids. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **15**(2), 234–240.
187. Turner N. J., (2009), Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. *Nat. Chem. Biol.*, **5**(8), 567–573.
188. Turner N. J. and O'Reilly E., (2013), Biocatalytic retrosynthesis. *Nat. Chem. Biol.*, **9**(5), 285–288.
189. Turner N. J., Truppo M. D., Rozzell J. D., and Moore J. C., (2009), Rapid screening and scale-up of transaminase catalysed reactions. *Org Biomol Chem*, **7**(2), 395–398.
190. Vallenet D., Calteau A., Cruveiller S., Gachet M., Lajus A., Josso A., et al., (2017), MicroScope in 2017: an expanding and evolving integrated resource for community expertise of microbial genomes. *Nucleic Acids Res.*, **45**(D1), D517–D528.
191. Vanhooke J. L., Thoden J. B., Brunhuber N. M. W., Blanchard J. S., and Holden H. M., (1999), Phenylalanine Dehydrogenase from *Rhodococcus sp.* M4: High-Resolution X-ray Analyses of Inhibitory Ternary Complexes Reveal Key Features in the Oxidative Deamination Mechanism. *Biochemistry*, **38**(8), 2326–2339.

192. Vergne Vaxelaire C., Bordier F., Fossey A., Besnard-Gonnet M., Debard A., Mariage A., et al., (2013), Nitrilase Activity Screening on Structurally Diverse Substrates: Providing Biocatalytic Tools for Organic Synthesis. *Adv. Synth. Catal.*, **355**(9), 1763–1779.
193. Verho O. and Bäckvall J.-E., (2015), Chemoenzymatic Dynamic Kinetic Resolution: A Powerful Tool for the Preparation of Enantiomerically Pure Alcohols and Amines. *J. Am. Chem. Soc.*, **137**(12), 3996–4009.
194. de Villiers M., Puthan Veetil V., Raj H., de Villiers J., and Poelarends G. J., (2012), Catalytic Mechanisms and Biocatalytic Applications of Aspartate and Methylaspartate Ammonia Lyases. *ACS Chem. Biol.*, **7**(10), 1618–1628.
195. Vries J. G. de and Mršić N., (2011), Organocatalytic asymmetric transfer hydrogenation of imines. *Catal. Sci. Technol.*, **1**(5), 727–735.
196. Wang C. and Xiao J., (2013), Asymmetric Reductive Amination. in *Stereoselective Formation of Amines* Topics in Current Chemistry. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 261–282.
197. Wang S. C. and Frey P. A., (2007), S-adenosylmethionine as an oxidant: the radical SAM superfamily. *Trends Biochem. Sci.*, **32**(3), 101–110.
198. Wang S. and Fang B., (2013), Method for preparing chiral amine through asymmetric reduction under catalysis of marine strain.
199. Wang S., Fang B., Ren H., and Lin P., (2016), Marine bacterial strain and method for preparing chiral amine from catalyzing of amine dehydrogenase of marine bacterial strain.
200. Wang Y.-Q., Lu S.-M., and Zhou Y.-G., (2007), Highly Enantioselective Pd-Catalyzed Asymmetric Hydrogenation of Activated Imines. *J. Org. Chem.*, **72**(10), 3729–3734.
201. Watanabe S., Sueda R., Fukumori F., and Watanabe Y., (2015), Characterization of Flavin-Containing Opine Dehydrogenase from Bacteria. *PLOS ONE*, **10**(9), e0138434.
202. Weiß M. S., Pavlidis I. V., Spurr P., Hanlon S. P., Wirz B., Iding H., and Bornscheuer U. T., (2017), Amine Transaminase Engineering for Spatially Bulky Substrate Acceptance. *ChemBioChem*, **18**(11), 1022–1026.
203. Weiß M., V. Pavlidis I., Spurr P., P. Hanlon S., Wirz B., Iding H., and T. Bornscheuer U., (2016), Protein-engineering of an amine transaminase for the stereoselective synthesis of a pharmaceutically relevant bicyclic amine. *Org. Biomol. Chem.*, **14**(43), 10249–10254.
204. Wetzl D., Gand M., Ross A., Müller H., Matzel P., Hanlon S. P., et al., (2016), Asymmetric Reductive Amination of Ketones Catalyzed by Imine Reductases. *ChemCatChem*, **8**(12), 2023–2026.
205. Wills M., (2008), Imino Reductions by Transfer Hydrogenation. in *Modern Reduction Methods*. Wiley-Blackwell, pp. 271–296.
206. Winkler C. K., Clay D., Davies S., O'Neill P., McDaid P., Debarge S., et al., (2013), Chemoenzymatic Asymmetric Synthesis of Pregabalin Precursors via Asymmetric Bioreduction of β-Cyanoacrylate Esters Using Ene-Reductases. *J. Org. Chem.*, **78**(4), 1525–1533.
207. Winkler C. K., Faber K., and Hall M., (2018), Biocatalytic reduction of activated CC-bonds and beyond: emerging trends. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **43**, 97–105.
208. Wohlgemuth R., (2010), Biocatalysis—key to sustainable industrial chemistry. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **21**(6), 713–724.
209. Wolf C., (2007), Dynamic Stereochemistry of Chiral Compounds: Principles and Applications, Royal Society of Chemistry.
210. Wolthers K. R., Rigby S. E. J., and Scrutton N. S., (2008), Mechanism of Radical-based Catalysis in the Reaction Catalyzed by Adenosylcobalamin-dependent Ornithine 4,5-Aminomutase. *J. Biol. Chem.*, **283**(50), 34615–34625.
211. Woodley J. M., (2013), Protein engineering of enzymes for process applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **17**(2), 310–316.
212. Xie J.-H., Zhu S.-F., and Zhou Q.-L., (2011), Transition Metal-Catalyzed Enantioselective Hydrogenation of Enamines and Imines. *Chem. Rev.*, **111**(3), 1713–1760.
213. Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., and Zhang Y., (2015), The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods*, **12**(1), 7–8.

214. Ye L. J., Li Z., Yang Y., Toh H. H., Adams J. P., and Snajdrova R., (2015), Engineering of Amine Dehydrogenase for Asymmetric Reductive Amination of Ketone by Evolving *Rhodococcus* Phenylalanine Dehydrogenase. *ACS Catal.*, **5**(2), 1119–1122.
215. Yu H.-L., Li T., Chen F.-F., Luo X.-J., Li A., Yang C., et al., (2018), Bioamination of alkane with ammonium by an artificially designed multienzyme cascade. *Metab. Eng.*, **47**, 184–189.
216. Yun H., Hwang B.-Y., Lee J.-H., and Kim B.-G., (2005), Use of Enrichment Culture for Directed Evolution of the *Vibrio fluvialis* JS17 ω -Transaminase, Which Is Resistant to Product Inhibition by Aliphatic Ketones. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(8), 4220–4224.
217. Zanghellini A., (2014), de novo computational enzyme design. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **29**, 132–138.
218. Zaparucha A., Berardinis V. de, and Vaxelaire-Vergne C., (2018), Chapter 1:Genome Mining for Enzyme Discovery. in *Modern Biocatalysis.*, pp. 1–27.
219. Zaparucha A., de Berardinis V., and Weissenbach J., (2011), Biocatalyse, bioconversion et biotechnologie blanch : des outils du vivant pour la chimie. *Actual. Chim.*, **353–354**, 43–50.
220. Zhang D., Chen X., Zhang R., Yao P., Wu Q., and Zhu D., (2015), Development of β -Amino Acid Dehydrogenase for the Synthesis of β -Amino Acids via Reductive Amination of β -Keto Acids. *ACS Catal.*, **5**(4), 2220–2224.
221. Zhao H. and van der Donk W. A., (2003), Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**(6), 583–589.
222. Zhou J. and List B., (2007), Organocatalytic Asymmetric Reaction Cascade to Substituted Cyclohexylamines. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**(24), 7498–7499.
223. Zhu C., Saito K., Yamanaka M., and Akiyama T., (2015), Benzothiazoline: Versatile Hydrogen Donor for Organocatalytic Transfer Hydrogenation. *Acc. Chem. Res.*, **48**(2), 388–398.

Publications



Cite this: *Catal. Sci. Technol.*, 2016,
6, 7421

Asymmetric reductive amination by a wild-type amine dehydrogenase from the thermophilic bacteria *Petrotoga mobilis*^{†‡}

Ombeline Mayol,^{§abc} Sylvain David,^{§abc} Ekaterina Darii,^{abc} Adrien Debard,^{abc} Aline Mariage,^{abc} Virginie Pellouin,^{abc} Jean-Louis Petit,^{abc} Marcel Salanoubat,^{abc} Véronique de Berardinis,^{abc} Anne Zaparucha^{abc} and Carine Vergne-Vaxelaire^{*abc}

The biocatalytic reductive amination of ketone to chiral amine is one of the most challenging reactions. Using a genome-mining approach, we found proteins catalyzing the reductive amination of ketones without a carboxylic function in the α or β position. The synthesis of (4S)-4-aminopentanoic acid (ee $\geq 99.5\%$) was achieved with the thermoactive amine dehydrogenase (AmDH) AmDH4 from *Petrotoga mobilis* in 88% yield. The high stability and substrate tolerance make AmDH4 a very good starting point for further discovery of reductive amination biocatalysts with an enlarged substrate range. This is the first report of wild-type enzymes with related genes having proper NAD(P)H-AmDH activity.

Received 28th July 2016,
Accepted 29th July 2016

DOI: 10.1039/c6cy01625a

www.rsc.org/catalysis

Introduction

Chiral amines are present in many active compounds and are among the most frequently used chemical intermediates for the production of agrochemicals, pharmaceutical ingredients,¹ polymers and many high-value materials. These secondary or tertiary amines come mostly from the simple alkylation and/or amidation of chiral primary amines, making the latter convenient building blocks adopted by chemists. Various production procedures have been developed, with the major route being kinetic resolution by diastereoisomeric crystallization of racemic amines. In addition, the two most established chemical methods are the asymmetric addition of carbanions to aldimines generated from aldehyde and the asymmetric hydrogenation of acetamides and imines obtained from ketones followed by cleavage of the tertiary amines obtained.² None of these methods enable direct access to a chiral primary amine from ketone without stepping

through a secondary imine or protecting the amine intermediate. Moreover, most processes require expensive and unsustainable transition metal complexes and generate copious amounts of waste via protection and deprotection steps. Owing to significant advances in genomics, molecular biology and bioinformatics, a high number of natural or redesigned enzymes are now available to the synthetic organic chemist,³ making biocatalysis an increasingly attractive manufacturing option.⁴ At the industrial scale, the ω -transaminases,⁵ catalyzing the synthesis of chiral amines from prochiral ketones with a sacrificial amine donor,⁶ have become the tools of choice.⁷ Enzymatic reductive amination with ammonia of prochiral ketones into chiral amines is naturally occurring but restricted to the α -keto acid substrates which give chiral α -amino acids by reaction catalyzed by enzymes of the α -amino acid dehydrogenase family.^{1,8} As far as we know, there are very few examples of enzymatic reductive amination by wild-type amine dehydrogenase (AmDH) active towards ketones without a carboxylic acid moiety in the α or β position. Itoh and coworkers described this activity in *Streptomyces virginiae* on isolated enzymes but with low enantioselectivity,⁹ and Wang *et al.* on whole cells of *Pseudomonas kilonensis*.¹⁰ However, until today, no gene sequence has been identified to encode for these amine dehydrogenases. Facing the importance of this reaction promoted as the holy grail of biocatalysis,¹¹ hard work has been done to create such amine dehydrogenases by protein engineering. Bommaris and coworkers were the first to report the rational design of amine dehydrogenases¹² (L-AmDH and F-AmDH from *Bacillus stearothermophilus*¹³ and *Bacillus badius*,¹⁴ respectively) using α -amino acid dehydrogenase as the starting scaffold. These

^a CEA, DRF, IG, Genoscope, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry, France.
E-mail: cvergne@genoscope.cns.fr

^b CNRS-UMR8030 Génomique Métabolique, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry, France

^c Université Evry Val d'Essonne, Boulevard François Mitterrand, 91025 Evry, France

† C. V.-V. and A. Z. designed and supervised this study. O. M. and S. D. conducted the biocatalysis work. E. D. performed the MS analyses. C. V.-V., A. Z., O. M., S. D. and V. D. B. wrote the manuscript. M. S. contributed to the design of this study. J.-L. P., V. P., A. D. and A. M. performed the steps required for protein production and purification. C. V.-V. and V. D. B. supervised the experiments.

‡ Electronic supplementary information (ESI) available: Protein gels, HPLC chromatogram, NMR analyses. See DOI: 10.1039/c6cy01625a

§ These authors contributed equally.

mutants catalyze the reversible reduction of various ketones including hydrophobic ones through the development of a bi-phasic aqueous–organic solvent reaction system.¹⁵ The biocatalytic potential of F-AmDH was newly highlighted in a remarkable dual-enzyme hydrogen-borrowing cascade by Turner and coworkers.¹⁶ The same cascade has been described by Xu *et al.* with a double mutant of leucine dehydrogenase from *Exiguobacterium sibiricum* coupled with a low enantioselective alcohol dehydrogenase from *Streptomyces coelicolor*.¹⁷ Very recently, a phenylalanine dehydrogenase from *Rhodococcus* sp. M4 was engineered into an amine dehydrogenase enabling the highly enantioselective reductive amination of phenylacetone and 4-phenyl-2-butanone.¹⁸ In addition, the imine reductase (IRED) family holds substantial promise in this asymmetric reductive amination of ketone with ammonia as reported over the past two years¹⁹ and illustrated recently by engineered IREDS.²⁰

To meet the demand for synthetically useful AmDH, enzymes exhibiting excellent stereoselectivity with related genes are needed. Among established strategies to provide enzymes possessing new or improved properties, exploring protein natural diversity is one of the most attractive.²¹ Moreover, having in hand wild-type AmDHs should expand the synthetic scope of amine dehydrogenases and furnish new scaffolds for semi-rational protein engineering.

Experimental

Chemicals and equipment

All reagents were purchased from commercial sources and used without additional purification. 4-Aminopentan-2-one, pentan-2-one, 4-oxopentanoic acid, hexan-2-one, 5-oxohexanoic acid, glucose, glucose-6-phosphate, (*S*)-2-(5-fluoro-2,4-dinitrophenylamino)propanamide (FDAA), NADH, and NADPH were purchased from Sigma-Aldrich. 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene (DNFB) was purchased from Acros Organic and racemic 4-aminopentanoic acid rac-9 and 5-aminohexanoic acid rac-10 from Enamine. Recycling enzyme glucose-6-dehydrogenase (G6PDH) G5885 from *Leuconostoc mesenteroides* and G7877 from *S. cerevisiae*, and formate dehydrogenase (FDH) from *Candida boidinii* were purchased from Sigma-Aldrich. A sample of phosphate dehydrogenase (PTDH) was gratefully given by Pr. Marco Fraaije (University of Groningen). 1 g of glucose dehydrogenase (GDH) GDH105 and CDX901 were given by Codexis®. NMR spectra were recorded on a Bruker 300 MHz spectrometer (Evry University, France). Chemical shifts (expressed in ppm) of ¹H and ¹³C NMR spectra were referenced to the solvent peaks δ(H) = 3.34 and δ(C) = 49.9 for MeOD-*d*₄, δ(H) = 4.79 for D₂O. Thin-layer chromatography (TLC) was performed using aluminium-backed sheets with silica gel 60 F254 (Merck). Column chromatography was performed on a CombiFlash® Companion using Redised® Rf cartridges. UHPLC analyses were performed on a UHPLC U3000 RS 1034 bar system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) equipped with a DAD3000 diode array detector. HPLC-MS analyses were

performed on a U3000 RS 1034 bar instrument (Thermo Fisher Scientific) coupled to a hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometer (QTRAP 5500 from ABSciex, Toronto, Canada). Ion exchange column purification was performed on a Dowex® 50WX8 200 mesh purchased from Sigma Aldrich. Polarimetry measurements were done at 589 nm on a Unipol L Polarimeter (Schmidt + Haensch) equipped with a 50 mm glass tube.

Enzyme preparation

Choice of candidate enzymes. The collection of candidate enzymes was built up as previously described^{22,23} using the protein sequence of (2*R*,4*S*)-2,4-diaminopentanoate dehydrogenase (2,4-DAPDH) from *Clostridium sticklandii* (Uniprot entry: E3PY99, related gene *ord*).

Cloning and candidate enzyme production. All steps from primer purchase to cell lysate preparations were carried out as previously described.²³ 20 enzymes were obtained in a 96-microwell plate as cell-free extracts.

Purification of enzymes. The enzymes were purified by loading the cell-free extract (8 mL) onto a Ni-NTA column (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. The elution buffer was 50 mM Tris (pH 7.5), 50 mM NaCl, 250 mM imidazole and 10% glycerol. The positive fractions were desalting using Amicon ultracel-10 K (Merck Millipore) with buffer containing 50 mM phosphate (pH 7.5), 50 mM NaCl and 10% glycerol to obtain purified enzymes at 1.7 to 5 mg mL⁻¹ (yield: 0.6% to 2% from crude extract). Large-scale purification of AmDH4 was done by heat treatment: cell-free extracts (35 mL) were heated at 70 °C for 20 min. After centrifugation (12 000 rpm, 4 °C, 20 min), the supernatant containing the purified enzyme was taken. Protein concentrations were determined by the Bradford method: no significant loss of material (yield: 42%) and activity was observed. The samples were analyzed by SDS-PAGEs using the Invitrogen Nupage system (see Fig. S1 and S2‡). The purified proteins were stored at -80 °C.

HPLC conditions

HPLC-MS analyses. HPLC-MS analyses were conducted on a Zic-pHilic (Merck) column (100 × 4.6 mm; 5 µm) under the following conditions: mixture of 10 mM (NH₄)₂CO₃/MeCN as eluent with a linear gradient (ratio 20/80 to 60/40 in 10 min, then 60/40 during 6 min); flow rate 0.5 mL min⁻¹; temperature 40 °C; injection volume 10 µL. MS parameters: ion source 5500 V, curtain gas 20 a.u., temperature 450 °C, gas1 45 a. u., gas2 60 a.u., CAD – medium; MRM (multiple reaction monitoring) scan type using multiple ion transitions in positive mode (rac-9: 117.9 → 101.0; 117.9 → 83.1; rac-10: 132.0 → 114.8; 132.0 → 96.9; 132.0 → 69.0).

UHPLC-UV analyses. UHPLC analyses were performed using a Kinetex® F5 (Phenomenex) column (100 × 2.1 mm; 1.7 µm). Condition A: mixture of MeCN/H₂O + 0.1% formic acid as eluent with a linear gradient (ratio 30/70 during 2 min, then 30/70 to 80/20 in 2.5 min, then 80/20 during 0.5

min); flow 0.5 mL min⁻¹; temperature 25 °C; injection volume 1 μL; UV detection at $\lambda = 360$ nm. Condition B: mixture of MeCN/H₂O + 0.1% formic acid as eluent with a linear gradient (ratio 10/90 during 2 min, then 10/90 to 50/50 in 5 min, then 50/50 to 100/0 during 2 min); flow 0.5 mL min⁻¹; temperature 25 °C; injection volume 1 μL; UV detection at $\lambda = 340$ nm.

Library selection for activity

Enzymatic screening assay. All the reactions were conducted at 25 °C in 96-microwell plates. Amination reactions: to a reaction mixture (100 μL) containing 46 mM ketone substrate, 0.5 mM NADH and 0.5 mM NADPH in 225 mM NH₄Cl/NH₄OH buffer (pH 9.8) was added 30 μL of cell-free extract. Deamination reactions: to a reaction mixture (100 μL) containing 46 mM ketone substrate, 0.5 mM NAD and 0.5 mM NADP in 100 mM NaHCO₃/Na₂CO₃ buffer (pH 9.8) was added 30 μL of cell-free extract. Absorbance at 340 nm was measured immediately and monitored for 4 h. A background plate was established in the same manner but with a mixture lacking the ketone (amine in the case of deamination reaction) substrate. An active enzyme corresponds to a well exhibiting a higher slope in the reaction well over the background well.

HPLC-MS activity confirmation. To a reaction mixture (50 μL) containing 10 mM ketone substrate, 4 mM NADH and 4 mM NADPH in 225 mM NH₄Cl/NH₄OH buffer (pH 9.8) was added 7.5 μL of cell-free extract. The reaction mixture was stirred at 30 °C (500 rpm). After the specified period of time (2 h or 3 days), an aliquot (4 μL) was diluted in 396 μL of HPLC mobile phase (2/8 10 mM (NH₄)₂CO₃/MeCN), filtered on a 0.22 μm filter, and analyzed by HPLC-MS following the conditions detailed above. A background reaction was performed in the same manner but with a mixture lacking the cell-free extract. MS-calibration curves based on MRM responses were established with the commercially available racemic amines rac-9 and rac-10.

Substrate synthesis

Synthesis of (2R)-4-oxopentanoic acid (2). (2R)-4-Oxopentanoic acid 2 was obtained by hydrogenation followed by water-free acidic treatment of benzyl 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-oxopentanoate synthesized by Alfa Chemica.

Synthesis of 2-amino-5-oxohexanoic acid (rac-3). To a solution of *tert*-butyl 2-((diphenylmethylene)amino)acetate (1.63 mmol, 1.1 equiv., 482 mg) in dried THF (8 mL) was added but-3-en-2-one (1.48 mmol, 1 equiv., 120 μL) followed by cesium carbonate (1.48 mmol, 1 equiv., 482 mg). The mixture was stirred under inert atmosphere for 16 h at room temperature and then concentrated under reduced pressure to remove THF. The residue was then taken up in a mixture of water and ethyl acetate and extracted with ethyl acetate (2 × 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concen-

trated to dryness under reduced pressure. Purification of the product by flash chromatography on silica gel (isocratic mode: petroleum ether/ethyl acetate 90/10) afforded the desired keto ester as a colorless oil; yield: 500 mg (92%). The ester (0.24 mmol, 1 equiv., 86 mg) was treated with 4 M hydrochloric acid in dioxane (200 μL) at room temperature and concentrated to dryness under reduced pressure. After trituration (×3) with dichloromethane, the resulting solid was dried under reduced pressure to afford the desired 2-amino-5-oxohexanoic acid as a hydrochloride salt; yield: 20 mg (48%). ¹H NMR (MeOD-d₄, 300 MHz): δ = 5.18 (m, 1H), 3.24 (m, 2H), 2.72 (m, 1H), 2.58 (d, $J = 1.59$ Hz, 3H), 2.44 (m, 1H); ¹³C NMR (MeOD-d₄, 75 MHz): δ = 199.6, 171.8, 69.2, 40.2, 26.3, 19.4 (see Fig. S6 and S7‡).

Activity measurements

Specific activities of the selected enzyme. To a mixture of ketone (100 mM), ammonia buffer (300 mM NH₄Cl/NH₄OH, pH 7.2) and NADH (0.2 mM) (or 0.2 mM NADPH if the activity was better in the tested conditions) in a non-thermostated spectrophotometric cell was added an appropriate amount of AmDH enzyme (reaction final volume 100 μL). The initial slope measured at 340 nm determined the specific activity of the enzyme according to Beer-Lambert's law and the molar absorptivity of β-NADH ($\epsilon = 6298 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).²⁴

Activity *versus* temperature. A reaction mixture of ketone 6 (100 mM) in ammonia buffer (300 mM NH₄Cl/NH₄OH, pH 7.2) heated to the specified temperature in a ThermoMixer® (Eppendorf) was added to a thermostated spectrophotometric cell containing NADH (0.2 mM) and AmDH4 enzyme purified by heat treatment (reaction final volume 100 μL). The mixture was rapidly homogenized and the initial slope was measured at 340 nm in a temperature-controlled UV-spectrophotometer set to the specified temperature. The difference in slope with NADH oxidation with no enzyme at the same temperature determined the specific activity of AmDH4.

Thermostability studies. To a reaction medium containing a 100 mM solution of 4-oxopentanoic acid (6) in 300 mM ammonia buffer (NH₄Cl/NH₄OH, pH 7.2) preheated at 60 °C over 5 min was added a solution of 0.2 mM NADH followed by 0.5 mg mL⁻¹ AmDH4 purified by heat treatment and previously incubated for a specified time at a specified temperature. Residual activity was measured at 60 °C at 340 nm as described above.

Enantioselectivity and conversion

The reactions were performed in a 100 μL volume containing the substrate 4-oxopentanoic acid (6), specified cosubstrate, cofactor recycling enzyme, cofactor NADH, specified buffer, and a specified amount of AmDH at a specified temperature and 400 rpm. After a specified period of time, an aliquot (10 μL) was subjected to DNFB derivatization for conversion studies (see the example in Fig. S3‡) or FDAA derivatization for ee determination. The reactions were compared to blank reactions performed without enzyme and replicated when

specified. Conversions were deduced from calibration curves obtained with commercial racemic amine.

Procedure for the derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (DNFB). To 10 μL of a 10 mM reaction mixture were added 10 μL of a 1 M Na_2CO_3 aqueous solution, 50 μL of a 1 M NaHCO_3 aqueous solution and 40 μL of a 5 mM DNFB solution in EtOH. The mixture was stirred (400 rpm) at 65 °C for 1 h and then quenched by the addition of 50 μL of a 1 M HCl aqueous solution, filtered (0.22 μm), and analyzed by UHPLC (condition A).

Procedure for the derivatization with (*S*)-2-(5-fluoro-2,4-dinitrophenylamino)propanamide (FDAA). To 20 μL of a 10 mM reaction mixture were added 8 μL of a 1 M NAHCO_3 aqueous solution and 20 μL of a 15 mM FDAA solution in EtOH. The mixture was stirred (400 rpm) at 50 °C for 1 h and then quenched by the addition of 4 μL of 4 M HCl aqueous solution and centrifuged (10 min, 10 000 rpm) to remove proteins. The resulting supernatant (25 μL) was diluted in MeCN (75 μL), filtered (0.22 μm), and analyzed by UHPLC (condition B).

Biocatalytic synthesis of (4*S*)-4-aminopentanoic acid

Into a Greiner tube (50 mL) with a screw cap was poured 9 mL of a medium containing 5 M $\text{NH}_4\text{CO}_2\text{H}/\text{NH}_4\text{Cl}$ buffer (pH 8.5), 0.5 M 4-oxopentanoic acid (6) (basified at pH 8.9), 0.4 mM NADH, 0.5 U of FDH and 9 mg of AmDH4 purified by heat treatment. The reaction mixture was stirred at 400 rpm at 50 °C for 24 h and then quenched with 6 M HCl aqueous solution to reach pH 1 and centrifuged (10 krpm, 20 min). The supernatant was taken and the pellet was dissolved in water and centrifuged (10 krpm, 20 min) a second time. The supernatants were combined and lyophilized overnight. The freeze-dried product was dissolved in 0.1 M HCl aqueous solution and purified by ion exchange chromatography using a Dowex® 50WX8-200 mesh resin previously activated by 1 M hydrochloric acid (non-linear gradient elution (4 column volumes): 0.1 M HCl, H_2O until neutral pH, and 3.3% NH_4OH). Positive fractions (TLC, ninhydrin revelation) were combined and lyophilized to afford (4*S*)-4-aminopentanoic acid as a white solid (466 mg, 88% yield) with ee ≥ 99.5% as determined by UHPLC after FDAA derivatization (Fig. S5†). *tR* (9) = 2.30 min (condition A), *tR* [(*S*)-9] = 4.79 min, *tR* [(*R*)-9] = 5.09 min (condition B), $[\alpha]_D^{15,4} = -11.3^\circ$ ($c = 30.1 \text{ mg mL}^{-1}$, H_2O) {lit. for opposite enantiomer (4*R*)-4-aminopentanoic acid: $[\alpha]_D^{22,0} = +13.6^\circ$ ($c = 1.05$, H_2O)²⁵}, ^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ = 3.34–3.19 (m, 1H), 2.20 (ddd, $J = 7.8, 7.1, 3.1 \text{ Hz}$, 2H), 1.91–1.60 (m, 2H), 1.20 (d, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 3H) {identical to the literature²⁵}; ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ = 181.9, 47.9, 33.8, 30.9, 17.7 (see Fig. S8 and S9†).

Results and discussion

Identifying natural amide dehydrogenase (AmDH)

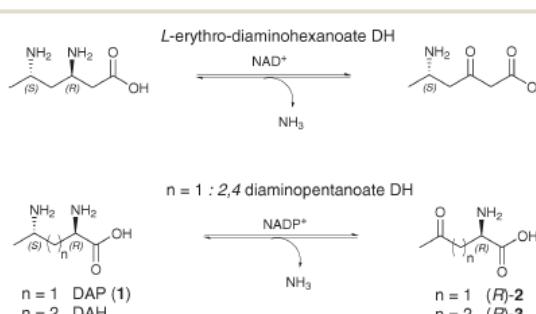
To track genes coding for AmDHs among the natural prokaryotic biodiversity, we first inventory all the reactions transforming unfunctionalized ketones into amines with ammonia

using NAD(P)H as cofactor by exploring metabolic databases.²⁶ All the reactions on α -keto acids were excluded from the request by removing any α -amino acid dehydrogenase from the search. We identified *L*-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase (3,5-DAHDH) involved in the lysine fermentation pathway²⁷ and (2*R*,4*S*)-2,4-diaminopentanoate dehydrogenase (2,4-DAPDH) involved in ornithine-fermenting bacteria^{28,29} and assumed to be also active towards 2,5-diaminohexanoate DAH (Scheme 1).³⁰

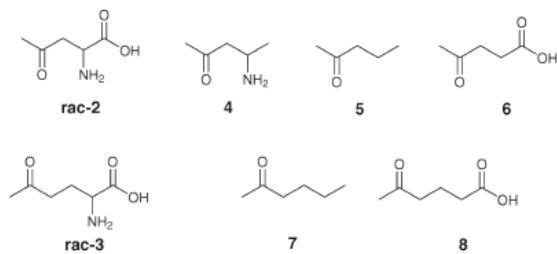
We decided to focus our attention on enzymes active towards ketones without an α or β carboxylic acid moiety, all the more so due to the synthesis of various β -amino acids recently reported by Zhu *et al.* with variants of 3,5-DAHDH from *Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*, a bacterium found in anaerobic digesters.³¹ The protein sequence of 2,4-DAPDH from *Clostridium sticklandii* (UniprotKB identifier: E3PY99) was used in a sequence-driven approach^{23,32} to build a collection of 2,4-DAP dehydrogenase similar enzymes.

169 proteins sharing at least 30% identity over at least 80% of the length with E3PY99 were collected. Proteins have been clustered based on sequence identity ($\geq 95\%$) and one representative per cluster, for which genomic DNA was available in the Genoscope strain collection, was chosen. From the 26 candidates selected to be representatives of their sequence diversity, 20 genes were successfully cloned in an expression vector. PCR failure occurred for the remaining 6 genes for which GC content (<30% or >65%) prevented efficient gene amplification. After overexpression of recombinant genes in *Escherichia coli* strain BL21, cells were lysed and the protein quantified (see ESI‡). These enzymes were then screened as cell-free extracts against various substrates. To approach the appropriate amine dehydrogenase substrates, a set of structural variants of the substrates of 2,4-DAPDH (2 and 3) with deletion of the amino and/or carboxylic moiety have been considered (Fig. 1). AmDH activity was assayed in the forward (reductive amination) or reverse (oxidative deamination) direction by spectrophotometric NAD(P)H-monitoring or HPLC-MS (Table 1).

Three compounds were found to be substrates. Nine enzymes demonstrated activity toward ketone 2, the natural substrate of 2,4-DAPDH.²⁸ More interestingly, six of them



Scheme 1 Reactions catalyzed by *L*-erythro-3,5-diaminohexanoate DH and 2,4-diaminopentanoate DH.

**Fig. 1** Compounds selected for the screening of AmDH candidates.

were found to be active towards 4-oxopentanoic acid (6), which was confirmed by MS analysis (Table 1, entries 2, 4, 5, and 7–9), and among them the latter three exhibit slight activity towards the homologous 5-oxohexanoic acid (Table 1, entries 4, 5, and 8). Being active towards non- α/β keto acids, these enzymes can be described as the first wild-type ω -amine dehydrogenases.

Considering these very promising results, the six enzymes AmDH2, AmDH4, AmDH5, AmDH7, AmDH8, and AmDH9 cloned with a polyhistidine tag were purified by nickel affinity chromatography for further studies. Preliminary experiments showed a very high enantioselectivity (ee $\geq 95\%$) towards ketone 6 for the six purified enzymes (data not shown). Their specific activities were determined by measuring the NAD(P)H absorbance in the reductive amination reaction (Table 2). The activities on ketone 6 were 1000-fold lower than the one on assumed natural substrate 1 (65 U mg $^{-1}$ protein for AmDH5). Among the three enzymes AmDH2,²⁹ AmDH4 and AmDH5 showing the highest specific activities on 6, we decided to focus on AmDH4 from the thermophilic bacteria *Petrotoga mobilis* strain DSM 10674. This thermophilic feature usually offers interesting properties of stability for subsequent implementation in industrial processes.³³ Moreover, AmDH4 showed activity towards the substrate analogue 8 unlike AmDH2, suggesting a better substrate promiscuity.

Table 2 Specific activity of purified enzymes towards 4-oxopentanoic acid (6)

Name	Specific activity ^a (mU mg $^{-1}$ prot)
AmDH4	51.9 \pm 4.8
AmDH7	2.9 \pm 0.1
AmDH8	2.9 \pm 0.6
AmDH9	3.1 \pm 0.2
AmDH5	34.1 \pm 2.6
AmDH2	70.9 \pm 15.6

^a Reaction conditions: 300 mM NH₄Cl/NH₄OH buffer, pH 7.2, 200 μ M NAD(P)H, 100 mM 6 at ambient temperature (triplicate).

Temperature studies with AmDH4

The enzyme AmDH4 was easily purified by heat treatment without notable loss of material and activity. Its coenzyme specificity was examined by measuring the enzymatic activity towards ketone 6 and either NADH or NADPH as the coenzyme. The highest activity in the tested conditions was obtained with NADH with an activity 10 times higher than that with NADPH. The enzyme seems to have a narrow substrate scope as its activity dropped to 5.6 mU mg $^{-1}$ of enzyme towards the homolog 5-oxohexanoic acid. No activity could be detected on acetophenone, cyclohexanone, penta-2-one or 2-aminopentan-2-one. A profile of temperature *versus* activity towards 4-ketopentanoic acid (6) revealed that AmDH4 is hardly active at 20 °C and starts to exhibit good activity at 60 °C and even above as better activity was found at 90 °C (Fig. 2). Its thermal optimum activity could not be reached due to limitations of our UV-vis spectrophotometer. At this high temperature, its specific activity was 8-fold higher than at 20 °C, reaching an activity of 0.7 U per milligram of protein, a value close to that of the chimeric cfl1-AmDH (1.7 U mg $^{-1}$ for *p*-fluorophenylacetone).³⁴

To estimate the thermostability of AmDH4, the enzyme was incubated at various temperatures (30 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C and 80 °C) during different periods of time and the residual activity towards compound 6 was assayed at 60 °C

Table 1 Spectrophotometric and HPLC-MS screening assay results

Entry	Name	UniprotKB identifier	Organism	Activity towards rac-2 ^a		Activity towards 6 ^b		Activity towards 8 ^b	
				UV	MS ^c	UV	MS ^c	UV	MS ^d
1	AmDH1	A6LLG5	<i>Thermosiphon melanesiensis</i> ^e	+		nd		nd	
2	AmDH2	A7HNJ8	<i>Fervidobacterium nodosum</i> ^e	+		+	+++	nd	nd
3	AmDH3	A8MGL6	<i>Alkaliphilus orenlandii</i>	+		nd		nd	
4	AmDH4	A9BHL2	<i>Petrotoga mobilis</i> ^e	+		+	+++	nd	++
5	AmDH5	E3PY99	<i>Clostridium sticklandii</i>	+		+	+++	nd	++
6	AmDH6	B8D005	<i>Halothermothrix orienti</i> ^e	+		nd		nd	
7	AmDH7	D2Z5Z0	<i>Dethiosulfovibrio peptidovorans</i>	+		+	+++	+	
8	AmDH8	D7DCF5	<i>Staphylothermus hellenicus</i> ^e	+		+	+++	+	++
9	AmDH9	D9RY14	<i>Thermosediminibacter oceani</i> ^e	+		+	++	+	nd

^a: Detected; ⁺⁺: detection of ≥ 0.001 mM product; ⁺⁺⁺: detection of ≥ 0.01 mM product; nd: not detected; empty cells: not tested. ^b Tested in oxidative deamination reaction. ^c Tested in reductive amination reaction. ^d MS detection of 4-aminopentanoic acid 9 after 2 h. ^e Thermophilic organism.

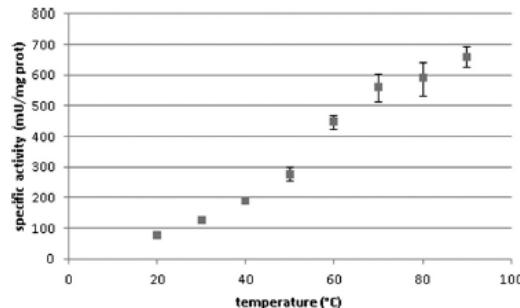


Fig. 2 Profile of activity versus temperature for AmDH4 on 4-oxopentanoic acid (6). Reaction conditions: 300 mM NH₄Cl/NH₄OH buffer, pH 7.2, 200 μM NADH, 100 mM 6. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments.

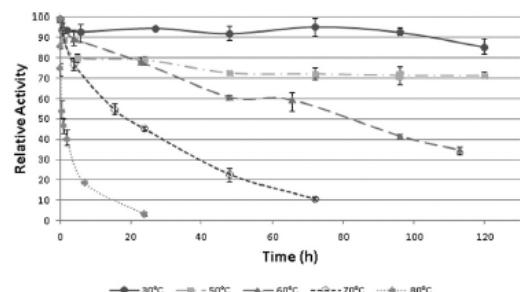


Fig. 3 Thermostability of AmDH4. Residual activity measured at 60 °C at the indicated time points after incubation of AmDH4 at various temperatures. Reaction conditions: 100 mM ketone 6, 200 μM NADH in 300 mM NH₄Cl/NH₄OH buffer, pH 7.2. Error bars reflect the variation of three independent experiments.

(Fig. 3). The half-life of the enzyme was estimated to be 65 h at 60 °C and 30 min at 80 °C. Most notably, this enzyme was

stable for several days at 30 °C as its activity was still around 90% of the initial activity after 14 days (data not shown).

Conversion with cofactor recycle system

The conditions required to perform the biocatalytic conversion of 4-ketopentanoic acid (6) to optically pure 4-aminopentanoic acid were optimized step by step and monitored by UHPLC-UV after DNFB derivatization (Fig. 4). One equivalent of NADH did not allow complete conversion even at the optimized temperature of 50 °C, where a conversion of around 40% has nonetheless been reached. To drive the reaction to completion without providing a large excess of expensive coenzyme, different NADH-recycling systems³⁵ (phosphate/PTDH, glucose-6-phosphate/G6PDH, glucose/GDH, formate/FDH) were tested at various temperatures, revealing glucose/GDH and formate/FDH as the best systems with an optimum temperature of 60 °C and 50 °C, respectively (ESI† Fig. S4). Higher temperatures near the optimum temperature of the enzyme activity do not allow obtaining better conversions due to denaturation of the enzyme of the recycling system and/or start of impaired cofactor stability. Thermostable systems for the regeneration of cofactor, including synthetic nicotinamide mimic,³⁶ are required to increase the benefit of the thermoactivity of the selected enzyme. Improvements with the formate/FDH recycling system regarding buffer (Na₂CO₃/NaHCO₃, NH₄Cl/NH₃ or NH₄HCO₃), pH and buffer/ammonia concentration revealed optimum conditions at a pH of 8.5 in 5 M ammonium formate, with the advantage for the latter of being both buffer and co-substrate. Increasing the initial ketone concentration affected the conversion but still enabled the nearly complete conversion of 0.5 M ketone 6 by using a somewhat larger concentration of enzyme (1 mg mL⁻¹) to perform the reaction over 24 h. The enantiomeric

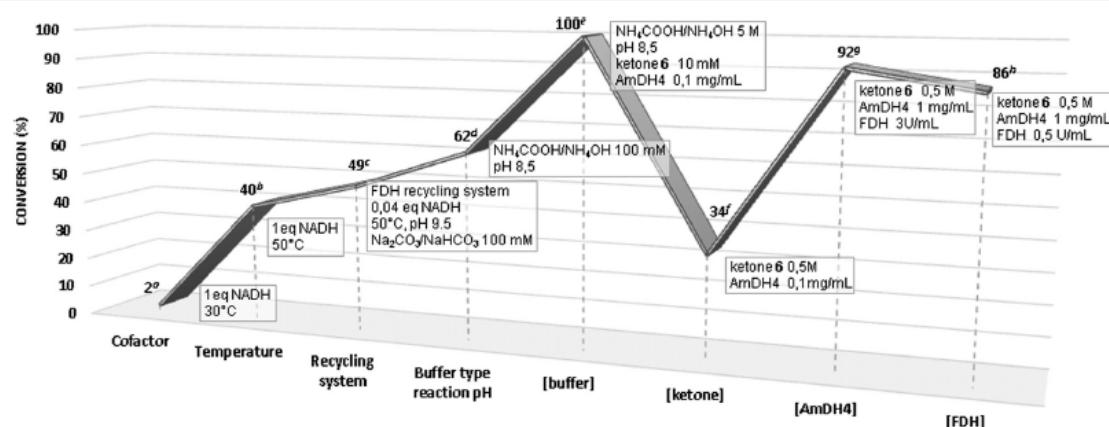
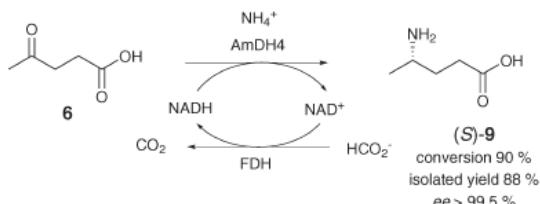


Fig. 4 Biocatalytic reaction improvement. ^a6 10 mM, NADH 10 mM, NH₄Cl 200 mM, AmDH4 0.1 mg mL⁻¹, NaHCO₃/Na₂CO₃ buffer 100 mM pH 9.5, 30 °C. ^bSame as conditions a at 50 °C. ^c6 10 mM, NADH 0.4 mM, NH₄Cl 200 mM, AmDH4 0.1 mg mL⁻¹, NaHCO₃/Na₂CO₃ buffer 100 mM pH 9.5, HCOONa 20 mM, FDH 3 U mL⁻¹, 50 °C. ^d6 10 mM, NADH 0.4 mM, AmDH4 0.1 mg mL⁻¹, NH₄CO₂H/NH₄OH buffer 200 mM pH 8.5, FDH 3 U mL⁻¹, 50 °C. ^eSame as conditions d with 5 M buffer. ^fSame as conditions e with substrate 6 0.5 M. ^gSame as conditions f with AmDH4 1 mg mL⁻¹. ^hSame as conditions g with FDH 0.5 U mL⁻¹. Acidic substrate 6 was previously basified at a studied pH. All reactions were performed in 100 μL reaction volume at 400 rpm in 24 h.



Scheme 2 Synthesis of (4S)-4-aminopentanoic acid (S)-9 catalyzed by AmDH4 with FDH cofactor regeneration system.

excess determined by UHPLC-UV after FDAA derivatization was up to 99.5% as the minor enantiomer could not be detected (ESI† Fig. S5).

Semi-preparative scale

463 mg (88% yield) of the amine 9 were isolated from a 9 mL/0.5 M-scale reductive amination reaction after simple purification on strong acidic cation resin Dowex 50WX8® (Scheme 2). Its structure was confirmed by NMR analysis and its stereochemistry was determined by polarimetry to be (S), as is the case for the metabolic substrate 2,4-DAPDH.

Conclusions

In summary, NAD(P)H-proper amine dehydrogenases have been identified among the biodiversity and particularly within the thermophilic bacteria *Petrotoga mobilis* strain DSM 10674. From the latter, AmDH4 was found active towards the 4-oxopentanoic acid, a γ -ketocarboxylic acid. Optimization of the reaction conditions including temperature and cofactor regeneration system enables the sustainable highly concentrated production of (4S)-4-aminopentanoic acid with high yield (88%) and excellent enantiomeric excess (>99.5%). The robust and easily purifiable enzyme AmDH4 offers a simple access to this valuable optically pure primary amine, already used as a building block for the synthesis of therapeutic molecules.^{25,37} This is the first example of a wild-type enzyme with a related gene catalyzing the reductive amination of ketone without a carboxylic acid moiety in the α or β position. Its robustness makes it a good scaffold for directed evolution, offering significant potential for enzyme improvement.³⁸ Facing the importance of such a reaction in chiral amine synthesis, this discovery will certainly contribute to expanding the synthetic scope of amine dehydrogenase-catalyzed reductive amination in industry. Other natural enzymes with broader substrate range are currently sought in our laboratory to expand this unique class of biocatalysts for the synthesis of primary chiral amines.

Acknowledgements

We are grateful to Pr. Marco Fraaije for giving us a sample of optimized phosphite dehydrogenase and Codexis® for sending us free of charge one gram of glucose dehydrogenase

GDH-105 and CDX-901. We thank A. Perret for helpful discussions and useful comments on the manuscript. This work was supported by grants from Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA) and by a PhD studentship (OM) from the University Paris-Saclay (Evry Val d'Essonne).

References

- D. Ghislieri and N. J. Turner, *Top. Catal.*, 2014, 57, 284–300.
- K. H. Hopmann and A. Bayer, *Coord. Chem. Rev.*, 2014, 268, 59–82; T. C. Nugent and M. El-Shazly, *Adv. Synth. Catal.*, 2010, 352, 753–819.
- G.-W. Zheng and J.-H. Xu, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2011, 22, 784–792.
- A. S. Bommarius, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, 2015, 6, 319–345; B. M. Nestl, B. A. Nebel and B. Hauer, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2011, 15, 187–193; M. T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 12480–12496; N. J. Turner and E. O'Reilly, *Nat. Chem. Biol.*, 2013, 9, 285–288; A. S. Wells, G. L. Finch, P. C. Michels and J. W. Wong, *Org. Process Res. Dev.*, 2012, 16, 1986–1993; R. Wohlgemuth, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2010, 21, 713–724.
- J. M. Choi, S. S. Han and H. S. Kim, *Biotechnol. Adv.*, 2015, 33, 1443–1454.
- H. Kohls, F. Steffen-Munsberg and M. Hohne, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2014, 19, 180–192.
- E. O'Reilly and N. J. Turner, *Perspect. Sci.*, 2015, 4, 55–61; N. J. Turner and M. D. Truppo, in *Sustainable Catalysis*, John Wiley & Sons, Inc., 2013, pp. 63–74.
- M. Höhne and U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem*, 2009, 1, 42–51; J. H. Schrittwieser, S. Velikogone and W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.*, 2015, 357, 1655–1685.
- N. Itoh, A. Matsuyama and Y. Kobayashi, EP1020515 A2, 2002; N. Itoh, C. Yachi and T. Kudome, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2000, 10, 281–290.
- S. Wang and B. Fang, CN103224963 A, 2013.
- R. A. Sheldon, *Multi-step Enz. Catal.*, Wiley Online Library, 2008, pp. 109–135.
- A. S. Bommarius, M. J. Abrahamson and B. Bommarius, US2013309734 A1, 2014.
- M. J. Abrahamson, E. Vasquez-Figueroa, N. B. Woodall, J. C. Moore and A. S. Bommarius, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, 51, 3969–3972.
- M. J. Abrahamson, J. W. Wong and A. S. Bommarius, *Adv. Synth. Catal.*, 2013, 355, 1780–1786.
- S. K. Au, B. R. Bommarius and A. S. Bommarius, *ACS Catal.*, 2014, 4, 4021–4026.
- F. G. Mutti, T. Knaus, N. S. Scrutton, M. Breuer and N. J. Turner, *Science*, 2015, 349, 1525–1529.
- F.-F. Chen, Y.-Y. Liu, G.-W. Zheng and J.-H. Xu, *ChemCatChem*, 2015, 7, 3838–3841.
- L. J. Ye, H. H. Toh, Y. Yang, J. P. Adams, R. Snajdrova and Z. Li, *ACS Catal.*, 2015, 5, 1119–1122.
- G. Grogan and N. J. Turner, *Chem. – Eur. J.*, 2015, 21, 1–9; P. N. Scheller, M. Lenz, S. C. Hammer, B. Hauer and B. M. Nestl, *ChemCatChem*, 2015, 7, 3239–3242.

- 20 N. J. Agard, O. Alvizo, M. A. N. N. Mayo, M. S. Ng, J. N. Riggins and J. C. Moore, *US2015132807 A1*, 2015; H. Chen, J. Moore, J. Collier Steven, D. Smith, J. Nazor, G. Hughes, J. Janey, G. Huismans, S. Novick, N. Agard, O. Alvizo, G. Cope, L. I. N. Yeo Wan, J. Sukumaran and S. N. G. Minor, *WO2013170050 A1*, 2013.
- 21 K. Bastard, A. A. T. Smith, C. Vergne-Vaxelaire, A. Perret, A. Zaparucha, R. De Melo-Minardi, A. Mariage, M. Boutard, A. Debard, C. Lechaplain, C. Pelle, V. Pellouin, N. Perchat, J.-L. Petit, A. Kreimeyer, C. Medigue, J. Weissenbach, F. Artiguenave, V. De Berardinis, D. Vallenet and M. Salanoubat, *Nat. Chem. Biol.*, 2014, **10**, 42–49; T. Davids, M. Schmidt, D. Böttcher and U. T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2013, **17**, 215–220; M. Hohne, S. Schatzle, H. Jochens, K. Robins and U. T. Bornscheuer, *Nat. Chem. Biol.*, 2010, **6**, 807–813; G. Yang and Y. Ding, *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, **22**, 5604–5612; S. Zhao, R. Kumar, A. Sakai, M. W. Vetting, B. M. Wood, S. Brown, J. B. Bonanno, B. S. Hillerich, R. D. Seidel, P. C. Babbitt, S. C. Almo, J. V. Sweedler, J. A. Gerlt, J. E. Cronan and M. P. Jacobson, *Nature*, 2013, **502**, 698–702.
- 22 F. Bordier, M. Stam, E. Darii, S. Tricot, A. Fossey, J. Rohault, A. Debard, A. Mariage, V. Pellouin, J.-L. Petit, A. Perret, D. Vallenet, M. Salanoubat, J. Weissenbach, C. Vergne-Vaxelaire, V. de Berardinis and A. Zaparucha, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2014, **107**, 79–88.
- 23 C. Vergne-Vaxelaire, F. Bordier, A. Fossey, M. Besnard-Gonnet, A. Debard, A. Mariage, V. Pellouin, A. Perret, J.-L. Petit, M. Stam, M. Salanoubat, J. Weissenbach, V. De Berardinis and A. Zaparucha, *Adv. Synth. Catal.*, 2013, **355**, 1763–1779.
- 24 J. Ziegenhorn, M. Senn and T. Bücher, *Clin. Chem.*, 1976, **22**, 151–160.
- 25 M. Otsuka, T. Masuda, A. Haupt, M. Ohno, T. Shiraki, Y. Sugiura and K. Maeda, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 838–845.
- 26 R. Caspi, T. Altman, K. Dreher, C. A. Fulcher, P. Subhraveti, I. M. Keseler, A. Kothari, M. Krummenacker, M. Latendresse and L. A. Mueller, *Nucleic Acids Res.*, 2012, **40**, D742–D753; M. Kanehisa, S. Goto, Y. Sato, M. Furumichi and M. Tanabe, *Nucleic Acids Res.*, 2011, gkr988.
- 27 A. Kreimeyer, A. Perret, C. Lechaplain, D. Vallenet, C. Médigue, M. Salanoubat and J. Weissenbach, *J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 7191–7197.
- 28 N. Fonknechten, A. Perret, N. Perchat, S. Tricot, C. Lechaplain, D. Vallenet, C. Vergne, A. Zaparucha, D. Le Paslier, J. Weissenbach and M. Salanoubat, *J. Bacteriol.*, 2009, **191**, 3162–3167.
- 29 S. Fukuyama, H. Mihara, R. Miyake, M. Ueda, N. Esaki and T. Kurihara, *J. Biosci. Bioeng.*, 2014, **117**, 551–556.
- 30 R. Somack and R. N. Costilow, *J. Biol. Chem.*, 1973, **248**, 385–388; T. C. Stadtman, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 1973, **38**, 413–448.
- 31 D. Zhang, X. Chen, R. Zhang, P. Yao, Q. Wu and D. Zhu, *ACS Catal.*, 2015, 2220–2224.
- 32 C. Guérard-Hélaine, V. de Berardinis, M. Besnard-Gonnet, E. Darii, M. Debacker, A. Debard, C. Fernandes, V. Hélaine, A. Mariage, V. Pellouin, A. Perret, J.-L. Petit, M. Sancelme, M. Lemaire and M. Salanoubat, *ChemCatChem*, 2015, **7**, 1871–1879; T. Reignier, V. de Berardinis, J. L. Petit, A. Mariage, K. Hamze, K. Duquesne and V. Alphand, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 7793–7796.
- 33 S. Elleuche, C. Schröder, K. Sahm and G. Antranikian, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2014, **29**, 116–123.
- 34 B. R. Bommarius, M. Schurmann and A. S. Bommarius, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 14953–14955.
- 35 C. Rodríguez, G. de Gonzalo and V. Gotor, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2012, **74**, 138–143; R. Wichmann and D. Vasic-Racki, in *Technology Transfer in Biotechnology: From lab to Industry to Production*, ed. U. Kragl, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2005, pp. 225–260; H. Zhao and W. A. van der Donk, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2003, **14**, 583–589.
- 36 C. E. Paul and F. Hollmann, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, **100**, 4773–4778; S. A. Löw, I. M. Löw, M. J. Weissenborn and B. Hauer, *ChemCatChem*, 2016, **8**, 911–915.
- 37 K. Sumi, Y. Inoue, M. Nishio, Y. Naito, T. Hosoya, M. Suzuki and H. Hidaka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, **24**, 831–834; N. S. Trotter, M. A. Brimble, P. W. R. Harris, D. J. Callis and F. Sieg, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 501–517.
- 38 U. T. Bornscheuer, G. W. Huismans, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore and K. Robins, *Nature*, 2012, **485**, 185–194; N. J. Turner, *Nat. Chem. Biol.*, 2009, **5**, 567–573.

A family of Native Amine Dehydrogenases for the Asymmetric Reductive Amination of Ketones

Ombeline Mayol¹, Karine Bastard¹, Lilian Belot², Amina Frese², Johan P. Turkenburg², Jean-Louis Petit¹, Aline Mariage¹, Adrien Debard¹, Virginie Pellouin¹, Véronique de Berardinis¹, Anne Zaparucha¹, Gideon Grogan^{*2}, Carine Vergne-Vaxelaire^{*1}

¹ Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, CEA, CNRS, Univ Evry, Université Paris-Saclay, 91057 Evry, France

² York Structural Biology Laboratory, Department of Chemistry, University of York, Heslington, York, YO10 5DD, UK.

The Asymmetric Reductive Amination of ketones enables the one-step synthesis of chiral amines from readily available starting materials. We have discovered a family of native NAD(P)H-dependent Amine Dehydrogenases (nat-AmDHs) competent for the asymmetric reductive amination of aliphatic and alicyclic ketones, adding significantly to the biocatalytic toolbox available for chiral amine synthesis. Studies of ketone and amine substrate specificity and kinetics reveal a strong preference for aliphatic ketones and aldehydes, with activities of up to 614.5 mU mg⁻¹ for cyclohexanone with ammonia and 851.3 mU mg⁻¹ for isobutyraldehyde with methylamine as amine donor. Crystal structures of three nat-AmDHs (AmDH4, *MsmeAmDH* and *CfusAmDH*) reveal the active site determinants of substrate and cofactor specificity and enable the rational engineering of AmDH4 for generated activity towards pentan-2-one. Analysis of the 3D-catalytic site distribution among bacterial biodiversity revealed a superfamily of divergent proteins with representative specificities ranging from amino acid substrates to hydrophobic ketones.

The asymmetric reductive amination of ketones is one of the most significant reactions in the industrial pharmaceutical synthesis of chiral amines. Conventional catalytic methods usually require expensive transition metal complexes, which are difficult to completely remove, or chiral ligands, rendering industrial processes ultimately non-sustainable. Given the urgent demand for alternative catalysts,¹ enzymatic methods of amine synthesis have been extensively investigated in recent years.^{2, 3, 4, 5, 6} The asymmetric reductive amination of ketones can be accomplished using engineered Amine Dehydrogenases (AmDHs), firstly developed from native amino-acid dehydrogenases,^{7, 8, 9, 10, 11, 12, 13} and imine reductases (IREDs), which catalyze the reduction of preformed secondary imines, but have been shown to enable the reductive amination of ketones when supplied with large excesses of amine precursor.¹⁴ In addition, Codexis have engineered opine dehydrogenases (OpDHs), which natively couple α-amino acids with α-keto acids, to broaden their substrate range and convert non-functionalized ketones to chiral amines with ammonia.¹⁵ Native enzymes catalyzing this activity have been reported first from *Streptomyces virginiae* by Itoh and coworkers, but with low enantioselectivity¹⁶ and later by Wang *et al.* in crude extracts of *Pseudomonas kilonensis* and *P. balearica*,¹⁷ but the genes encoding the activities were not identified. More recently, a subset of IREDS has also been shown to catalyze the reductive amination of selected ketones with amine partners provided in an equimolar ratio,^{18, 19} but this was primarily directed toward synthesis of secondary amines, as the activity with ammonia as a donor was low. These ‘reductive aminases’ (RedAms) catalyze both the formation of the imine intermediate and its subsequent reduction.

We have recently used as a first reference set the sequence of a (*2R, 4S*)-2,4-diaminopentanoate dehydrogenase from *Clostridium sticklandii*²⁰ to identify among bacterial biodiversity the first native AmDHs (4OP-AmDH) catalyzing the amination of 4-oxopentanoic acid (4OP) with ammonia, in addition to their metabolic product (*2R*)-2-amino-4-oxopentanoic acid (2A4OP).²¹ These enzymes were inactive towards ketones such as acetophenone, cyclohexanone or pentan-2-one, suggesting that a carboxylic acid was a prerequisite for activity. We have now used the 4OP-AmDH sequences in turn to further screen the available sequences in the bacterial biodiversity in order to discover additional enzymes with native activity towards ketones and aldehydes without a carboxylic acid group. We report here the discovery of five native AmDHs (nat-AmDHs) with significant activities toward such substrates, together with their application to the semi-preparative scale synthesis of four amines. The 3D-structure determination of three of them provides insight into the catalytic mechanism of reductive amination by this newly characterized family of AmDHs, and expands the biocatalytic toolbox of available enzymes for asymmetric reductive amination reactions.

Results and Discussion

Screening of bacterial biodiversity

As 4OP-AmDHs do not share significant sequence homology with the engineered AmDHs and RedAms (Supplementary Fig. S10), they were used to search for distant homologs with activity toward non-functionalized ketones, using a sequence-driven approach.²² 23 candidate enzymes were screened as cell-free extracts against two known substrates of 4OP-AmDHs [(*2R,4S*)-2,4-diaminopentanoate (2,4-DAP) and 4-aminopentanoate (4-AP)], and also three non-functionalized amines (pentan-2-amine, α -methylbenzylamine and cyclohexylamine) (Supplementary Section 2.1, 3.1 and Table S1). One enzyme from *Mycobacterium smegmatis* (*MsmeAmDH*, Uniprot ID: A0A0D6I8P6) displayed an activity of 6 mU mg⁻¹ against cyclohexylamine, although no activity was detected against 2,4-DAP and 4-AP. This suggested this target has a biological role far from those of diaminopentanoate dehydrogenases constituting our first reference set.²¹ No activity was detected against α -methylbenzylamine. A 100 μ L scale reaction on pentan-2-one and cyclohexanone using a cofactor regeneration system and purified enzyme confirmed the presence of the expected amine (Supplementary Section 6.1). Further homologs with amino-acid sequence identity ranging from >70 % to 35 % were produced as purified enzymes and screened against the same substrates (Supplementary Section 2.1, 2.3, 6.1, Fig.S1). All those with identity above 38 % displayed AmDH activity and were named nat-AmDH (Table 1).

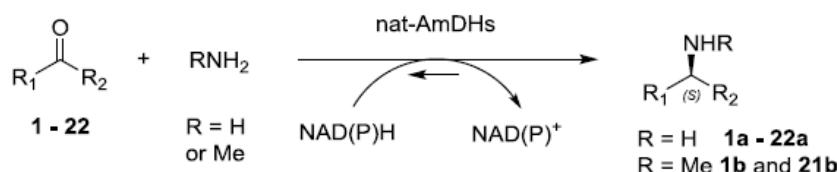
Carbonyl acceptor and amine donor spectra

Four purified nat-AmDHs (*MsmeAmDH*, *CfusAmDH*, *MicroAmDH* and *ApauAmDH*) (Supplementary Section 2.3, Fig. S2) were screened against a range of carbonyl substrates (**1 – 22**) with ammonia as the amine donor and NADH or NADPH as reducing agents. AmDH activity was assayed in the reductive amination direction by monitoring the spectrophotometric decrease in [NAD(P)H] (Table 1A). *MsmeAmDH*, *CfusAmDH* and *MicroAmDH* showed a similar carbonyl acceptor spectrum, with a preference for cycloalkanones and aliphatic aldehydes, the latter being the only type of substrates transformed by *ApauAmDH*. Interestingly, branched acyclic substrates seemed to be superior substrates to linear ones. Little or no activity was detected against aromatic ketones such as acetophenone, 4-phenylbutan-2-one, phenoxypropan-2-one or 4-methylphenylacetone, which were the preferred substrates of engineered AmDHs, themselves with little or no activity against

cycloalkanones.^{11, 12, 23, 8} *MsmeAmDH*, *CfusAmDH* and *MicroAmDH* accepted both NADH and NADPH, but the highest specific activities for each cofactor were substrate-dependent. *ApauAmDH* was specific for NADH. Importantly, no conversion to alcohol product could be detected for any of the tested enzymes with carbonyl substrates in the absence of ammonia.

These purified nat-AmDHs were then tested with a limited number of amine donors (methylamine, ethylamine, benzylamine, cyclopentylamine and 3-pantanamine) with cyclohexanone **1** and isobutyraldehyde **21** as carbonyl acceptors. 100 equivalents of amine were used to maximize the chance of identifying hits. Only methylamine was accepted as an alternative amine donor, particularly for *MicroAmDH*, which showed even better specific activity with methylamine than ammonia (Table 1B). The activity with methylamine and **1** (10.1 - 90.4 mU mg⁻¹) distinguishes these enzymes from engineered AmDHs, which typically displayed strict specificity for ammonia as the amine nucleophile, but was not as high as that recorded for *AspRedAm* towards the same substrates.¹⁸ A pH study revealed that the specific activity of *MicroAmDH* was only slightly dependent on pH, with 70 % of the activity maintained between pH 6.7 and 12.2. The specific activity was also of the same order of magnitude, with either 50 or 2 equivalents of methylamine (Supplementary Section 3.2, Fig. S3). These results suggest that the activity was independent of the amount of preformed imine in solution,²⁴ thus reflective of the catalytic formation of the imine by *MicroAmDH*, in a mode similar to that of RedAms.

Table 1. Carbonyl/amine substrate spectrum of nat-AmDHs identified in this study. **1A** Specific activities of purified nat-AmDHs toward carbonyl-containing compounds **1** to **22** with ammonia as amine source. **1B** Specific activities of purified nat-AmDHs toward **1** and **21** with methylamine as amine source.



Name	Uniprot identifier	Organism	Uniprot reported annotation	% identity vs <i>MsmeAmDH</i>
<i>MsmeAmDH</i>	A0A0D6I8P6	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Dihydrodipicolinate reductase	100
<i>MvacAmDH</i>	K0UKT5	<i>Mycobacterium vaccae</i>	Dihydrodipicolinate reductase	89.9
<i>MycoAmDH</i>	A0A101AWU7	<i>Mycobacterium sp.</i>	Dihydrodipicolinate reductase	75.6
<i>MicroAmDH</i>	C3UMY1	<i>Microbacterium sp.</i>	Dihydrodipicolinate reductase	66.6
<i>ApauAmDH</i>	E3CZE3	<i>Aminomonas paucivorans</i>	Dihydrodipicolinate reductase	38.9
<i>CfusAmDH</i>	S9Q235	<i>Cystobacter fuscus</i>	Uncharacterized protein	38.2

A

	substrate	product	Specific activities (mU mg ⁻¹)							
			<i>MsmeAmDH</i>		<i>MicroAmDH</i>		<i>CfusAmDH</i>		<i>ApauAmDH</i>	
			NADH	NADPH	NADH	NADPH	NADH	NADPH	NADH	NADPH
cyclohexanone	1	1a	196.2	25.1	614.5	388.6	135.9	35.1	9.8	-
2-methylcyclohexanone	2	2a	37.3	175.2	337.0	252.6	11.4	14.8	-	-

3-methylcyclohexanone	3	3a	38.0	160.9	160.7	206.5	19.7	37.0	-	-
4-methylcyclohexanone	4	4a	9.7	85.2	60.1	170.1	10.9	20.4	-	-
3,5-dimethylcyclohexanone	5	5a	-	9.7	-	61.6	-	-	-	-
cyclopentanone	6	6a	2.3	5.6	14.9	60.6	23.4	24.2	-	-
2-methylcyclopentanone	7	7a	-	63.2	31.9	90.3	5.5	8.8	-	-
3-methylcyclopentanone	8	8a	-	7.7	-	23.3	8.2	13.9	-	-
1-cyclohexylethanone	9	9a	-	2.1	-	64.0	-	-	-	-
2-cyclohexen-1-one	10	10a	2.3	7.4	34.2	37.1	2.5	2.1	-	-
1-indanone	11	11a	-	-	-	12.0	-	-	-	-
pentan-3-one	12	12a	-	48.1	-	192.0	1.8	3.4	-	-
hexan-3-one	13	13a	-	6.8	-	28.1	-	-	-	-
pentan-2-one	14	14a	-	9.0	-	51.2	3.1	6.4	-	-
3-methyl-butan-2-one	15	15a	18.6	125.8	34.2	245.6	68.2	61.8	-	-
3-buten-2-one	16	16a	2.7	7.9	-	-	-	-	-	-
3-hydroxybutanone	17	17a	-	177.7	-	324.4	25.1	42.4	-	-
4-hydroxy-2-butanone	18	18a	-	10.3	-	11.0	1.8	3.6	-	-
pentanal	19	19a	-	26.8	-	57.8	49.5	72.9	89.1	-
2-methylbutanal	20	20a	16.4	75.2	159.4	97.6	231.8	76.7	129.6	-
isobutyraldehyde	21	21a	119.2	88.1	541.0	269.8	556.5	43.0	51.5	-
benzaldehyde	22	22a	-	3.0	-	-	-	-	6.43	-

-: no activity detected; no activity was detected for 2-cyclopenten-1-one, octan-3-one, 4-phenyl-2-butanone, phenoxy-2-propanone, acetophenone, 4-methylphenylacetone, heptanal for these tested enzymes; specific activity determined by spectrophotometric assay (see Methods); reaction conditions: 2 M NH₄HCO₃/NH₄OH pH 9.5, NADH or NADPH (0.2 mM), carbonyl-containing compound (10 mM), purified enzymes (0.01 – 0.5 mg/ml).

B

substrate	product	Specific activity (mU mg ⁻¹)				
		<i>MsmAmDH</i>	<i>MicroAmDH</i>	<i>MvacAmDH</i>	<i>CfusAmDH</i>	<i>ApauAmDH</i>
cyclohexanone	1	1b	10.1	90.4	12.6	nd
isobutyraldehyde	21	21b	144.5	851.3	262.6	150.2

Specific activity determined by spectrophotometric assay (see Methods); reaction conditions: 50 mM TRIS.HCl buffer pH 9.5, NADH/NADPH (0.1 mM each), carbonyl-containing compound (5 mM), MeNH₂ (500 mM), purified enzyme (0.02 – 0.2 mg/ml).

Biochemical characterization

According to gel filtration experiments, *MsmeAmDH*, *CfusAmDH* and *MicroAmDH* are all homodimers (Supplementary Section 2.4). Their kinetic constants were evaluated for both NADH and NADPH, using the substrates **1**, **2** and **21** (Supplementary Section 4, Fig. S4-S6). The results (Table 2) confirmed that these enzymes accept both nicotinamide cofactors, although *MsmeAmDH* and *CfusAmDH* are about 2.5 times more effective with NADPH than NADH. The preference is much stronger for *MicroAmDH* with a k_{cat}/K_m of $90.3 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ for NADPH compared to $5.9 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ for NADH. This promiscuous behavior appears to be different to that of Phe-AmDH or Leu-AmDH and RedAms, which are strictly dependent on NADH and NADPH respectively. The K_m values obtained for the amine donor were of the same order to that described for engineered AmDH.¹¹ The affinity for MeNH₂ for *MicroAmDH* was about eight times higher than that for NH₃. *MsmeAmDH* displayed higher NADPH-catalytic efficiency toward **1** than **2** and **21**, and *CfusAmDH* displayed similar NADH-catalytic efficiency toward **21** and **1**.

Table 2. Kinetic data of *MsmeAmDH*, *CfusAmDH* and *MicroAmDH*

Substrate	<i>MsmeAmDH</i>			<i>CfusAmDH</i>			<i>MicroAmDH</i>		
	k_{cat} (V_{max})	K_m (S_{50})	k_{cat}/K_m	k_{cat} (V_{max})	K_m (S_{50})	k_{cat}/K_m (V_{max}/S_{50})	k_{cat} (V_{max})	K_m (S_{50})	k_{cat}/K_m (V_{max}/S_{50})
NADH (1 , NH ₃)	0.56	0.29	1950	0.093	0.059	1580	2.1*	0.35*	5920*
NH ₃ (1 , NADH)	(827)	(937)		0.097	365	0.26	1.8*	1720*	1.1*
MeNH ₂ (21 , NADH)	-	-	-	-	-	-	0.86**	201**	4.3**
1 (NADH, NH ₃)	(625)	(0.96)		0.10	0.54	193	-	-	-
2 (NADH, NH ₃)	(343)	(4.1)		-	-	-	-	-	-
21 (NADH, NH ₃)	(695)	(0.29)		0.51	1.76	288	1.5	4.72	308
NADPH (1 , NH ₃)	0.27	0.056	4740	0.042	0.01	4230	2.0*	0.022	90300*
NH ₃ (1 , NADPH)	0.29	392	0.75	0.036	79	0.45	-	-	-
1 (NADPH, NH ₃)	0.44	0.23	1930	0.051	0.72	70	-	-	-
2 (NADPH, NH ₃)	0.33	0.99	331	-	-	-	-	-	-
21 (NADPH, NH ₃)	0.31	0.39	787	(136)	(0.34)	-	-	-	-

-: not determined. *Reactions were performed with 21 carbonyl acceptor. **Reactions were performed in 50 mM carbonate buffer pH 9 instead of ammonium buffer pH 9. k_{cat} expressed in s^{-1} , V_{max} in $\mu\text{U mg}^{-1}$, K_m in mM, k_{cat}/K_m in $\text{s}^{-1} \text{ M}^{-1}$

Stereoselectivity

Amines were obtained with e.e.s of between 68 % to ≥ 98.5 %, depending on the substrate and the enzyme (Supplementary Section 6.2 and Table S4). As for 4OP-AmDH, the (*S*)-amine was preferentially formed, in contrast to engineered AmDH,⁷ AspRedAm¹⁸ and IRED-Sr,²⁵ each of which gave the (*R*)- enantiomer in the case of reaction with ammonia. From this point of view, nat-AmDHs are comparable with IRED IR_7, IR_10-11, IR_15, IR_20 and IR_25 reported by Wetzl *et al.*¹⁴ In the case of methyl-substituted cyclohexanones **2** and **3**, the (*R*)- configuration was only slightly preferentially transformed.

A new family of AmDHs

Our discovered native AmDHs are evolutionary unrelated to engineered AmDHs, IREDs and RedAms as illustrated by an heatmap based on sequence identity (Supplementary Section 8.3 and Fig. S10-S11). To analyse the sequence diversity and relationships between proteins of this new family, we created a sequence similarity network (SSN) built with 5313 protein homologs to AmDH4, *Cfus*AmDH and *Msme*AmDH (Fig. 1, Supplementary Section 8.4 and Fig. S12), in which the most similar proteins (above 40 % of sequence identity) are connected. *Msme*-, *Myco*-, *Mvac*- and *Micro*AmDH are highly related and are found in the same cluster as *Cfus* and *Apau*AmDH, but in a different sub-cluster. By contrast, 4OP-AmDHs are found in a distant cluster (Fig. 1A). Over the family, 70 % of the proteins are annotated as “Dihydrodipicolinate reductase” (EC 1.17.1.8). Interestingly, the experimentally validated 4-hydroxytetrahydrodihydrodipicolinate reductase DapB²⁶ is not present in this set, suggesting that nat-AmDHs have been probably mis-annotated due to the presence of similar NADPH domain (Figure S12B). About 1 % are annotated as “2,4-diaminopentanoate dehydrogenase” (EC 1.4.1.12), including the experimentally validated ones (*ord* genes, Uniprot ID: C1FW05 and E3PY99) (Fig. 1B).

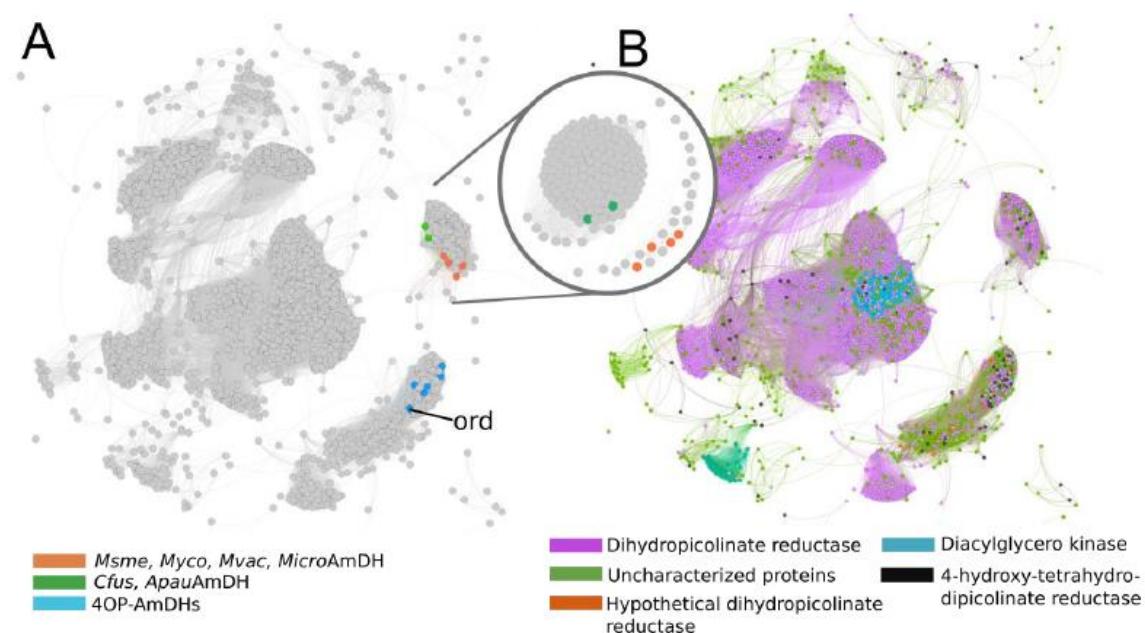


Figure 1. Sequence similarity network (SSN) of the new AmDH family. Edges between proteins (represented by nodes) are represented if the alignment score between two proteins is above 62, which correspond to 30 % of sequence identity. Mapping of : (A) Our discovered native AmDHs. The two only proteins with experimental data listed in Swissprot is indicated on the graphics (*ord* for 2,4-diaminopentanoate dehydrogenase). The circle on the right shows a zoom on the group containing nat-AmDHs. The SSN have been cut here for an alignment score of 80 (i.e. at least 40 % of sequence identity). (B) Annotations retrieved from Uniprot.

The lack of knowledge about the mechanism of reaction of these enzymes, combined with the biocatalytic interest of AmDHs, prompted us to examine the structure of some of them using X-ray crystallography. Our efforts focused on AmDH remote homologs, *i.e.* belonging to different SSN clusters or subclusters, but belonging to the same phyla (Fig. S12a): AmDH4, *Msme*AmDH and *Cfus*AmDH.

Structure and mutagenesis of nat-AmDHs

The structure of AmDH4 was determined in two forms, in which there were one monomer ('open') and two dimers ('open/closed') within the asymmetric units respectively (Fig 2A and Supplementary Section 7 and Table S5). The AmDH4 monomer consisted of two domains; an N-terminal Rossmann fold domain and a six-strand C-terminal sheet domain, the whole structure bearing a superficial resemblance to dihydropicolinate reductase (PDB ID: 5KT0) and some natural amino acid dehydrogenases such as *meso*-diaminopimelate dehydrogenases (DAPDHs) (PDB ID: 1F06),²⁷ with which AmDH4 do not share sequence homology. Within these structures, the Rossmann fold domain was well-conserved, but significant differences were observed in the C-terminal beta-sheet domain, which featured more and longer strands than in DAPDHs, and also in the structure of the loops that connect the strands. The structure with two dimers revealed that one monomer within each dimer was significantly more closed over the cofactor, changing the nature of the active site significantly (Fig. 2B). A similar domain closure upon substrate binding has been recognized as important for catalysis in DAPDHs.²⁸

A model of the ternary complex was constructed using the natural product 2,4-DAP in the 'closed' conformation of AmDH4 (Fig. 2C, Supplementary Section 9.1). The active site of features residues Glu102, Val134, Asn135, Arg161, Asn163, Phe168, Val172, Gln176, His197, Ile198, His264, Gln266, Gly299 and Thr303. Although there are many significant differences between the active sites of DAPDHs and AmDH4, a conserved feature is Glu102, which is replaced by Asp90 in *m*-DAPDH (PDB ID: 1F06), which forms a close interaction with the amine of the *meso*-diaminopimelate (*m*-DAP) substrate. This is strongly suggestive of a role for Asp90 in the activation of ammonia for the reductive amination reaction in this enzyme; a role which can also be considered for Glu102 in AmDH4 (Fig. 2D). Mutation of Glu102 to alanine led to a 1800-fold decrease in the catalytic efficiency compared to the wild type, supporting this hypothesis (Fig. 2E). The K_m for the substrate 2A4OP was only slightly affected by this mutation, however the K_m for ammonia was increased 15-fold, suggestive again of the importance of Glu102 for the fixation of NH₃. Mutation of His197, which in the model also forms a hydrogen bond with reacting amine (Fig. 2C), resulted in a variant, H197A, with greatly reduced catalytic efficiency for the substrate 2A4OP (39.9 vs 1770 s⁻¹.mM⁻¹) whereas K_m was only a little modified (Fig. 2E). We speculate that the role of His197 in AmDH4 is also to bind ammonia, supported by the absence of saturation for the mutant H197A and modelling studies with the docked keto derivative and NH₃ (Fig. 2D). This model suggests that, when ammonia is present, the 2A4OP is forced to move closer to the bottom of the active site, its carboxylate being then maintained through electrostatic interactions with Arg161, Asn163 and His264. Indeed, variants R161M, N163V, H264L displayed highly reduced activities toward 2,4-DAP (Supplementary Section 2.2 and 3.3, Table S2-S3), data supported by energy and ranking of poses issues from docking 2,4-DAP on AmDH4 variants (Supplementary Section 9.2 and Table S8). Gln266, situated near the bottom of the active site, and Phe198 which belongs to the flexible lid, completely locks the active site for catalysis.

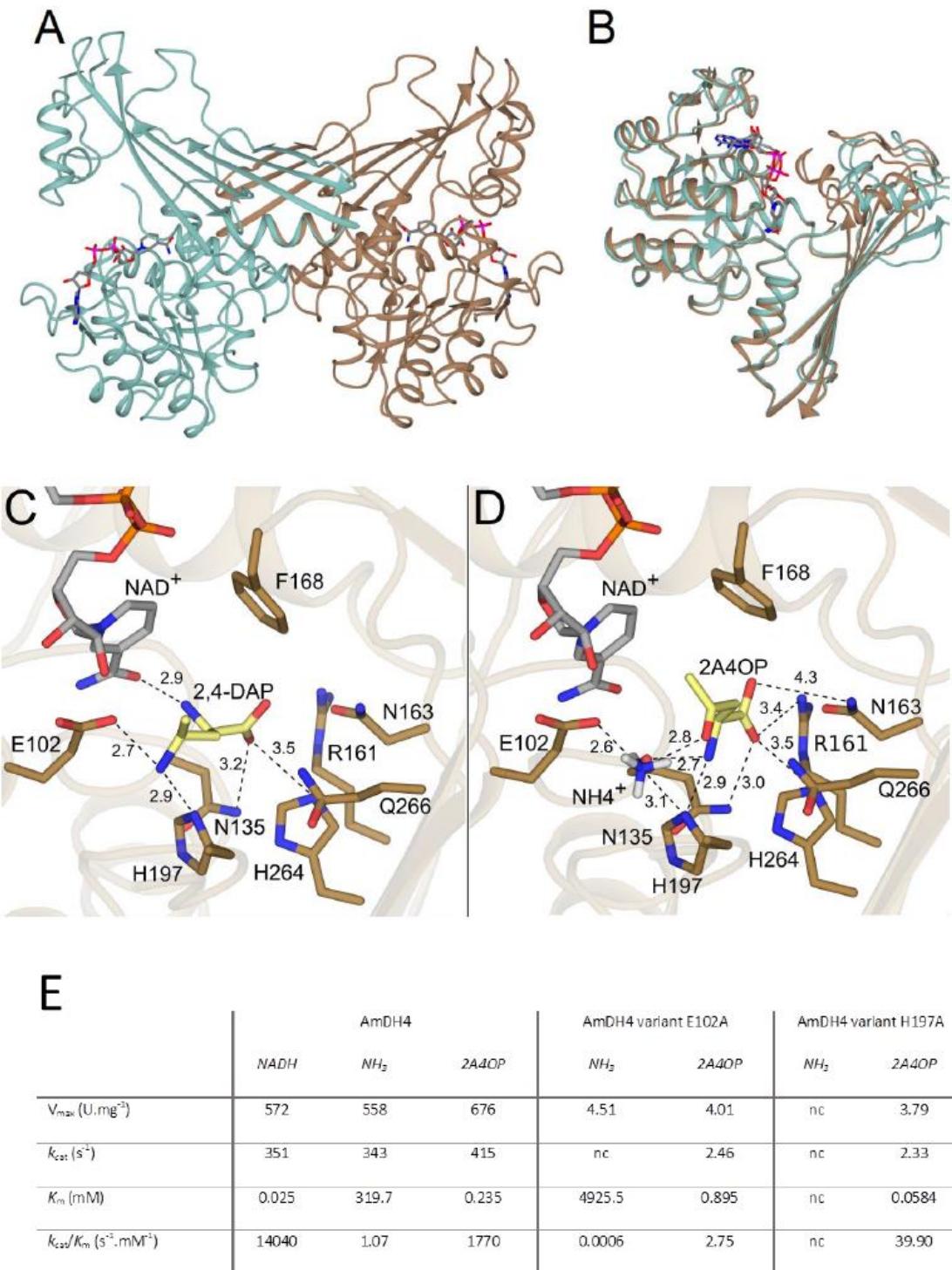


Figure 2. Structural and mutagenesis data of AmDH4. **A:** Structure of dimer of AmDH4 consisting of one open and one closed form; **B:** Superimposition of open and closed monomers of AmDH4 in blue and brown respectively; **C:** Active site within closed form of AmDH4 with product 2,4-DAP modeled

into it. Selected interactions are shown with black dashed lines; distances are in Ångstroms; **D**: Model of AmDH4 (closed form) in complex with NAD⁺, ammonia and substrate 2A4OP. **E**: Kinetics parameters of AmDH4, AmDH4 variant E102A and AmDH4 variant H197A. nc = not calculated due to potential non-saturation of the active site by ammonia (8 M) due to solubility issues.

The structures of *CfusAmDH* and *MsmeAmDH* also featured dimers (Supplementary Section 7, Table S6 and Fig.S9) as suggested by gel filtration experiments. In each monomer of *CfusAmDH*, electron density for the cofactor, NADP⁺ and a ketone substrate, cyclohexanone **1**, each of which had been included in the protein solution for crystallization, was apparent (Fig. 3A). The structure of *MsmeAmDH* was also obtained with NADP⁺ at the active site, and, although the crystals of the enzyme were grown in the presence of racemic 2-methylcyclohexanone **2**, density consistent with (2S)-2-methylcyclohexanone was observed at the active site (Fig. 3B). The structures of *CfusAmDH* and *MsmeAmDH* were closely related to that of AmDH4, with the monomers of each enzyme were trapped in the ‘closed’ form, providing further evidence for this conformation as crucial in the catalytic cycle of this class of dehydrogenases. The active sites of *CfusAmDH* and *MsmeAmDH* resembled that of AmDH4 in that a cage is formed for the substrate by the nicotinamide ring of NADP⁺ and an aromatic residue, either Tyr168 (*CfusAmDH*) or Trp164 (*MsmeAmDH*) on the other. Tyr173 (*CfusAmDH*) and Phe169 (*MsmeAmDH*) were present in place of Phe198 in AmDH4, closing over the substrates to complete the hydrophobic pocket as the gates to the active sites. In each case, the carbonyl group of the cyclohexanone substrate interacts with the side chain of a glutamate residue Glu108 (Glu104), homologous with Glu102 in AmDH4. In the ternary complexes of both enzymes with NADP⁺ and their cyclohexanone substrates, and in the absence of amine, the coordination of the ketone carbonyl to Glu108 or Glu104 holds the electrophilic carbon of these substrates between 4.0 and 4.2 Å from the C4 atom of NADP⁺, from which hydride is delivered. The pucker in the cyclohexanone rings also militates against nucleophilic attack of hydride at this carbon atom, and appears to explain why neither *CfusAmDH* nor *MsmeAmDH* is able to reduce **1** or **2** respectively to cyclohexanol products. As expected, neither enzyme featured a residue homologous to Arg161 in AmDH4, as neither was active towards ketone substrates with a carboxylic acid group.

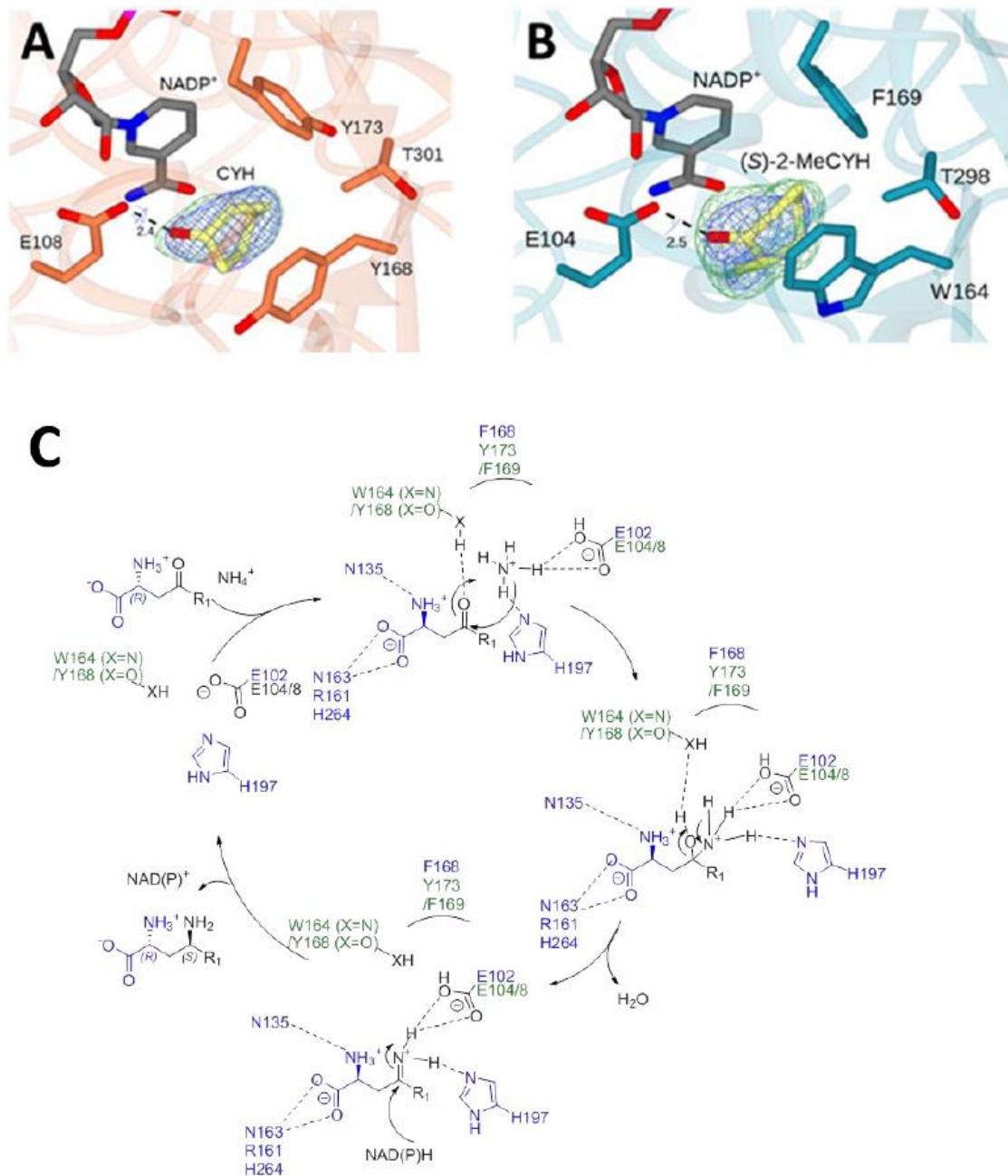


Figure 3. Structure of active site of *MsmeAmDH* and *CfusAmDH* and proposed general mechanism.
A: Structure of active site of *CfusAmDH* complexed with NADP⁺ and **1** (CYH). **B:** Structure of active site of *MsmeAmDH* complexed with NADP⁺ and **(S)-2** [(*S*)-2-MeCYH]. In each case electron density in green and blue corresponds to the 2Fo-Fc and Fo-Fc²⁹ map at levels of 1σ and 3σ respectively. The latter were obtained prior to modelling of the ligands. Selected interactions are shown with black dashed lines; distances are in Ångstroms. **C:** proposed general mechanism. Residues and the functional prerequisites of the substrate for AmDH4 are indicated in blue, residues implicated in *CfusAmDH* and *MsmeAmDH* in green and the general mechanism in black.

The structures of these AmDH enzymes, coupled with kinetic analysis of mutants (Supplementary Section 3.4, 9.7 and Table S3) and modelling studies allow to propose a mechanism for AmDH activity (Fig. 3C). Upon introduction of ammonia, the substrate is forced to move and the glutamate becomes well positioned to activate ammonia. The latter attacks the reactive carbonyl secured by either H-bond donors provided by Tyr168 (*CfusAmDH*) or Trp164 (*MsmeAmDH*) (Supplementary Section 9.5 and Fig. S16), or by dipole-dipole interactions via Gln266 (AmDH4, Fig. 2D) to form a carbinolamine intermediate. Thus a mechanistic convergence between this enzymatic reductive amination reaction, the mechanism of fungal RedAms,¹⁸ and also the imine formation reaction catalyzed within the Pictet-Spenglerase enzyme norcoclaurine synthase³⁰ may be hypothesized.

Engineering AmDH4 for the conversion of 2-pentanone

The structure of the active site of AmDH4 suggested that substitutions of polar residues Asn135, Arg161, Asn163 and His264 for non-polar ones may alter substrate specificity with regard to the recognition of non-carboxylate substituted substrates such as pentan-2-one. An activity was detected against pentan-2-one **14** for mutant containing at least the mutation R161M, and a specific activity of 104.8 mU.mg⁻¹ of enzyme was obtained for the quadruple mutant N135V/N163V/R161M/H264L (Supplementary Section 3.4 and Table S3). A model of this mutant with substrate pentan-2-one **14** and NH₄⁺ docked into the engineered active site showed a preferential positioning of this substrate with favorable H-bond distances between H197/ Q266 and the carbonyl function (3.1 and 3.2 Å respectively). As with the wild-type, Glu102 is positioned favorably for the activation of ammonia (Supplementary Section 9.3 and Fig. S14). The (S)-stereochemistry was unchanged as confirmed by GC analysis (Supplementary Section 6.3 and Fig. S8).

Structural analysis of homolog active sites

Using the Active Site Modeling and Clustering method (ASMC),³¹ 2029 members of the newly defined family were modeled, using AmDH4, *CfusAmDH* and *MsmeAmDH* as structural templates. Residues defining the “Reference Active Site” were chosen according to crystallographic and biochemical data obtained in this study on AmDH4 and are represented by the 3D-positions *P1* to *P20* (Supplementary Section 9.4 and Fig. S15). Figure 4 illustrates the resulting Active Site hierarchical tree and the five groups defined, on which experimental activities mentioned in this study and in Mayol *et al.*,²¹ are mapped. The G1 group contains enzymes for which 2,4-DAP activity could not be detected whereas the G2 group is populated with enzymes characterized as diaminopentanoate dehydrogenases, including AmDH4 (for further experimental screening of 2,4-DAP activity, see Supplementary Section 8.5, Table S7 and Fig. S13). Nat-AmDHs are found in the G3 and G4 groups respectively, whereas the G5 group is mainly composed of remote homologs. The three dimensional superposition of active sites belonging to the same group are projected linearly to form conservation patterns represented by logo sequences.

The catalytic glutamate (in position *P3* of the logo) in the three solved structures is highly conserved in G1 to G4 proteins supporting its critical catalytic role for enzymes with AmDH activity. Its good orientation may be secured by the conserved serine (*P1*). The absence of Glu in *P3* and Ser in *P2* in G5 group suggests a divergent activity for enzymes of this cluster. They might not perform imine formation but might use NADP as threonine (*P20*), which intercats with the nicotinamide moiety is highly conserved. The histidine hypothesized to participate in the stabilization of ammonia in AmDH4 (in *P14*), is present only in the G1 and G2 groups. It is hypothesized this additional stabilization

residue is not required in the G3 and G4 groups, where the volumes of the modeled active site pockets are much smaller, due to the presence of Trp in P7, Tyr/Trp in P9, Tyr/Phe in P11 and Tyr/Phe in P16 leaving no other positioning possibilities for ammonia (Supplementary Section 9.5 and Fig. S16). With regard to the postulated substrates for the different clusters, Arg161 of AmDH4 (P8), which is suggested to form an electrostatic interaction with the carboxylate of 2,4-DAP/4-AP, is conserved in G1 and G2, suggesting that metabolic substrates for enzymes of these groups would also bear a carboxylic acid function. Its absence in groups G3 and G4 suggest that a compound with a charged group cannot be transformed by enzymes from either of these two clusters, such as *CfusAmDH* (G3) and *MsmAmDH* (G4). The lack of activity of these enzymes toward α -amino acids or 4OP-like substrates corroborates this hypothesis. It should be noted that His in P14 is highly conserved in G1 as in G2, suggesting that G1 proteins might also use ammonia, but on another carbonyl donor than 4OP or 2A4OP. Nine proteins from G1 were tested toward these two substrates, but none of them showed activity, confirming our hypothesis (Table S7). The structural analysis of nat-AmDHs allows to define the following Prosite motif³² [ST]-x(23)-E-x(30)-G-x(28)-[WYF]-N-x(3)-[YF]-x(133)-T which can be used as sequence signature to identify proteins of this family.

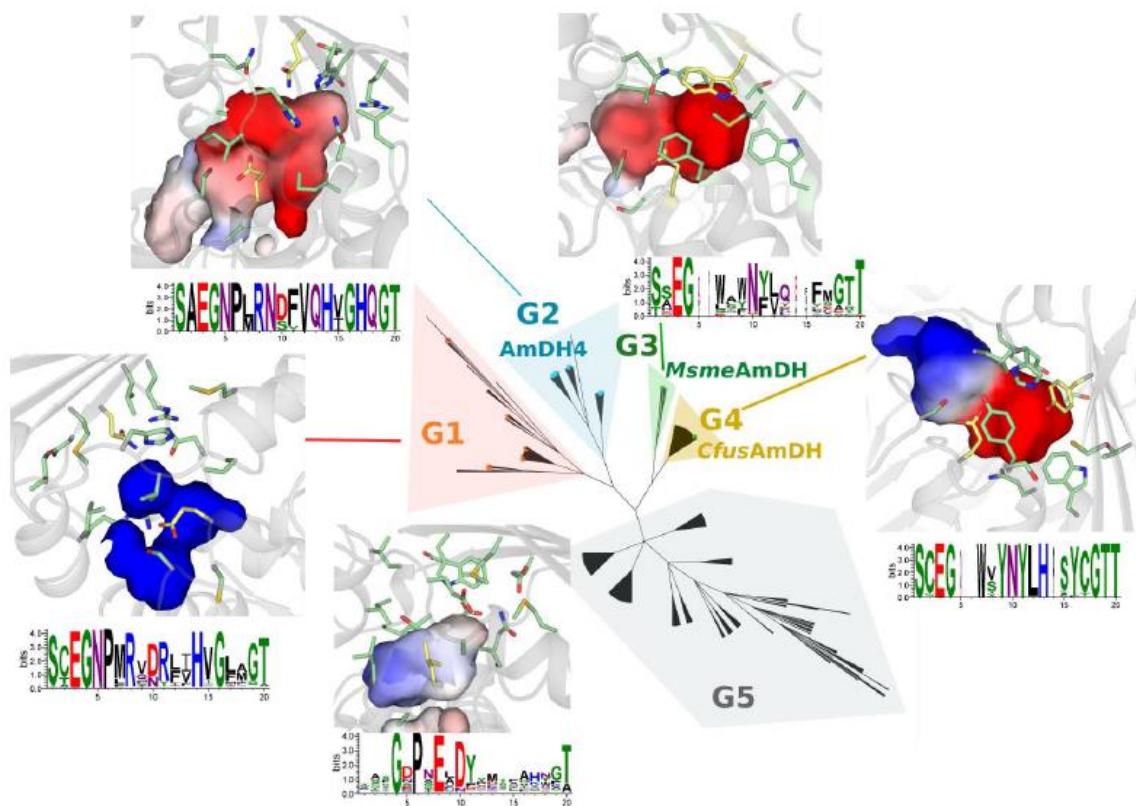


Figure 4. Dividing the AmDH family into groups with similar active sites. The hierarchical trees of active sites, generated by ASMC, contains 2029 proteins. The number of sequences (seq.) for each ASMC group is indicated under each logo, which represents the conservation of the active site residues. Electrostatic potentials for a representative structure of each ASMC group obtained using an adaptive Poisson-Boltzmann solver (APBS software) are displayed. The electrostatic potential maps are scaled from -15 to +15 kbT/ec, the negative electrostatic potential is highlighted in red, and the positive potential is highlighted in blue. The residues of the logo are represented in stick. All these residues are colored in green except for P3, P9 and P14 which correspond to the catalytic

glutamate, and the hydrogen donors respectively, as observed in AmDH4, CfusAmDH and MsmeAmDH.

Semi-preparative scale reductive amination

To test the broad synthetic applicability of our nat-AmDHs,³³ semi-preparative scale reactions were performed with *MsmeAmDH*, *CfusAmDH* and *MicroAmDH* using racemic ketones **2**, **3** and **14** and aldehyde **21**. Moderate to good conversions (45 - 76 %) were achieved at 50 mM of carbonyl compound in reasonable reaction times (6 – 24 h) with moderate enzyme loading (0.1 - 0.5 mg mL⁻¹). Products (2S)-pentan-2-amine **14a**, (1*S*, 2*R*)-2-methylcyclohexylamine **2a**, (1*S*, 3*R*)-3-methylcyclohexylamine **3a** and *N*-methylisobutylamine **21b** were obtained in 35 to 56 % yields with *ee/ed* > 97 % and good *cis/trans* ratio (90/10 for **2a** and 92/8 for **3a**) (Supplementary Section 10.1 and 10.2, Fig. S17-29). (4*S*)-4-aminopentanoic acid was produced in higher quantities (10.6 g) than previously described²¹ demonstrating again the industrial potential of this process, with a space time yield and total turnover of 53 g L⁻¹ d⁻¹ and 26 800 respectively (Table S9). These reactions validate these enzymes as interesting alternatives for the synthesis of chiral aliphatic amines and also as candidates for the reductive amination of aldehydes, leading to the bulk synthesis of terminal alkylamines, among other polymer precursors.

Conclusion

A novel family of enzymes (nat-AmDHs) capable of catalyzing the reductive amination of ketones and aldehydes with ammonia and methylamine has been described. The illustrated biocatalytic synthesis on semi-preparative scale of three primary chiral amines and one terminal alkylated amine demonstrate their potential as biocatalysts for producing value-added chiral amines or bulk amines. Directed evolution may be employed to improve their performance, particularly with respect to increasing substrate concentration and substrate scope, as illustrated here with the quadruple AmDH4 variant. Nat-AmDHs constitute a new type of AmDHs distinct from the already reported RedAms, engineered AmDHs and IREDS. A 3D-active site exploration of the bacterial biodiversity revealed various clusters to be explored for finding other valuable biocatalysts for reductive amination. A panel of active sites are available, ranging from one specialized for α -amino acid-bearing substrates to much more hydrophobic ones, which suggests a phylogenetic evolution with divergence inside this superfamily.³⁴

Methods

General. For details of chemicals, strains, various procedures and all data, see Supplementary Information.

Specific activities measurements. All the reactions were conducted from duplicate at 25 °C in spectrophotometric cell (10 mm light path) in a final reaction volume of 100 µL. For the screening of carbonyl-containing compounds **1-22** with ammonia as amine source, the procedure was as follow: to a mixture of ammonium formate buffer (2 M NH₄HCO₃/NH₄OH, pH 9.5), NADH or NADPH (0.2 mM) was added an appropriate amount of purified enzyme (0.01 – 0.5 mg/ml). Carbonyl-containing compound (10 mM) was then added to initiate the reaction. The initial slope measured at 340 nm determined the specific activity of the enzyme according to Beer–Lambert's law and the molar

absorptivity of β -NADH ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) after subtraction of the slope obtained under the same conditions except without substrate. In the case of methylamine as amine source, the procedure was as follow: to a mixture of TRIS.HCl buffer (50 mM, pH 9.5), NADH/ NADPH (0.1 mM each), and methylamine (500 mM) was added an appropriate amount of purified enzyme (0.02 – 0.2 mg/ml). Carbonyl-containing compound **1** or **21** (5 mM) was then added to initiate the reaction (reaction final volume 100 μL). The specific activity was determined as described above.

Determination of kinetic parameters. Kinetic parameters were determined by spectrophotometric NAD(P)H-monitoring in the forward (reductive amination) direction at 340 nm. All the reactions were performed in ammonium formate buffer pH 8.5-9.0 (or 50 mM carbonate buffer pH 9 when specified) in a final volume of 100 μL at room temperature (approximately 23 °C) or at 50°C when specified, in spectrophotometer cell with optical paths of 0.6 or 1 cm, depending on the saturated concentration of NADH or NADPH. Initial rates of the reaction were measured with various concentrations of substrate and saturated concentrations of the other substrates. Data were fitted to the Michaelis and Menten equation or Hill equation, using Sigma Plot software. Plots are provided in Supplementary Section 4.

Biocatalytic synthesis. The detailed procedures of analytical biocatalytic reactions carried out to validate the AmDH activities, including calibration curves (Fig. S7), the determination of enantio - and diastereoselectivities, are described in Supplementary Section 5 and 6. For semi-preparative scale reactions, typical procedures are as follow: 20 mL-reactions with ammonia were conducted in a 50 mL-Greiner tube equipped with a screw cap containing 50 mM ketone, 60 mM D-glucose, 0.2 mM NADP⁺, 60 U of GDH (Codexis GDH 105), indicated amount of purified AmDH in 1-2 M ammonium formate buffer pH 9.0. Reactions were stirred at 30°C 400 rpm for 6 - 24 h and then basified to pH 12 with 10 M KOH solution. The products were extracted with diethylether (3 x 20 mL), the combined organic layers were dried (MgSO_4) and concentrated to approximately 10 mL before addition of 1.2 eq of a solution of 2 M HCl in diethylether. In case of precipitation, the resulting solid was filtered, washed with cold diethylether and dried to afford the desired amine as monohydrochloride salt. Otherwise, 10 mL of distilled water were added and the product extracted with 2 x 20 mL of water. The combined aqueous phases were washed with diethylether (3 x 10 mL) to remove the unreacted ketone. The water phase was then lyophilized to afford the desired product as monohydrochloride salt. The semi-preparative scale reaction with methylamine was conducted in a 50 mL-Greiner tube equipped with a screw cap containing 50 mM isobutyraldehyde, 60 mM D-glucose, 0.2 mM NADP⁺, 60 U of GDH (Codexis GDH 105), 0.1 mg. mL^{-1} of purified *MicroAmDH* in 50 mM sodium phosphate buffer pH 8.0 at 30°C 400 rpm for 10 h. The product was extracted from the reaction mixture as described above in the case of no precipitation. For further details including GC and UHPLC chromatograms and NMR spectra, see Supplementary Section 10.2.2-10.2.4, Fig. S17-S29.

Crystallization of AmDHs. AmDH4, *CfusAmDH* and *MsmeAmDH* were subjected to crystallization trials using a range of commercial screens in 96 well-plate sitting-drop format dispensed by a Mosquito robot (TTP Labtech). Crystals were optimized in hanging drops in 24 well Linbro dishes in 2 mL drops by the vapor diffusion method, using the best crystallization conditions from the initial screen. Details of best crystallization conditions, data refinement and collection are detailed in Supplementary Section 7. Coordinates and structure factors for the open and open/closed forms of AmDH4, *CfusAmDH* and *MsmeAmDH* have been deposited in the Protein Data Bank (DB) with accession codes 6G1H/6G1M, 6GET and 6GFD respectively.

References.

- 1 Bornscheuer, U. T. Biocatalysis: Successfully Crossing Boundaries. *Angewandte Chemie International Edition* **55**, 4372-4373 (2016).
- 2 Ghislieri, D. & Turner, N. J. Biocatalytic Approaches to the Synthesis of Enantiomerically Pure Chiral Amines. *Topics in Catalysis* **57**, 284-300 (2014).
- 3 Sharma, M., Mangas-Sanchez, J. & Grogan, G. NAD(P)H-Dependent Dehydrogenases for the Asymmetric Reductive Amination of Ketones: Structure, Mechanism, Evolution and Application. *Advanced Synthesis & Catalysis*, n/a-n/a (2017).
- 4 Grogan, G. Synthesis of chiral amines using redox biocatalysis. *Current opinion in chemical biology* **43**, 15-22 (2017).
- 5 Vidal, L. S., Kelly, C. L., Mordaka, P. M. & Heap, J. T. Review of NAD(P)H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* (2017).
- 6 Höhne, M. & Bornscheuer, U. T. Biocatalytic Routes to Optically Active Amines. *ChemCatChem* **1**, 42-51 (2009).
- 7 Abrahamson, M. J. *et al.* Development of an amine dehydrogenase for synthesis of chiral amines. *Angew Chem Int Ed Engl* **51**, 3969-3972 (2012).
- 8 Abrahamson, M. J., Wong, J. W. & Bommarius, A. S. The Evolution of an Amine Dehydrogenase Biocatalyst for the Asymmetric Production of Chiral Amines. *Advanced Synthesis & Catalysis* **355**, 1780-1786 (2013).
- 9 Bommarius Andreas, S., Abrahamson Michael, J. & Bommarius, B. Engineered amine dehydrogenases and methods of use thereof. US2013309734 A1 2013-11-21 [US20130309734] - US8835136 B2 2014-09-16 [US8835136] (2014).
- 10 Au, S. K., Bommarius, B. R. & Bommarius, A. S. Biphasic Reaction System Allows for Conversion of Hydrophobic Substrates by Amine Dehydrogenases. *ACS Catalysis* **4**, 4021-4026 (2014).
- 11 Pushpanath, A. *et al.* Understanding and Overcoming the Limitations of *Bacillus badius* and *Caldalkalibacillus thermarum* Amine Dehydrogenases for Biocatalytic Reductive Amination. *ACS Catalysis*, 3204-3209 (2017).
- 12 Ye, L. J. *et al.* Engineering of Amine Dehydrogenase for Asymmetric Reductive Amination of Ketone by Evolving *Rhodococcus Phenylalanine* Dehydrogenase. *ACS Catalysis* **5**, 1119-1122 (2015).
- 13 Lowe, J., Ingram, A. A. & Groger, H. Enantioselective synthesis of amines via reductive amination with a dehydrogenase mutant from *Exigobacterium sibiricum*: Substrate scope, co-solvent tolerance and biocatalyst immobilization. *Bioorg Med Chem* (2017).
- 14 Wetzl, D. *et al.* Asymmetric Reductive Amination of Ketones Catalyzed by Imine Reductases. *ChemCatChem* **8**, 2023-2026 (2016).
- 15 Agard Nicholas, J. *et al.* Engineered imine reductases and methods for the reductive amination of ketone and amine compounds. US2015132807 A1 2015-05-14 [US20150132807] - WO2015073555 A1 2015-05-21 [WO201573555] (2015).
- 16 Itoh, N., Yachi, C. & Kudome, T. Determining a novel NAD⁺-dependent amine dehydrogenase with a broad substrate range from *Streptomyces virginiae* IFO 12827: purification and characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **10**, 281-290 (2000).
- 17 Wang, S. & Fang, B. Method for preparing chiral amine through asymmetric reduction under catalysis of marine strain OTI - (CN103224963B)
- 18 Aleku, G. A. *et al.* A reductive aminase from *Aspergillus oryzae*. *Nat Chem advance online publication* (2017).
- 19 France, S. P. *et al.* Identification of Novel Bacterial Members of the Imine Reductase Enzyme Family that Perform Reductive Amination. *ChemCatChem* **10**, 1-6 (2018).

- 20 Fonknechten, N. et al. A Conserved Gene Cluster Rules Anaerobic Oxidative Degradation of L-Ornithine. *Journal of bacteriology* **191**, 3162-3167 (2009).
- 21 Mayol, O. et al. Asymmetric reductive amination by a wild-type amine dehydrogenase from the thermophilic bacteria *Petrotoga mobilis*. *Catalysis Science & Technology* **6**, 7421-7428 (2016).
- 22 Zaparucha, A., de Berardinis, V. & Vaxelaire-Vergne, C. Chapter 1. Genome Mining for Enzyme Discovery. 1-27 (2018).
- 23 Knaus, T., Bohmer, W. & Mutti, F. G. Amine dehydrogenases: efficient biocatalysts for the reductive amination of carbonyl compounds. *Green Chemistry* **19**, 453-463 (2017).
- 24 Godoy-Alcántar, C., Yatsimirsky, A. K. & Lehn, J. M. Structure-stability correlations for imine formation in aqueous solution. *Journal of Physical Organic Chemistry* **18**, 979-985 (2005).
- 25 Scheller, P. N. et al. Imine Reductase-Catalyzed Intermolecular Reductive Amination of Aldehydes and Ketones. *ChemCatChem* **7**, 3239-3242 (2015).
- 26 Reddy, S. G., Sacchettini, J. C. & Blanchard, J. S. Expression, Purification, and Characterization of *Escherichia coli* Dihydrodipicolinate Reductase. *Biochemistry* **34**, 3492-3501 (1995).
- 27 Cirilli, M. et al. The three-dimensional structure of the ternary complex of *Corynebacterium glutamicum* diaminopimelate dehydrogenase-NADPH-L-2-amino-6-methylene-pimelate. *Protein science : a publication of the Protein Society* **9**, 2034-2037 (2000).
- 28 Liu, W. et al. Structural and mutational studies on the unusual substrate specificity of meso-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum*. *Chembiochem* **15**, 217-222 (2014).
- 29 Tomita, H., Katsuyama, Y., Minami, H. & Ohnishi, Y. Identification and characterization of a bacterial cytochrome P450 monooxygenase catalyzing the 3-nitration of tyrosine in rufomycin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 15859-15869 (2017).
- 30 Lichman, B. R. et al. Structural Evidence for the Dopamine-First Mechanism of Norcoclaurine Synthase. *Biochemistry* **56**, 5274-5277 (2017).
- 31 Bastard, K. et al. Revealing the hidden functional diversity of an enzyme family. *Nature chemical biology* **10**, 42-49 (2014).
- 32 Sigrist, C. J. et al. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic acids research* **41**, D344-347 (2013).
- 33 Cosgrove, S. C. et al. Imine Reductases, Reductive Aminases, and Amine Oxidases for the Synthesis of Chiral Amines: Discovery, Characterization, and Synthetic Applications. *Methods in enzymology* (2018).
- 34 Furnham, N. et al. Large-Scale Analysis Exploring Evolution of Catalytic Machineries and Mechanisms in Enzyme Superfamilies. *Journal of molecular biology* **428**, 253-267 (2016).

Acknowledgements. The authors would like to thank Marcel Salanoubat for supporting the project, Alain Perret for fruitful discussions on the biochemical characterization of the discussed enzymes, Nuria Fonknechten for fruitful discussions and assistance in genomic context analysis, Christine Pelle and Peggy Sirvain for large scale purification, analytical gel filtration of the described enzymes, Olek Maciejak (University Val d'Essonne) for NMR assistance, the Region Ile de France for financial support of the 600 MHz spectrometer, Mr Sam Hart for assistance with X-ray data collection and the Diamond Light Source for access to beamlines I04 and I04-1 under proposal number mx-9948. This work was supported by Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA), the CNRS and the University of Evry Val d'Essonne. We thank GlaxoSmithKline for award of a part-studentship to A.F., the Brazilian Government for a fellowship to L.B. under the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) scheme and the COST Action CM1303 "System Biocatalysis" for STSM of O.M in G.G.'s laboratory.

Author contributions. C.V.V. conceived the project and directed it with G.G.. C.V.V., G.G., O.M., A.Z. and V.d.B. supervised the project. V.d.B. and J.-L.P. performed the candidate enzyme selection. A.D., V.P. carried out the gene cloning, the protein expression and purification on a small scale and the enzymatic screening with input from A.M. and J.-L.P.. O.M., V.P. and C.V.V. conducted the specific activity measurements. G.G., J.P.T., A.F. and L.B. conducted all the structural resolution. K.B. conceived and conducted the structural bioinformatics analysis with input from O.M., C.V.V. and G.G. O.M. carried out the biochemical experiments. O.M. and C.V.V. performed the analytical and semi-preparative scale reactions. C.V.V., G.G., K.B. and O.M. wrote the manuscript with input from A.Z. and V.d.B.

Competing interest.

The authors declare no competing financial interests.

Additional information.

Supplementary information is available for this paper at

Titre : Amine déshydrogénases pour la synthèse biocatalysée d'amines chirales : recherche, application et évolution.

Mots clés : Amine déshydrogénases, Amines chirales, biocatalyse

Résumé. L'importante représentation des amines chirales dans les molécules biologiquement actives a entraîné une forte dynamique de recherche autour de leur synthèse stéréosélective. A l'heure où l'impact environnemental est de plus en plus considéré, les procédés biocatalytiques sont apparus comme une alternative aux synthèses chimiques conventionnelles, utilisatrices de métaux de transitions et ligands chiraux difficiles à éliminer. Ces voies enzymatiques d'obtention d'amines chirales optiquement pures font majoritairement appel à des lipases (résolution cinétique) et des transaminases mais ces méthodes souffrent de certains désavantages comme de la perte de coproduit de réaction (transaminase). La synthèse enzymatique d'amines chirales à partir de composés cétones et d'ammoniac comme seule source d'azote s'est finalement présentée comme un réel défi pour l'industrie en 2007. En 2012, les premières amines déshydrogénases catalysant cette réaction d'amination réductrice ont été obtenues par ingénierie protéique, mais aucun représentant naturel n'a encore été identifié et caractérisé.

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont consisté tout d'abord à explorer la biodiversité afin de découvrir des gènes codant des enzymes natives catalysant cette réaction.

Par approche génomique basée sur la comparaison de séquence, plusieurs AmDHs ont été identifiées. Trois d'entre elles ont fait l'objet d'études plus approfondies : DH2B1 issue de *Petrotoga mobilis*, DH13B5 venant de *Mycobacterium smegmatis* et DH13F8 de *Cystobacter fuscus*. Grâce à la résolution de leur structure 3D par nos collaborateurs, mais aussi par l'établissement de leur spectre de substrat, de la création de mutant impliquant les résidus du site actif et de la détermination des constantes cinétiques, un mécanisme réactionnel a pu être proposé. Les conditions réactionnelles d'utilisation de DH2B1, DH13B5 et DH13F8 ont ensuite été optimisées pour les synthèses du (4S)-4-aminopentanoate, *cis*-(1S,2R)-2-méthylcyclohexylamine, *cis*-(1S,3R)-3-méthylcyclohexyl-amine et (2S)-pentan-2-amine, et ont permis l'obtention de ces produits avec des rendements de 35-88% et de très bons excès énantiomériques (>97%).

La découverte et la caractérisation de ces enzymes ouvrent des perspectives pour la synthèse biocatalysée d'amines chirales variées par des homologues natifs ou fruit d'un travail d'ingénierie.

Title : Amine dehydrogenases for biocatalytic synthesis of chiral amines : discovery, application and evolution

Keywords : Amine dehydrogenase, chiral amines, biocatalysis,

Abstract. Widely widespread in small biologically active molecules, chiral amines have given rise to an increasing amount of research directed towards the development of asymmetric synthesis. As the environmental impact is increasingly taken into account, biocatalytic routes appear as a beneficial alternative to conventional chemical synthesis that uses expensive transition metals and chiral ligands that are difficult to remove. Among these eco-friendly processes to obtain pure chiral amines, lipases (dynamic resolution) and transaminases are the most common ones, but suffer from drawbacks, particularly the loss of the amine donor in case of transaminases. The enzymatic synthesis of chiral amines starting from ketones and ammonia, as the only nitrogen source, appeared as a real challenge for the industry. In 2012, the first amine dehydrogenases, catalyzing this reductive amination reaction, were obtained by protein engineering and no native representatives had yet been identified.

These research studies have firstly consisted in exploring the biodiversity in order to discover gene coding for native enzymes capable to catalyze this reductive amination.

By pairwise sequence alignment-based approach, several AmDHs were identified and three of them were more extensively studied: DH2B1 from *Petrotoga mobilis*, DH13B5 from *Mycobacterium smegmatis* and DH13F8 from *Cystobacter fuscus*. Thanks to their external collaborative 3D structural resolution, substrate scope studies, active site mutant engineering and the kinetic constants determination, a mechanism was postulated. The reaction conditions of DH2B1, DH13B5 and DH13F8 were then optimized for the synthesis of (4S)-4-aminopentanoate, *cis*-(1S,2R)-2-méthylcyclohexyl-amine, *cis*-(1S,3R)-3-méthylcyclohexylamine and (2S)-pentan-2-amine obtained with 35 to 88 % yield and excellent enantiomeric/diastereoisomeric excesses (>97 %).

The discovery and characterization of these native amine dehydrogenases offer new perspectives for the biocatalytic synthesis of various chiral amines by native or engineered homologs

