

NNT/NL: 2021AIXM0188/010ED250

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université le 29 mars 2021 par

Julie COUILLAUD

« The terpene mini-path »

Nouvel accès aux terpènes et exploration de l'espace chimique par une cascade enzymatique originale

Discipline Sciences chimiques	Composition du jury Gilles TRUAN 	Rapporteur
École doctorale École doctorale des Sciences chimiques de Marseille (ED 250)	Directeur de Recherche, INSA, Toulo Muriel GONDRY Chercheur, CEA, Université Paris-Sac	use <i>Rapporteur</i> lay
	 Sandrine MOREAU Chef de projet R&D, SERVIER Orléans 	Examinateur
	Marie-Noëlle ROSSO Directeur de Recherche, INRA, Marse	<i>Examinateur</i> eille
	• Véronique DE BERARDINIS Chercheur, CEA, Evry	Invitée
	Gilles IACAZIO Professeur d'Université, AMU Marse	<i>Directeur de thèse</i> ille
	Katia DUQUESNE Maître de Conférences, AMU Marsei	<i>Co-directeur de thèse</i> lle

Remerciements

J'espère par ces quelques lignes trouver les mots justes pour condenser ces trois années de vie et parvenir à remercier toutes les personnes qui m'ont permis de mener à bien ce projet.

Ainsi, je ne peux que débuter par Gilles Truan, Muriel Gondry, Sandrine Moreau et Marie-Noëlle Rosso, sans qui il m'aurait été impossible de soutenir ma thèse. Je les remercie d'avoir accepté de juger ces travaux, d'y avoir accordé un temps précieux et de m'avoir offert des discussions riches de sens, de conseils et de réflexions. Je garderai en mémoire ces échanges constructifs et leur expertise personnelle ayant conduit à l'ajustement de ce manuscrit.

Une thèse c'est à la fois une expérience professionnelle et une aventure humaine ; sur ces deux plans ces trois années ont été, pour moi, très constructives.

Pour leur confiance placée en moi dès mes premiers pas dans ce projet, je souhaite particulièrement remercier Gilles Iacazio et Katia Duquesne. Un merci des plus sincères et admiratifs pour leur encadrement, leurs encouragements, leur patience mais aussi et surtout pour leurs connaissances scientifiques, leurs conseils et leur pédagogie. Du fond du cœur merci de m'avoir apportée tant pendant ces années à vos côtés, de m'avoir transmis votre passion et votre engouement pour ces thématiques qui vous sont chères.

A Véronique de Bérardinis et Jean-Louis Petit j'adresse mes remerciements pour leur rôle essentiel lors du lancement de ce projet et également tout au long de ces trois années, pour leur bienveillance à chacune de nos rencontres et de nos échanges, pour leur disponibilité permanente, leur aide et leur présence jusqu'à la toute fin.

Si j'ai pu mener à bien ce projet grâce à l'interaction avec nombre de personnes de l'équipe BiosCiences et d'autres horizons, que je remercie toutes, sans exception, j'adresse un merci tout particulier à celles qui ont partagé mes coups de mou et éclats de joie, mes larmes et mes rires, mes pointes de stress et moments de relâchement, et tout le reste.

A celles que j'ai surnommé affectueusement mes « Wonder women » : Elise, Yolande et Agnès. Parce qu'il est si rare de rencontrer des personnes d'une douceur, d'une gentillesse et d'une générosité sans limites, je suis consciente de la chance que j'ai eue de les avoir à mes côtés. A tous ces litres de milieux de culture préparés, ces fermenteurs lancés avec plus ou moins de succès, ce nombre infini de clonages « prise de tête » et à cette ThiM si capricieuse … Un merci plus personnel pour leur disponibilité, leur aide considérable, l'amitié qu'elles m'ont offerte et pour les chocolats, les viennoiseries, les cannelés, les fraises … partagés.

A Bruno, Pierre, Renaud et Mireille pour tellement de choses : l'écoute dont ils ont fait preuve, le soutien infaillible qu'ils m'ont apporté, nos discussions légères et drôles et également scientifiques et constructives, leur aide considérable, nos week-ends scientifiques. A Bruno, particulièrement pour avoir marqué mon parcours universitaire et être l'enseignant que j'aimerai devenir : passionné et investi. A Pierre, discrètement mais sincèrement présent chaque jour de ces trois années. A Renaud pour son francparler et ses taquineries, à Mireille pour sa douceur. Sans oublier le duo Pierre/Renaud pour m'avoir couverte de paillettes, papillons et plus concrètement de pétales de fleurs et de petits cœurs en égayant les longues journées de travail.

A Bénédicte, un merci du fond du cœur pour m'avoir donné l'envie de poursuivre en thèse et de choisir d'enseigner en parallèle. J'espère que tous les étudiants se rendent compte de la chance qu'ils ont... Merci d'avoir été une enseignante marquante puis une encadrante de stage de Master passionnée, investie et tellement pédagogue ! Je mesure la chance que j'ai eu d'apprendre à tes côtés en tant qu'étudiante et après ces 3 années de monitorat. Je ne saurai suffisamment te remercier pour ta présence, ta joie de vivre, et surtout le soutien que tu m'as toujours apporté. A tous les étudiants que j'ai pu avoir à mes côtés et particulièrement Tiffany, Axel, Nicolas, Létitia merci pour votre aide, votre investissement, et nos discussions, je vous souhaite toutes les plus belles choses pour la suite. Aux doctorants et post-doctorant dont j'ai croisé la route et qui sont à l'origine de nombreux souvenirs, fou-rires, soirées mémorables, randonnées dans les calanques, découvertes culinaires, soirées visionnage GOT... MERCI, MERCI, MERCI !!!

Et puis il y a LES rencontres de cette thèse : surprenantes, essentielles, intenses, marquantes, durables.

Bernadett, ma coloc de bureau, mon acolyte de journées de manip et de soirées de rédaction, ma copilote, ma hongroise préférée, mon amie. Si j'avais dû choisir un binôme en débutant cette thèse, je n'aurai pu imaginer une autre personne que toi. Merci d'avoir été une épaule solide sur laquelle m'appuyer tout au long de ces trois années, merci d'être franche et drôle, de partager mon amour de la vadrouille, des bons petits plats, du cinéma, du shopping... Sans toi, ces années auraient été plus ternes et les prochaines seront tellement mieux !

Alexandre, merci d'être devenu un ami des plus fidèles, un super confident, d'avoir égayé de nombreuses journées par ce Wow légendaire, pour nos afterwork plus ou moins philosophiques. Je ne te remercierai jamais assez pour ta présence lors des deux premières années et ton soutien précieux jusqu'alors, malgré les kilomètres qui nous séparent aujourd'hui.

Nino, l'« étincelle » ou le « catalyseur » d'exception. Merci d'avoir rythmé ces années d'une certaine insouciance, de beaucoup de rires, de nombreuses blagues, de quelques grosses frayeurs mais de les avoir aussi et surtout marquées, d'une belle amitié... sans oublier la douce et positive Julie. Vous formez un super duo et je suis heureuse de vous compter parmi mes proches.

Hugo, le subtil et délicat de la bande. A ce duo inattendu que nous avons formé, à l'origine de tellement de souvenirs... Les sessions Manips/rédaction en nocturne au labo, ma découverte des sushis et de Rob Brezsny, tes courses de bateaux en ligne, ton amour pour les birk, les doudounes sans manches et le comté (entre autres choses), les bons restos et nos bons petits plats, tes blagues plus ou moins comprises qui ont égayé beaucoup de journées, sans oublier Odin et puis tant d'autres choses.

Les amis résistants, compréhensifs et conciliants

Marine, Tiphaine, Raïka, Jean-Philippe et Alyssa, Pardonnez-moi pour mon absence, promis je vais me rattraper ! Merci à vous d'avoir su me faire rire, me permettre l'espace d'un instant de me vider la tête, d'avoir tenu bon et d'être toujours présents !

Un merci immense à ma famille, mes essentiels, mon soutien infaillible, ma principale source de motivation malgré mon absence, mes week-end au laboratoire ou ma mauvaise humeur de certains jours. A ma petite sœur, celle communément nommée « mon petit panda », les rôles se sont inversés le temps de quelques semaines, et tu as été un sacré bambou auquel je me suis accrochée. Merci pour tes compétences en orthographe, tes talents en cuisine, en danse, et en chant, tes soirées passées à lire et relire ces pages, qui sont si loin de ton champ de compétences. Merci d'être le membre central de ma bande organisée !

Et bien sûr, merci aux personnes qui liront cette thèse. J'espère que celle-ci vous apportera les réponses que vous êtes venus chercher ou, tout du moins, des pistes pour y parvenir et vous amènera à vous intéresser au vaste domaine des terpènes.

Affidavit

Je soussignée, Julie Couillaud, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique du Pr. Gilles Iacazio et du Dr. Katia Duquesne, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 18 février 2021

Julis Couilland

« Faites quelque chose et, si ça ne réussit pas, essayez autre chose. »

Franklin Delano Roosevelt

Table des matières

LISTE	E DES FIGURES	1
LISTE	DES TABLEAUX	6
LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES		8
INTR	ODUCTION	9
<u>Cha</u>	upitre I Etat de l'art	12
A.	INTRODUCTION	13
B.	BIOSYNTHESE DES TERPENOÏDES	20
I.	Les précurseurs universels IPP et DMAPP	20
a.	La voie du mévalonate (MVA)	20
b.	La voie du méthylérythritol phosphate (MEP)	26
II.	Les terpénoïdes	34
а.	Les prényl transférases	34
b.	Les terpène synthases	55
C.	LA BIOLOGIE SYNTHETIQUE POUR LA PRODUCTION DE TERPENES	72
<u>Cha</u>	pitre II La mini-voie de biosynthèse des terpènes	79
A.	CHOIX DES COMPOSANTS DE LA CASCADE ENZYMATIQUE	84
I.	Les substrats	84
II.	Les enzymes	87
а.	Etat de l'art	87
b.	Criblage à haut débit pour l'identification d'IPKs et de NSAPs compatibles	100
С.	Les enzymes sélectionnées	105
B.	MISE EN PLACE D'UNE PREUVE DE CONCEPT <i>IN VITRO</i>	117
I.	Synthèse de la tryprostatine B	118
а.	La prényl transférase d'A. fumigatus	118
b.	La cascade enzymatique	122
II.	Étude détaillée de la cascade à 3 étapes	135
а.	Le système de recyclage d'ATP	135

b.	<i>Le double enjeu autour de PhoN_{xt}</i>	1 3 8
C.	La détermination des facteurs influents et des interactions	144
d.	L'optimisation	150
C.	APPLICATION A LA SYNTHESE IN VIVO DE TRYPROSTATINE B	156
	CLUSION	159

<u>Cha</u>	pitre III Applications de la MVT	<u>164</u>
A.	La mini-voie des terpenes 2.0	165
I.	ThiM, l'enzyme clé de la MVT	166
a.	Généralités	166
b.	Données structurales	167
с.	La kinase de prénol ThiM _{Ec}	169
II.	Production optimisée de tryprostatine B	171
а.	Production hétérologue de ThiM _{Ec}	171
b.	La mini-voie 2.0	173
С.	Synthèse de terpénoïdes non-naturels	178
B.	LA MVT POUR LA PRODUCTION DE SESQUITERPENES NATURELS	185
I.	Une nouvelle cascade pour la production de FPP	185
а.	Méthode d'analyse pour la quantification du FPP produit	187
b.	Adaptation de la MVT 2.0 à la synthèse de FPP	187
II.	Identification de nouvelles sesquiterpène synthases fongiques, l'exemple de L. menziesii	197
а.	Les sesquiterpène synthases de L. menziesii	198
Con	CLUSION	201
PART	TE EXPERIMENTALE	205
Con	CLUSION GENERALE	251
Bibli	OGRAPHIE	256
Ann	EXES	272

Liste des figures

Figure 1 : Vue d'ensemble de la biosynthèse des terpénoïdes, proposée par Moser S. et Pichler H. (Moser, 2019) 15
Figure 2 : Répartition des terpénoïdes selon leur organisme d'origine, adaptée des travaux de Wu et collaborateurs (Zeng et
<i>al.,</i> 2019)
Figure 3 : Les 50 structures les plus fréquemment retrouvées dans la classe des terpénoïdes proposées par Wu et
collaborateurs (Zeng et al.,2019)
Figure 4 : Voie du mévalonate et alternatives métaboliques retrouvées chez les archées, adaptée de Vinokur et
collaborateurs (Vinokur <i>et al.,</i> 2016)
Figure 5 : Première étape de la voie du mévalonate, catalysée par l'acétoacétyl-CoA synthase, d'après H. M. Miziorko
(Miziorko, 2011)
Figure 6 : Deuxième étape de la voie du mévalonate, catalysée par l'hydrométhylglutaryl-CoA synthase, d'après H.M.
Miziorko (Miziorko, 2011)
Figure 7 : Troisième étape de la voie du mévalonate, catalysée par l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase, d'après H. M.
Miziorko (Miziorko, 2011)
Figure 8 : Quatrième étape de la voie du mévalonate, catalysée par la mévalonate kinase
Figure 9 : Cinquième étape de la voie du mévalonate, catalysée par la mévalonate diphosphate décarboxylase
Figure 10 : Isomérisation de l'IPP en DMAPP, catalysée par l'isopentényl diphosphate isomérase
Figure 11 : Voie du méthylerythritol phosphate (MEP), adaptée de Dowd et collaborateurs (Wang et al., 2018) 28
Figure 12 : Première étape de la voie du méthylérythritol phosphate (MEP), catalysée par la déoxyxylulose phosphate
synthase (adaptée de Frank et Groll, 2017)29
Figure 13 : Deuxième étape de la voie du méthylérythritol phosphate (MEP), catalysée par la méthylérythritol phosphate
synthase (adaptée de Frank et Groll, 2017)
Figure 14 : Troisième étape de la voie du méthylérythritol phosphate (MEP), catalysée par la MEP cytidylyltransférase
(adaptée de Frank et Groll, 2017)
Figure 15 : Quatrième étape de la voie du méthylérythritol phosphate, catalysée par la cytidine diphospho-méthylérythritol
kinase (adaptée de Frank et Groll, 2017)
Figure 16 : Cinquième étape de la voie du méthylérythritol phosphate (MEP), catalysée par la méthylérythritol
cyclodiphosphate synthase (adaptée de Frank et Groll, 2017)
Figure 17 : Réduction du méthylérythritol cyclodiphosphate (MEcPP), catalysée par l'hydroxyméthylbutényl diphosphate
synthase en présence de NADPH (donneur d'électrons) (adaptée de Frank et Groll, 2017)
Figure 18 : Réduction de l'hydroxyméthylbutényl diphosphate (HMBPP), catalysée par l'hydroxyméthylbutényl
diphosphate réductase (IspH, E. coli) en présence de NADPH (donneur d'électrons) (adaptée de Frank et Groll, 2017).
Figure 19 : Les différentes connexions créées par les prényl transférases linéaires
Figure 20 : Stéréochimie de la condensation 1'-4 ou « tête-à-queue » catalysée par la FPPS (d'après Kurokawa et al., 2010)
et structure quaternaire de la FPPS de Gallus gallus, retravaillée à partir de la PDB

Figure 21 : Dimère constitutif de l'UPPS de Micrococcus luteus BP-26 et représentation schématique du site actif dans leguel
l'IPP, le FPP sont délà fixés en présence du cation Mg ²⁺ (adaptée de la publication de Fujihashi et <i>al.</i> , 2001)
Figure 22 : Stéréochimie de la condensation 1'-4 catalysée par l'UPPS (d'après Kurokawa et Kovama. 2010) et structure
guaternaire de l'UPPS de <i>Micrococcus luteus</i> BP-26, retravaillée à partir de la PDB,
Figure 23 : C-prénylation du 4-HPP catalysée par NovQ et CloQ, impliquées respectivement dans la biosynthèse de la
novobiocine et de la chlorobiocine
Figure 24 : Rôle de NphB dans la biosynthèse de la naphterpine (a) et promiscuité de substrats (b) (d'après Singh et
collaborateurs, 2020)
Figure 25 : Données structurales des A-PTases solubles CloQ et NphB (adaptées de Metzger <i>et al.</i> , 2010)
Figure 26 : Exemples de substrats prénylés par les A-PTases de type ABBA CloQ, NovQ, NphB, Fnq26 et SC07190, adaptée de
T. Mori (Mori, 2020)
Figure 27 : Structures des diphosphates testés par Singh et collaborateurs pour l'alkylation du 1,6-DHN (accepteur décrit) et
du sulfabenzamide (nouvel accepteur)
Figure 28 : Première étape de la biosynthèse des alcaloïdes de l'ergot catalysée par DmaW de C. purpurea
Figure 29 : Alkylation de la L-tyrosine catalysée par SirD, étape de la voie de biosynthèse de la sirodesmine PL
Figure 30 : Promiscuité des PTases SirD et FgaPT2 envers différents donneurs analogues du disphosphate naturel DMAPP
(figure adaptée de Bandari <i>et al.,</i> 2017 et 2019)
Figure 31 : Réactions catalysées par les PTases membranaires UbiA, MenA et COX10.
Figure 32 : Structure de l'UbiA d'Aeropyrum pernix et organisation du site actif de l'enzyme, d'après Cheng et Li, 2014 54
Figure 33 : Mécanisme catalytique et structure quaternaire d'une TSs-I, la pentalenene synthase (figure adaptée de Rudolf
et Chang, 2019)
Figure 34 : Exemple de TSs-II dont la formation du carbocation tertiaire initial est dépendante d'une étape préalable de
protonation, extraite de la publication de Rudolf et Chang, 202057
Figure 35 : Classes de terpène synthases et domaines architecturaux correspondant (figure adaptée de Pichersky (Zhou et
al., 2020), et de Rudolf et Chang, 2019))58
Figure 36 : Isomérisation et ionisation du GPP (adaptée de la publication de Dickschat, 2016)
Figure 37 : Structure quaternaire de la linalool synthase de S. clavuligerus et représentation schématique de la conversion
du GPP en linalool catalysée par cette enzyme60
Figure 38 : Mécanisme réactionnel associé à la conversion du GPP en 1,8 cinéole, par CinS de S. clavuligerus dont la
structure quaternaire est présentée dans l'encadré (figure adaptée de la publication de Scrutton et collaborateurs
(Karuppiah <i>et al.</i> 2017))
Figure 39 : Les six réactions de cyclisation possibles à partir du FPP
Figure 40 : Représentation schématique de l'espace chimique accessible par les sesquiterpène synthases d'actinomycètes.
Figure 41 : Mécanisme réactionnel proposé par Brodelius et collaborateurs pour la conversion du FPP en un produit
majoritaire l'amorphadiène, catalysée par l'amorphadiène synthase (figure extraite de la publication de Picaud et al.,
2005)
Figure 42 : Mécanisme réactionnel pour la conversion du FPP en pentalénène proposé par Gutta et Tantillo (figure adaptée
de la publication de Gutta et Tantillo, 2006) et structure quaternaire de la pentalénène synthase de Streptomyces
(issue de la PDB)

Figure 43 : Clusters de gènes impliqués dans la biosynthese de la pentalenolactone chez Streptomyces exfoliatus UC5319
(cluster pen) et Streptomyces arena TÜ469 (cluster pnt) et voie de biosynthèse associée (figure adaptée de Cane et
Ikeda, 2012 et Zhu <i>et al.,</i> 2013)
Figure 44 : Conversion du GGPP en taxadiène par la taxadiène synthase de T. brevifolia, dont la structure quaternaire
monomérique est donnée dans l'encadré (figure adaptée de la publication Köksal et al, 2011)
Figure 45 : Mécanisme de cyclisation du FPP catalysée par la géosmine synthase dont la structure du domaine amino-
terminal (géosmine synthase de S. coelicolor) est présentée dans l'encadré
Figure 46 : Vue d'ensemble des voies de biosynthèses naturelles des isoprénoïdes du mévalonate (MVA) et du
méthylérythritol phosphate (MEP), extraite de la publication de Ward et collaborateurs, 2020
Figure 47 : Conception d'une voie du mévalonate synthétique pour la production d'amorphadiène chez E. coli par le groupe
de Keasling (Martin <i>et al.,</i> 2003)73
Figure 48 : Stratégies pour la production de composés terpéniques via l'approche « push-pull » (A) ou la co-culture
mutualiste de microorganismes (B) (figure adaptée de Daletos <i>et al.,</i> 2020)
Figure 49 : Meilleures productions de terpénoïdes par des microorganismes depuis 2009 (figure adaptée de Malico, 2020).
Figure 50 : Voies de biosynthèse naturelles des précurseurs universels IPP et DMAPP (adaptée de Li et al. 2018, Hoshino et
Gaucher, 2018)
Figure 51 : Synthèse chimique des diphosphates d'intérêt selon Poulter et collaborateurs (Poulter 1986)
Figure 52 : La mini-voie des terpènes comme alternative biosynthétique à l'accès aux précurseurs universels
Figure 53 : Application de la mini-voie des terpènes à la production de TB, in vivo et in vitro comme preuve de concept 84
Figure 54 : Structure des terpénols industriels, substrats de la mini-voie (gauche) et des diphosphates d'intérêt, produits de
la mini-voie (droite)
Figure 55 : Procédé industriel de synthèse de l'isopenténol et de l'alcool diméthylallylique
Figure 56 : Mécanisme catalytique proposé pour la NSAP de Salmonella enterica (AphAse), adapté de Calderone et al., 2006
et Makde <i>et al.,</i> 2007
Figure 57 : Phosphorylation de l'inosine par la phosphatase acide non-spécifique PhoC (<i>M. morganii</i>)
Figure 58 : Mise en évidence de la capacité de phosphorylation de la NSAP de Shigella flexneri d'un dérivé du DMAOH et de
І'ЮН
Figure 59 : Compétition entre hydrolyse et transphosphorylation au sein du site actif de PhoN _{se} (d'après Faber et al., 2016).
Figure 60 : Structure cristalline déterminée par diffraction des rayons X de l'IPK dimérique de Thermoplasma acidophilum
en présence d'ATP et d'IP
Figure 61 : Mécanisme de phosphorylation de l'IPK _{Ta} proposé par Mablango et collaborateurs, 2010
Figure 62 : Relations structurales entre les chaînes latérales des acides aminés glutamine, histidine et asparagine
Figure 63 : Criblage d'IPKs d'origine procaryotique actives sur le DMAP et l'IP104
Figure 64 : Criblage de NSAPs d'origine procaryotique actives sur l'IOH et le DMAOH
Figure 65 : Séquence protéique de PhoN _{Xt}
Figure 66 : Alignements des séquences protéiques de 6 phosphatases acides non spécifiques bactériennes appartenant à la
classe A, dont PhoN _{xt}
Figure 67 : Structure cristalline d'un monomère de PhoN _{Eb} déterminée par diffraction aux rayons X avec une résolution de
1,9 Å

Figure 68 : Structure cristalline déterminée par diffraction des rayons X de la phosphatase acide non spécifique	2
hexamèrique d' <i>E. blattae</i> (extraite de la PDB et modifiée)	110
Figure 69 : Site actif de la phosphatase acide d' <i>E. blattae.</i>	
Figure 70 : Mécanisme catalysé par les phosphatases acides non spécifiques de la classe A, proposé par Neuwa	ld en 1997.
Figure 71 : Séquence protéique de l'IPK _{Mv} et caractéristiques prédites à partir de cette séquence	
Figure 72 : Alignement des séquences protéiques des IPKs de M. jannaschii, M. thermautotrophicus et T. acido,	philum avec
la séquence référence de l'IPK de <i>M. vannielii.</i>	113
Figure 73 : Cascade enzymatique à trois étapes pour la synthèse de tryprostatine B comme preuve de concept.	
Figure 74 : Biosynthèse de fumitrémorgines fongiques dont la seconde étape est catalysée par la prényl transfé	érase FtmPT1
et permet la C-prénylation de la brévianamide F (adaptée de Steffan et al., 2009)	118
Figure 75 : Structures quaternaire et site actif de la prényl transférase d'A. fumigatus	12(
Figure 76 : Mécanisme réactionnel de FtmPT1 _{Af} , proposé en 2010 par Jost et collaborateurs.	
Figure 77 : Schéma de synthèse de la TB catalysée par FtmPT1 _{Af} et utilisant le DMAPP comme agent de prényla	ation 12!
Figure 78 : Cinétiques de transformation de la brévianamide F en fonction de la quantité d'enzyme purifiée Ftr	nPT1 _{Af}
utilisée	
Figure 79 : Chromatogramme illustrant le profil obtenu par HPLC à 280 nm en cours de réaction, révélant la pré	ésence de BF,
d'indole (étalon interne) et de TB	
Figure 80 : Cinétiques de transformation de la brévianamide F conduites à partir de 220 µg d'enzyme purifiée e	en tube
Eppendorf [®] (courbe verte) puis en ballon après montée en échelle (courbe rose).	
Figure 81 : Conversion de la brévianamide F en tryprostatine B, faisant intervenir l'isopentenyl phosphate kinas	se de <i>M.</i>
vannielii et la prényl transférase d'A. fumigatus.	
Figure 82 : Cinétiques illustrant l'effet de la variation de la quantité utilisée d'IPK _{Mv} sur la conversion de la brév	ianamide F,
ainsi que la montée en échelle pour l'une des conditions testées.	
Figure 83 : Preuve de concept pour la synthèse de la TB, en trois étapes enzymatiques à partir de BF et de DMA	AOH 13:
Figure 84 : Cinétique de transformation de la BF au sein de la cascade à 3 étapes comme preuve de concept	
Figure 85 : Système de recyclage de l'ATP catalysé par la pyruvate kinase à partir de PEP, appliqué à la preuve	de concept à
3 étapes enzymatiques	
Figure 86 · Spectres RMN ³¹ P décounlé ¹ H de l'ATP et de l'ADP et cinétiques d'hydrolyse associées	14
Figure 87 · Spectre RMN ³¹ P découplé ¹¹ H du PEP et cinétique d'hydrolyse associée	14
Figure 88 : Spectres RMN ³¹ P découplé ¹ H du DMAP et du DMAPP et cinétiques d'hydrolyse associées	14
Figure 89 : Granhique des effets principaux et interactions sur le taux de conversion de la BE à 24 h (Y)	14
Figure 90 : Effet d'interaction de premier ordre entre la concentration en DMAOH (abscisse) et la quantité de E	
(lignes pointillées) sur le taux de conversion de la BE en fin de réaction (ordonnée)	1 <i>1</i>
Figure 91 : Grannes représentant les cinétiques liées aux expériences 6 et 8 du plan factoriel complet avant pa	±-+
d'atteindre les plus bautes valeurs de conversion de la BE en 24 h	15
a accondice les plus flautes valeurs de conversion de la BE sur 24 h. à l'áchalla prénerative avant (courbe rose), et à l'iscu	
r_{B} (synériences et de l'antimisation de la brisul 24 il, a reclience preparative avail (courbe rose) et d l'issi d'avnáriences et de l'antimisation d'annort d'ATP (courbe avange)	ue uu pidii 1=:
$u \in Aperiences et ue i optimisation u apport u Arr (LOUIDE Oldlige)$	
thereestating P in vive	- ue 1
$r_{\rm pprostatilie} = r_{\rm prost}$	
Figure 94 : Biosynthese du cofacteur Thur, d'après Minara et dl. (Tani et dl., 2016)	

Figure 95 : Structures tertiaire et quaternaire de ThiM de B. subtilis (Campobasso et al., 2000) et alignement des séquences
primaires de ThiM d'E. coli et de B. subtilis (Tani et al., 2016)
Figure 96 : Sites de fixation du substrat Thz des hydroxyéthylthiazole kinases de K. pneumoniae, B. subtilis et S. aureus,
figure adaptée de la publication de Chen et al., 2019
Figure 97 : Profils d'expression et de purification de ThiM _{Ec} 172
Figure 98 : Mini-voie des terpènes 2.0 et cascade enzymatique à trois étapes conduisant à la conversion de la brévianamide
F en tryprostatine B, dont chaque étape est respectivement catalysée par la kinase ThiM _{Ec} , l'IPK _{Mv} et la prényl
transférase FtmPT1 _{Af}
Figure 99 : Cinétiques de conversion de la brévianamide F en tryprostatine B, catalysées par ThiM _{Ec} , IPK _{Mv} et FtmPT1 _{Af} , en
présence (courbe orange) et en absence (courbe violette) de recyclage d'ATP in situ
Figure 100 : Structures des substrats non-naturels acceptés par les IPKs de <i>M. thermautrophicus et T. acidophilum</i> , d'après
les travaux du groupe de Poulter (<i>Chen et al., 2010</i>)179
Figure 101 : Dérivés cycliques de la tryprostatine B envisagés par introduction des alcools cyclopropylidèn-, cyclobutylidèn-
et cyclopentylidènéthanol
Figure 102 : Cinétiques de conversion de la brévianamide F en tryprostatine B, à partir du DMAOH (courbe orange), du
dérivé cyclobutyle (courbe violette), du dérivé cyclopentyle (courbe bleue) et du dérivé cyclopropyle (courbe verte).
Figure 103 : La mini-voie des terpènes 2.0 appliquée à la synthèse du sesquiterpène amorphadiène, précurseur de
l'artémisinine, pour exemple
Figure 104 : Cascade de référence pour la synthèse de FPP à partir des alcools en C5
Figure 105 : Criblage des facteurs influençant la biosynthèse de FPP en trois étapes, catalysées par ThiM _{EC} , IPK _{MV} et FPPS _{Gs} à
parti de DMAOH et d'IOH
Figure 106 : Graphique des effets et des effets totaux résultant de l'analyse statistique du criblage effectué sur les sept
facteurs sélectionnés
Figure 107 : Cascades enzymatiques mises en place pour la synthèse de FPP et de son dérivé cyclobutyle
Figure 108 : Chromatogrammes indiquant les produits obtenus par cyclisation du FPP (synthèse chimique) catalysée par les
TS-1, 2, 3 et 5
Figure 109 : Strucures potentielles des sesquiterpènes générés par les TS-1, 2, 3 et 5, à partir du FPP 200
Figure 110 : Structures des antibiotiques utilisés. A droite, le noyau β-lactame de l'ampicilline est mis en évidence par un
fond coloré
Figure 111 : Carte de restriction du vecteur d'expression pET22b(+)
Figure 112 : Carte du vecteur d'expression pHTP1
Figure 113 : Marqueur de poids moléculaire SmartLadder (Eurogentec [®]) 212
Figure 114 : Séquence annotée de la zone de clonage du vecteur pHTP0 213
Figure 115 : Séquence annotée de la zone de clonage du vecteur pHTP1213
Figure 116 : Marqueur de poids moléculaire Euromedex #06p-0211 223
Figure 117 : Test colorimétrique révélant l'activité phosphatase PhoN _{xt}
Figure 118 : Courbe étalon du 4-nitrophénol, produit de la réaction d'hydrolyse par PhoN _{xt}
Figure 119 : Principe du test d'activité kinase appliqué à l'IPK _{Mv}
Figure 120 : Application du test au vert de malachite à la détermination de l'activité prényl transférase FtmPT1 _{Af} (haut) ou
terpène synthase (bas)
Figure 121 : Courbes étalons du phosphate ou diphosphate dans les conditions expérimentales, en présence de PPase 234

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des terpènes et précurseurs linéaires de chaque classe, obtenus par condensation de type 2	L'-4
« tête-à-queue » et 1'-1 « tête-à-tête »	16
Tableau 2 : Exemples de prényl transférases aromatiques du groupe ABBA et leur substrats (adapté de Winkelblech	et al.,
2015 et de T. Mori, 2020)	45
Tableau 3 : Exemples de prényl transférases aromatiques du groupe DMATS et leur substrats (adapté de Winkelblech	1 et <i>al.,</i>
2015)	49
Tableau 4 : Caractéristiques des trois classes de phosphatases acides non-spécifiques	88
Tableau 5 : Paramètres cinétiques de l'IPK de M. jannaschii sauvage et du mutant H60Q déterminés à 25°C par Della	s et
collaborateurs, 2010	98
Tableau 6 : Principales caractéristiques structurales des IPKs procaryotes décrites, caractérisées et dont la structure	
cristalline a été résolue	115
Tableau 7 : Caractéristiques prédites à partir de la séquence en acides aminés de FtmPT1 _{Af}	119
Tableau 8 : Quantification des catalyseurs utilisés en bioconversion	133
Tableau 9 : Caractéristiques des systèmes de régénération d'ATP in situ à partir d'ADP.	136
Tableau 10 : Plan d'expériences pour l'étude de l'influence et des interactions entre la concentration en substrat et l	es
quantités de catalyseurs PhoN _{xt} et FtmPT1 _{Af}	145
Tableau 11 : Conditions expérimentales pour les variantes de l'expérience 6 du plan d'expériences afin de modifier l'	apport
d'ATP au sein de la cascade	152
Tableau 12 : Caractéristiques prédites à partir de la séquence en acides aminés de ThiM _{Ec}	167
Tableau 13 : Conditions testées pour le développement de la MVT en présence de ThiM _{Ec}	175
Tableau 14 : Activités relatives de ThiM _{Ec} sur les différents alcools testés au cours de ces travaux de thèse	182
Tableau 15 : Plan d'expériences pour le criblage des facteurs influençant le rendement en FPP.	191
Tableau 16 : Composition des milieux de cultures et fournisseurs correspondants.	206
Tableau 17 : Caractéristiques des vecteurs de clonage et d'expression utilisés dans cette étude.	209
Tableau 18 : Souches d' <i>E. coli</i> mises en jeu	210
Tableau 19 : Liste des enzymes d'intérêt	210
Tableau 20 : Composition du mélange réactionnel pour amplification par PCR du gène ftmPT1	214
Tableau 21 : Conditions pour l'amplification PCR.	214
Tableau 22 : Composition des mélanges réactionnels pour la digestion des gènes synthétiques et du vecteur.	215
Tableau 23 : Composition des mélanges réactionnels de ligation	216
Tableau 24 : Liste des souches recombinantes mises en jeu dans ce travail de thèse.	216
Tableau 25 : Paramètres de culture et d'induction pour chacune des enzymes d'intérêt étudiées	219
Tableau 26 : Préparation des échantillons pour analyse par SDS-PAGE	222
Tableau 27 : Composition des solutions utilisées pour la coloration et la décoloration des gels SDS-PAGE	224
Tableau 28 : Conditions expérimentales du test d'activité kinase.	232
Tableau 29 : Conditions du test colorimétrique au vert de malachite selon le type d'enzyme étudié	234
Tableau 30 : Mise au point de la synthèse de TB en une étape enzymatique catalysée par FtmPT1 _{Af}	237

Tableau 31 : Synthèse de TB en une étape enzymatique catalysée par FtmPT1 _{Af}	237
Tableau 32 : Mise au point de la synthèse à deux enzymes (IPK $_{Mv}$ et FtmPT1 $_{Af}$)	238
Tableau 33 : Développement de la cascade à trois enzymes	238
Tableau 34 : Matrice d'expériences du plan factoriel 2 ³ appliqué à la synthèse <i>in vitro</i> de la TB	239
Tableau 35 : Conditions des synthèses préparatives engagées à l'issue du plan d'expériences.	240
Tableau 36 : Premiers essais de synthèse de TB via la mini-voie 2.0	241
Tableau 37 : Première synthèse préparative via la mini-voie des terpènes 2.0	242
Tableau 38 : Synthèse de TB et d'analogues cycliques à l'échelle analytique par la MVT 2.0	242
Tableau 39 : Synthèse préparative du dérivé cyclobutyle de la TB	243
Tableau 40 : Essais en Eppendorf [®] pour la synthèse de FPP <i>via</i> la MVT 2.0	245
Tableau 41 : Matrice d'expériences pour le criblage de différents facteurs influençant le rendement en FPP	246
Tableau 42 : Conditions expérimentales pour la synthèse à l'échelle préparative de FPP et de son dérivé cyclique	247
Tableau 43 : Première synthèse à l'échelle analytique d'un sesquiterpénoïde via la MVT 2.0, à laquelle ont été ajoutées	; la
FPPS _{Gs} et la TS-1 de <i>L. menziesii</i>	249

Liste des abréviations et sigles

AAKs	amino acid kinases	LDH	lactate déshydrogénase
ADN	acide désoxyribonucléique	LIC	ligation independent cloning
ADP	adénosine diphosphate	LSU	large subunit
AMP	adénosine monophosphate	MEP	(voie du) méthylérythritol
ANR	Agence Nationale de la		phosphate
	Recherche	MVA	(voie du) mévalonate
ARN	acide ribonucléique	MVT	mini-voie des terpènes
АТР	adénosine triphosphate	NADH	nicotinamide adénine
BF	brévianamide F		dinucléotide
BLAST	basic local alignment search tool	NAGK	N-acétyl-L-glutamate kinase
BLOSUM	blocks substitution matrix	NSAPs	nonspecific acid phosphatases
CPG	chromatographie en phase	NTA	acide nitrilotriacétique
	gazeuse	Pase	phosphatase
DMAOH	diméthylallyl alcool	PA	phosphatase acide
DMAP	diméthylallyl phosphate	PCR	polymerase chain reaction
DMAPP	diméthylallyl diphosphate	PDB	protein data bank
DMATS	diméthylallyl tryptophane	рН	potentiel hydrogène
	synthase	pHi	potentiel hydrogène au point
DMSO	dimethylsulfoxide		isoélectrique
DMF	dimethylformamide	РК	pyruvate kinase
DO	densité optique	pNPP	para-nitrophénylphosphate
DTT	dithiothréitol	PPase	pyrophosphatase
GRAVY	grand average of hydropathy	PTase	prényl transférase
HPLC	high performance liquid	QM/MM	quantum mechanics/molecular
	chromatography		mechanics
ЮН	isopenténol	QSP	quantité suffisante pour
IP	isopentényl phosphate	Rpm	rotation par minute
IPK	isopentényl phosphate kinase	SDS	sodium dodécyl sulfate
IPP	isopentényl diphosphate	SSU	small subunit
IPTG	isopropyl-β-D-	ТВ	tryprostatine B
	thiogalactopyranoside	TBm	terrific broth medium
LB	lysogeny broth	TS	terpene synthase
LC-MS	liquid chromatography-mass	TTN	total turnover number
	spectrometry		

Introduction

La nature est un excellent chimiste¹, pour preuve l'immense diversité de produits naturels que l'on peut extraire, en particulier des plantes, ou faire produire par des microorganismes tels que des champignons, des levures et des bactéries. Sans être exhaustif, on peut citer les métabolites primaires (glucides, lipides, acides aminés, acides nucléiques) et surtout les métabolites spécialisés (terpénoïdes, polyphénols, alcaloïdes, polycétides, peptides non-ribosomaux...). Ces derniers ont été et sont toujours particulièrement utiles à l'humanité dans les domaines de la santé, des cosmétiques et de l'agro-alimentaire².

Tout naturellement s'est posée, au fur et à mesure de la découverte de ces métabolites et de la mise en évidence de leur intérêt potentiel, la question de leur production. Si l'extraction fut la première méthode appliquée pour la récupération de molécules actives, la synthèse chimique est très vite venue suppléer le coût de l'extraction, le manque de rendement et de matières premières (disponibilité saisonnière le plus souvent dans le cas des plantes et/ou temps de croissance)³. Toutefois, en raison de l'extrême complexité structurale de ces composés, qui généralement présentent plusieurs centres stéréogènes et sont de nature polycyclique, la chimie de synthèse ne permet pas toujours des productions en quantité à des prix acceptables³.

Dans le cas de métabolites spécialisés microbiens, il est possible de faire produire par le microorganisme naturel le composé d'intérêt⁴. Ce fut en particulier le cas de la production de la pénicilline dans les années 40-50, production associée au développement du génie microbiologique. Cependant, le microorganisme producteur n'est pas forcément simple à cultiver et la productivité est souvent initialement très faible, nécessitant de très nombreuses expériences de mutation/sélection pour augmenter le titre en produit d'intérêt. Pour reprendre l'exemple de la pénicilline, la souche initiale d'Alexander Flemming produisait 0.2 U/mL, à l'heure actuelle les meilleures souches produisent plus de 70000 U/mL⁵ (soit 350000 fois plus). Cette faible productivité initiale est étroitement liée au fait que tous les produits naturels sont synthétisés par des voies de biosynthèse impliquant un certain nombre d'étapes enzymatiques. Ces voies sont parfaitement régulées, évitant ainsi au microorganisme producteur de gaspiller une source de carbone et d'énergie précieuse. Ainsi, l'approche mutagène aléatoire est une solution envisagée permettant au hasard de générer des mutations bénéfiques qui, lorsqu'elles sont cumulées, conduisent à des augmentations de production substantielles, au prix d'un travail long et fastidieux. Seulement, ce travail est à reprendre pour chaque couple métabolite/microorganisme. Il est donc d'intérêt, pour contourner cette problématique, de pouvoir d'une part accéder facilement aux gènes puis aux enzymes d'une voie métabolique, et, d'autre part, de disposer d'un châssis microbien unique au sein duquel il est possible d'introduire ces gènes.

En raison des connaissances accumulées sur la bactérie E. coli et les levures S. cerevisiae et P. pastoris, ces dernières sont devenues les microorganismes de prédilection en biologie moléculaire. Il est, à l'heure actuelle, aisé d'introduire et/ou d'éliminer un ou plusieurs gène(s) au sein du génome de ces microorganismes soit pour produire des enzymes d'intérêt, soit pour y établir une voie de biosynthèse hétérologue. D'autre part, suite aux différents projets de séquençage complet de génomes, par exemple celui de l'homme⁶, se sont développées les techniques de séquençage haut débit. Actuellement, ces avancées technologiques permettent de séquencer le génome d'innombrables organismes à très faible coût et d'accéder ainsi à une quantité considérable de données. L'essor de la bio-informatique et le développement des banques de données offrent désormais la possibilité d'identifier et d'étudier in silico les différentes voies de biosynthèse d'un organisme et en particulier d'un microorganisme. De ce fait, il est par la suite possible de reconstituer de manière hétérologue, chez un hôte de choix, une voie métabolique complète et « sur-mesure » pour la synthèse enzymatique de composés naturels³. Une autre démarche envisageable est de produire et de purifier les enzymes de cette voie pour la conception d'une cascade enzymatique in vitro⁷. Quelle que soit l'approche considérée, elle constitue une alternative de choix à la synthèse chimique d'autant plus intéressante que la source de carbone impliquée est renouvelable (oses ou lipides), à la différence de la source de carbone fossile que constitue le pétrole utilisé par la chimie. La biotechnologie, puisque c'est d'elle dont il s'agit, permet une approche de « chimie verte » susceptible de gagner en popularité du fait qu'elle conduit à une synthèse économique, efficace et ancrée dans une démarche écoresponsable.

C'est dans ce contexte que s'est inscrit le travail de thèse présenté dans ce manuscrit. Les composés naturels auxquels nous nous sommes intéressés sont les terpènes et de façon plus générale les terpénoïdes. Ceux-ci constituent la première classe de composés naturels avec plus de 80000 structures décrites à ce jour dans la littérature, soit près du tiers des composés naturels actuellement recensés⁸. Dans cette famille très dense et diverse, de nombreux composés possèdent des propriétés biologiques et/ou physicochimiques d'intérêt pour des applications dans le secteur des cosmétiques, des arômes et parfums⁹⁻¹¹, de l'agroalimentaire^{12,13} mais également en thérapeutique^{14,15}. On peut citer des composés aromatiques comme le menthol ou le limonène, des colorants comme le βcarotène et la zéaxanthine, des composés à activité biologique comme le taxol et l'artémisinine et un polymère comme le caoutchouc. Cette classe de composés naturels est donc d'un très grand intérêt économique¹⁶. Concernant leur biosynthèse, elle peut être divisée en deux parties. Une première partie, commune à tous les terpènes, conduit à leurs précurseurs universels que sont les diphosphates d'isopentényle (IPP) et de diméthylallyle (DMAPP)¹⁷. La deuxième partie est, quant à elle, spécifique à chaque molécule terpénique.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons souhaité raccourcir considérablement la première partie de la voie de biosynthèse, passant de 18 à 2 enzymes. Nous avons pour cela conçu une nouvelle voie non plus basée sur la source de carbone principale du monde vivant *i.e.* le glucose, mais sur deux composés de commodité de l'industrie chimique que sont l'isopenténol et l'alcool diméthylallylique. Ces derniers présentent l'avantage d'être biosourçables à partir d'isobutène et de formol, grâce à la réaction de Prins^{18,19}. Une fois établie la validité de l'approche nous avons appliqué cette nouvelle voie de biosynthèse des terpènes à l'obtention de différents composés par une approche *in vitro* mettant en œuvre différentes cascades enzymatiques. Dans une dernière approche nous avons exploré la potentialité de diversifier l'espace chimique des terpènes enzymatiquement accessibles, ce que nous avons testé en synthétisant des dérivés terpéniques possédant en partie terminale non plus un groupement gem-diméthyle mais un groupement cyclobutyle.





Chapitre I Etat de l'art

Α.	INTRODUCTION	13
Β.	BIOSYNTHESE DES TERPENOÏDES	20
Ι.	Les précurseurs universels IPP et DMAPP	20
a	. La voie du mevalonate (MVA)	20
b	. La voie du méthylérythritol phosphate (MEP)	26
П	Les terpénoïdes	34
a	. Les prényl transférases	34
1.	LES PRENYL TRANSFERASES LINEAIRES	35
11.	LES PRENYL TRANSFERASES AROMATIQUES	41
b	. Les terpène synthases	55
1.	LES TERPENE SYNTHASES DE TYPE I	55
11.	Les terpene synthases de type II	56
<i>III</i> .	QUELQUES EXEMPLES DE TERPENE SYNTHASES	58
C.	LA BIOLOGIE SYNTHETIQUE POUR LA PRODUCTION DE TERPENES	72

A. INTRODUCTION

À l'origine, le terme « terpènes » était associé aux hydrocarbures contenus dans la térébenthine, oléorésine produite par les conifères et térébinthacées²⁰. Ce terme est par la suite appliqué à l'ensemble des hydrocarbures dont la formule brute est un multiple de celle de l'isoprène (C₅H₈), répondant ainsi à la règle du même nom établie par Ruzicka²¹. Les hydrocarbures peuvent être modifiés et sont alors principalement retrouvés sous la forme d'alcools, d'éthers, d'aldéhydes, de cétones, d'acides carboxyliques, d'esters et de glycosides.²² Ces dérivés terpéniques sont groupés sous le nom de terpénoïdes ou d'isoprénoïdes, dénomination désormais généralisée à l'ensemble des composés terpéniques (hydrocarbures et dérivés)^{22,23}.

À ce jour, près de 80000 terpénoïdes ont été décrits^{8,24,25} constituant ainsi la classe de produits naturels la plus abondante - en représentant près d'un tiers des composés actuellement caractérisés dans le Dictionnaire des Produits Naturels⁸. C'est également une classe diversifiée d'un point de vue structural et fonctionnel^{17,25,26}. Bien que ces composés aient été pour la plupart identifiés au sein de plantes¹², ils sont également produits par des bactéries^{27–30}, des animaux notamment des insectes^{31,32} et des champignons^{33–35}. Majoritairement considérés comme métabolites spécialisés, quelques terpénoïdes sont cependant des métabolites primaires assurant ainsi des fonctions essentielles pour les organismes vivants^{12,24,36,37}. C'est par exemple le cas des caroténoïdes en tant que pigments photosynthétiques³⁸ et des phytostérols impliqués dans l'architecture des membranes cellulaires, la croissance et le développement des plantes (hormones)³⁹.

De plus, ces composés naturels couvrent un large éventail d'applications du fait de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques variées, les rendant ainsi de plus en plus attractifs auprès de la communauté scientifique¹⁷. En effet, ils sont utilisés par exemple dans les secteurs des cosmétiques, des produits d'hygiène, des arômes et parfums, notamment pour leurs propriétés anti-oxydantes^{10,11} et odorantes^{9,13}. En thérapeutique, ils entrent dans la composition d'huiles essentielles leur conférant, à titre d'exemple, des propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antivirales (huile essentielle d'Arbre à thé)¹⁴, anti-inflammatoires (huiles essentielles d'Eucalyptus)⁴⁰⁻⁴² et sont les précurseurs de médicaments¹⁵ à visée anti-cancéreuse (Taxadiène, précurseur du Taxol)^{43,44} et antipaludique (Amorphadiène, précurseur de l'Artémisinine)⁴⁵.

Enfin, ils sont également retrouvés dans les secteurs de l'agriculture (pesticides, répulsifs)⁴⁶ et de l'alimentation (vitamines, arômes)^{9,12}, et offrent une alternative dans le domaine des biocarburants en tant qu'analogues et additifs^{9,47,48}.

Bien que les terpénoïdes représentent une importante diversité structurale et fonctionnelle, ils ont pour origine synthétique uniquement deux esters de diphosphate à cinq atomes de carbone (C₅, précurseurs universels) : le diphosphate d'isopentényle (IPP) et l'isomère allylique correspondant, le diphosphate de diméthylallyle (DMAPP). Ces derniers sont obtenus selon deux voies de biosynthèse distinctes *i*) la voie du mévalonate (MVA) à partir de l'acétyl-CoA⁴⁹⁻⁵³ et *ii*) la voie du méthylérythritol phosphate (MEP) à partir du pyruvate et du *D*-glycéraldéhyde phosphate⁵⁴⁻⁵⁷ (Figure 1). La voie du mévalonate est retrouvée majoritairement au sein des archées et des eucaryotes ; la plupart des bactéries utilisent la voie du MEP pour l'obtention d'isoprénoïdes⁵⁸⁻⁶⁰. Les plantes ainsi que certaines algues sont dotées des deux voies de biosynthèse, chacune située dans un compartiment différent, à savoir le plaste (MEP) et le cytosol (MVA)⁶¹.

Les composés terpéniques, ainsi synthétisés, sont répartis selon le nombre d'unités constitutives à cinq atomes de carbone, donnant lieu aux classes suivantes : monoterpènes (C_{10} , 2 unités), sesquiterpènes (C_{15} , 3 unités), diterpènes (C_{20} , 4 unités), triterpènes (C_{30} , 6 unités) et tetraterpènes (C_{40} , 8 unités) (Figure 1). Les hémiterpènes (C_5 , 1 unité)⁶², les sesterterpènes (C_{25} , 5 unités)⁶³, les sesquarterpènes (C_{35} , 7 unités)⁶⁴ et les polyterpènes (> C_{40})⁶⁵ viennent compléter la classification. Il existe également les meroterpènes qui sont des produits naturels issus d'une biosynthèse mixte incluant un motif terpénique (prénylation)^{66,67} et les homoterpènes (considérés comme terpènes irréguliers : C_{11} et C_{16}) obtenus après élimination ou addition de carbone^{68,69}.





L'obtention des terpènes résulte, dans un premier temps, de l'action d'enzymes particulières les prényl transférases ou prényl élongases^{24,70}. Elles catalysent la formation des précurseurs linéaires des monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes et sesterterpènes *i.e.* les diphosphates de géranyle (GPP, C₁₀), de farnésyle (FPP, C₁₅), de géranylgéranyle (GGPP, C₂₀) et de géranylfarnésyle (GFPP, C₂₅) respectivement, dont la longueur de la chaîne aliphatique varie en fonction du nombre de molécules d'IPP condensées sur la molécule de DMAPP^{8,25} (Figure 1, Tableau 1). La condensation de ces unités est généralement de type 1'-4 ou communément nommée « tête-à-queue »^{70,71}. Les triterpènes et tetraterpènes résultent respectivement de la condensation de type 1'-1 ou « tête-à-tête » de deux FPP (formation du squalène, précurseur des triterpènes C₄₀)^{17,72,73} (Tableau 1).

Cx	Préfixe	Précurseur(s) isoprénique(s) linéaire(s)	Type(s) de condensation
5	Hemi-	DMAPP dueue IPP	Aucune
10	Mono-	GPP	« Tête-à-queue » (1'-4)
15	Sesqui-	FPP	« Tête-à-queue » (1'-4)
20	Di-	GGPP	« Tête-à-queue » (1'-4)
25	Sester-	GFPP	« Tête-à-queue » (1'-4)
30	Tri-	tête tête Squalène	« Tête-à-tête » (1'-1) « Tête-à-queue » (1'-4)

Tableau 1 : Classification des terpènes et précurseurs linéaires de chaque classe, obtenus par condensation de type 1'-4 « tête-à-queue » et 1'-1 « tête-à-tête ».

Le DMAPP est représenté en vert, l'IPP en rose. Le squalène résulte de la condensation « tête-à-tête » de deux molécules de FPP. La classe des tetraterpènes n'est pas réprésentée, le précurseur résulte de l'addition de deux GGPP condensés par un mécanisme « tête-à-tête ».

Ces différents hydrocarbures peuvent par la suite être fonctionnalisés, transformation(s) consistant le plus souvent en une cyclisation par des terpènes synthases ou cyclases⁷⁴, en l'incorporation d'atome(s) d'oxygène grâce à des cytochromes P450⁷⁵⁻⁷⁷ et/ou en des réarrangements intramoléculaires⁷⁵. Ces modifications conduisent à une multitude de composés le plus souvent mono- ou polycycliques possédant de nombreux centres stéréogènes^{8,25,74}.

Récemment, le groupe de Wu a combiné des approches chémo- et bio- informatiques diverses en vue d'explorer l'espace chimique et biologique qu'offre l'ensemble des terpénoïdes et ainsi illustrer la diversité structurale caractéristique de cette famille de composés²⁵. Pour ce faire, ils ont réalisé une étude représentative sur plus de 70000 terpénoïdes décrits et caractérisés. Une première analyse a permis de proposer une répartition des terpénoïdes basée soit sur la classification générale des terpènes, soit sur l'organisme vivant d'origine (plantes, animaux, bactéries, champignons). Il apparait ainsi que les tri-, di- et sesqui- terpénoïdes (C₃₀, C₂₀ et C₁₅, respectivement) représentent à eux seuls - dans des proportions équivalentes - 84 % des composés terpéniques analysés. Cette étude confirme également que la majorité (près de 80 %) de ces composés sont produits par des plantes. De plus, il est intéressant de noter que la plupart des terpénoïdes ont une origine unique (> 98 %), que 19 terpénoïdes seulement (0,02 %) sont retrouvés au sein de trois catégories et qu'aucun n'est commun à la fois aux plantes, bactéries, animaux et champignons (Figure 2).



Figure 2 : Répartition des terpénoïdes selon leur organisme d'origine, adaptée des travaux de Wu et collaborateurs (Zeng *et al.,* 2019).

Les nombres d'intérêt en gras sont en noir pour les terpénoïdes d'origine unique, en bleu lorsque l'origine est double, en magenta lorsqu'elle est triple et en rouge pour ceux communs aux quatre catégories représentées. Cette étude fournit également des informations structurales généralisables à l'ensemble des terpènes. En effet, par comparaison avec un ensemble de composés nonterpéniques, des caractéristiques ont pu être proposées telles que l'occurrence et la nature des systèmes cycliques ou encore les structures de base les plus fréquemment rencontrées. Ainsi, les isoprénoïdes semblent se distinguer par une majorité de systèmes cycliques (> 98 %) dont la part de cycles non-aromatiques est prédominante. Au sein de ces 98 % de composés cycliques, la diversité structurale est proche de 33 %. A titre informatif, les composés non-terpéniques ont une proportion de systèmes cycliques moindre (90 %), et par opposition sont préférentiellement composés de cycle(s) aromatique(s). La détermination des 50 structures de base les plus fréquentes au sein des terpénoïdes* (Figure 3) illustre bien la diversité structurale de cette famille de composés. Ainsi, Wu et collaborateurs présentent pour chaque structure, sous la forme d'un histogramme, sa fréquence en fonction de la classe terpénique considérée (mono-, sesqui-, di-, tri- et autres terpénoïdes).

^{*} Bemis et Murcko ont développé une méthode simple pour l'identification des squelettes à partir de structures moléculaires à deux dimensions, en considérant toutes les liaisons comme simple et en ne représentant que les cycles et atomes les connectant ou hétéroatomes. Les « décorations » ne sont donc pas considérées⁷⁸.





La première et plus fréquente structure est située en haut à gauche, la lecture et la numérotaiton se font à partir de ce point, en ligne et de gauche à droite. Les histogrammes sous chaque structure représentent la fréquence de cette structure dans une classe de terpénoïdes particulière : monoterpénoïdes (C10, jaune), sesquiterpénoïdes (C₁₅, vert), diterpénoïdes (C₂₀, bleu), triterpénoïdes (C₃₀, orange).
Parmi ces 50 squelettes, les cycles à six atomes de carbone sont communs, les structures multi-cycliques résultent le plus souvent d'une fusion de cycles et les motifs tetra- et penta- cycliques sont majoritaires. Il est également possible d'associer à une classe de terpénoïdes un motif caractéristique. Par exemple, les monoterpénoïdes (bâton jaune) sont les seuls à présenter le squelette n°21 (encadré en noir, Figure 3), les sesquiterpénoïdes (bâton vert) sont caractérisés par des squelettes bicycliques. Enfin, les diterpénoïdes (bâton bleu) sont davantage retrouvés sous forme tri- et tetra- cyclique et les triterpénoïdes (bâton orange) sont principalement constitués de quatre et cinq cycles. Les structures monocycliques sont quant à elles communes à l'ensemble des terpénoïdes.

Cette diversité structurale est d'autant plus surprenante qu'elle apparaît dans une classe de composés naturels majoritairement produits par des plantes et résultant de la condensation uniquement de deux briques moléculaires que sont l'IPP et le DMAPP. Cela suggère une importante diversité au niveau notamment des terpènes synthases ou cyclases intervenant en fin de biosynthèse des terpénoïdes (Chapitre IB.II.b).

Par la suite, ce chapitre se focalisera sur des points clés que sont la biosynthèse de l'IPP et du DMAPP *via* les voies du mévalonate et du méthylérythrytol phosphate puis celle des isoprénoïdes. Les différents types d'enzymes impliqués dans l'obtention des terpénoïdes *i.e.* les prényl transférases générant les précurseurs linéaires puis les terpènes synthases ou cyclases seront présentées plus en détails. Une dernière partie donnera une vision d'ensemble de l'apport de la biologie de synthèse dans la production de terpénoïdes *in vivo*.

B. BIOSYNTHESE DES TERPENOÏDES

I. Les précurseurs universels IPP et DMAPP

a. La voie du mévalonate (MVA)

Plusieurs travaux ont été publiés au milieu du XX^{ème} siècle, centrés sur la biosynthèse du cholestérol et mettant en jeu des expériences de traçages isotopiques^{79–84}. Ces expérimentations associées aux hypothèses d'une origine commune des terpènes²¹ ainsi qu'à l'obtention du cholestérol par cyclisation du squalène⁸² ont permis d'initier l'élucidation de la voie du mévalonate, telle que nous la connaissons aujourd'hui^{53,58} (Figure 4).



Figure 4 : Voie du mévalonate et alternatives métaboliques retrouvées chez les archées, adaptée de Vinokur et collaborateurs (Vinokur *et al.*, 2016).

Les eucaryotes, les archées de l'ordre des Sulfolobales ainsi que quelques bactéries possèdent la voie du MVA dite « classique ». Les archées utilisent l'alternative MPD pour synthétiser l'IPP et le DMAPP, enfin les archées du genre Thermoplasma semblent posséder une autre voie alternative, nommée M3K. Chez les eucaryotes (cytoplasme) et les archées, les isoprénoïdes sont synthétisés *via* la voie du mévalonate^{85,86} (Figure 4). Certaines bactéries sont également dotées de cette voie métabolique, c'est par exemple le cas des *cocci* Gram-positifs *Streptococcus pneumoniae*⁸⁷, *Staphylococcus aureus*⁸⁸, *Enterrococcus faecalis*⁸⁹, et du spirochète^{*} *Borrelia burgdorferi*⁸⁵. Cette voie de biosynthèse consiste en une succession de sept ou huit étapes enzymatiques, selon l'organisme vivant considéré. Elle permet l'obtention d'IPP et de DMAPP, à partir d'acétyl-coenzyme A (usuellement nommé Acétyl-CoA)^{58,60,73,90} (Figure 4).

Le descriptif de chacune des étapes, intervenant chez les eucaryotes, s'appuie sur deux revues publiées par Miziorko et Dewick respectivement^{60,91} et permet d'illustrer la complexité ainsi que la diversité des réactions régissant cette voie métabolique.

1. Condensation de Claisen entre deux molécules d'acétyl-CoA

La première étape consiste en une condensation analogue à la condensation de Claisen entre deux molécules d'acétyl-CoA⁹², catalysée par l'acétoacétyl-CoA thiolase (AACT, EC 2.3.1.9) (Figure 5).





ES : résidus cystéine de l'AACT impliqué dans le mécanisme catalytique.

Cette réaction implique une étape de transfert d'une première molécule d'acétyl-CoA sur une seconde, conduisant à la formation d'un intermédiaire covalent acétyl-S_{cystéine}enzyme^{93,94} et à la libération du coenzyme A (CoA-SH). La déprotonation, en position C₂, de la seconde molécule d'acétyl-CoA initie la condensation et génère ainsi le carbanion correspondant. Ce dernier peut alors réagir sur l'intermédiaire acétyl-S_{cystéine}-enzyme (en position C₁) permettant la synthèse d'acétoacétyl-CoA et la libération de l'AACT (Figure 5).

^{*} Bactéries flexibles de forme spiralée à paroi très mince, se déplaçant par ondulation du filament axial. (Définition extraite du site internet <u>http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio.html</u>, consulté le 03/01/2021).

2. Condensation entre l'acétyl-CoA et l'acétoacétyl-CoA

L'hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase (HMGS, EC 4.1.3.5) catalyse l'addition d'une molécule d'acétyl-CoA supplémentaire⁹⁵ (Figure 6).



Figure 6 : Deuxième étape de la voie du mévalonate, catalysée par l'hydrométhylglutaryl-CoA synthase, d'après H. M. Miziorko (Miziorko, 2011).

De la même façon qu'à l'étape précédente, la réaction débute par la formation d'un intermédiaire acétyl-S_{cystéine}-enzyme⁹⁶ qui est par la suite déprotoné en position C₂ du groupement acétyle. Le carbanion ainsi formé réagit avec le carbone en position 3 de l'acétoacétyl-CoA générant un intermédiaire de type enzyme-S_{cystéine}-HMG-CoA⁹⁶. L'hydrolyse de ce dernier conduit à l'obtention du *(S)*-3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) et à la libération de l'enzyme (Figure 6).

3. Réduction de l'HMG-CoA

L'HMG-CoA réductase NADPH dépendante (HMGR, EC 1.1.1.34) réalise une réduction en deux étapes de l'isomère *(S)* de l'HMG-CoA afin de former le *(R)*-mévalonate (Figure 7).



Figure 7 : Troisième étape de la voie du mévalonate, catalysée par l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase, d'après H. M. Miziorko (Miziorko, 2011).

La première réduction implique un équivalent de NADPH et conduit au mévaldyl-CoA puis au mévaldéhyde, après libération du coenzyme A. La réduction du mévaldéhyde en présence d'un deuxième équivalent de NADPH génère le *(R)*-mévalonate (MVA) (Figure 7).

4. Phosphorylation du mévalonate

La mévalonate kinase (MVK, EC 2.7.1.36) ATP-Mg²⁺ dépendante engage le transfert du groupement phosphate terminal de l'ATP sur le groupement hydroxyle porté par le carbone en position 5 du mévalonate. Cette étape conduit à la synthèse du mévalonate-5-phosphate (MVAP) et à la génération d'ADP (Figure 8).





5. Phosphorylation du phosphate de mévalonate

La phosphorylation du MVAP est conduite par la phosphomévalonate kinase (PMK, EC 2.7.4.2) ATP-Mg²⁺ dépendante qui permet de former le mévalonate-5-diphosphate (MVAPP) et génère la libération d'ADP. Le mécanisme est similaire à celui schématisé pour l'étape précédente, l'oxygène terminal du groupement phosphate du MVAP étant à son tour phosphorylé (Figure 8).

6. Décarboxylation du diphosphate de mévalonate

La mévalonate diphosphate décarboxylase (MDD, EC 4.1.1.33) catalyse la décarboxylation ATP-dépendante du MVAPP. Le mécanisme proposé consiste en une phosphorylation de l'alcool tertiaire du MVAPP, ainsi meilleur groupement partant, facilitant la décarboxylation et la synthèse d'IPP^{97,98} (Figure 9).



Figure 9 : Cinquième étape de la voie du mévalonate, catalysée par la mévalonate diphosphate décarboxylase.

Pi : désigne le groupement PO₃²⁻ lié à l'oxygène

7. Isomérisation de l'IPP

L'isopentényl diphosphate isomérase, Mg²⁺ dépendante⁹⁹ (IDI, EC 5.3.3.2), convertit réversiblement, l'IPP en DMAPP *via* une réaction de réarrangement 1,3-allylique (Figure 10).



Figure 10 : Isomérisation de l'IPP en DMAPP, catalysée par l'isopentényl diphosphate isomérase. *OPP : désigne le groupement diphosphate lié à l'oxygène*

Ce réarrangement implique une protonation au niveau de la double liaison C-C générant un intermédiaire de type carbocation tertiaire^{100,101}. L'isomérisation est alors achevée par élimination d'un proton conduisant à l'obtention du DMAPP, dans un ratio (3 : 7) en faveur du DMAPP^{102,103}.

La voie du mévalonate, telle que décrite ci-dessus, est conservée chez les eucaryotes^{58,85}. Les eubactéries capables de synthétiser les isoprénoïdes à partir de l'acétyl-CoA possèdent une voie du MVA analogue à celle des eucaryotes, tout comme les archées de l'ordre des *Sulfolobales*^{58,86}. Des alternatives à cette voie métabolique ont été mises en évidence notamment au sein de certaines archées⁹⁷ et de la bactérie *Roseiflexus castenholzii*¹⁰⁴ (Figure 4).

Le séquençage de génomes d'archées a permis de révéler la présence de gènes ne codant que certaines des enzymes de la voie du mévalonate⁵⁹. Ces séquençages ont ainsi souligné l'absence, chez la plupart des archées, des gènes codant notamment les enzymes PMK (phosphorylation du phosphate de mévalonate MVAP) et MDD (décarboxylation du MVAPP)^{90,105}. Les travaux de Grochowski et collaborateurs ont révélé l'isopentényl phosphate kinase (IPK) de *Methanocaldococcus jannaschii* capable de convertir l'IP en son dérivé diphosphate IPP¹⁰⁶. La caractérisation de l'IPK associée à la mise en évidence d'une activité phosphomévalonate décarboxylase au sein de la bactérie *Roseiflexus castenholzii*¹⁰⁴ et de l'archée *Haloferax volcanii*¹⁰⁷ ont conduit à envisager un nouvel accès à l'IPP à partir du MVAP. Comme décrit précédemment, chez les eucaryotes le MVAP est premièrement phosphorylé puis décarboxylé (étapes calysées par les enzymes PMK et MDD, respectivement) ; à l'inverse, chez les archées l'IPP est obtenu à partir du MVAP *via* l'action d'une mévalonate phosphate décarboxylase (MPD, EC 4.1.1.99) dans un premier temps, suivie d'une étape de phosphorylation catalysée par une IPK (EC 2.7.4.26). Cette alternative biosynthétique est alors nommée MPD (Figure 4).

Le groupe de Vinokur propose une deuxième alternative, désignée M3K, basée sur la description de trois nouvelles enzymes de *Thermoplasma acidophilum*. Ces dernières sont impliquées dans la conversion du mévalonate en IP^{97,108,109}. Ainsi, le mévalonate est, dans un premier temps, phosphorylé au niveau du groupement hydroxyle en C₃, par l'action d'une mévalonate-3-kinase ATP-dépendante (M3K, EC 2.7.1.185). La mévalonate 3-phosphate 5-kinase (M3PK, EC 2.7.1.186) catalyse la phosphorylation ATP-dépendante du mévalonate-3-phosphate au niveau du groupement hydroxyle terminal. Les auteurs caractérisent par la suite la mévalonate 3,5-biphosphate décarboxylase (MBD, EC 4.1.1.110) capable de convertir le mévalonate-3,5-diphosphate en IP¹⁰⁸. L'IPP est alors synthétisé par l'IPK (Figure 4).

b. La voie du méthylérythritol phosphate (MEP)

Dès sa découverte, la voie du mévalonate a longtemps été considérée comme l'unique chemin d'accès aux terpénoïdes grâce à la synthèse d'IPP et de DMAPP à partir d'acétyl-CoA^{49,53}. Cependant à partir de 1950, des expériences de traçage isotopique impliquant des substrats et/ou intermédiaires (acétate, mévalonate...) de la synthèse des isoprénoïdes ont remis en question cette unicité. En effet, ces études ont par exemple révélé la non-incorporation du mévalonate marqué au sein de différents isoprénoïdes tels que les caroténoïdes produits par l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa*¹¹⁰ et le maïs⁵¹.

D'une façon similaire, il a été mis en évidence que les bactéries *Agrobacterium tumefaciens, Azotobacter vinelandii* et *Escherichia coli* n'incorporent ni acétate, ni mévalonate marqués lors de la biosynthèse de coenzymes Q^{*}. A l'inverse, les champignons *Aspergillus niger, Neurospora crassa, Penicillium chrysogenum,* et *Gibberella fujickuroi* semblent utiliser la voie du MVA pour la synthèse de coenzymes Q et des stérols¹¹².

Ces incohérences ont conduit à envisager une alternative à la voie du MVA pour la synthèse d'isoprénoïdes : la voie du méthylérythritol phosphate (MEP) élucidée au cours des années 90. En effet, Rohmer et collaborateurs ont étudié la biosynthèse d'hopanoïdes[†] chez *Z. mobilis, A. acidoterrestris, E. coli, M. fujisawaense via* des précurseurs marqués. Ils ont ainsi pu proposer que ces triterpénoïdes soient synthétisés à partir de l'addition d'une unité à deux atomes de carbone, dérivée du pyruvate (décarboxylation), à un triose phosphate (ou dérivé) par une réaction similaire à celle catalysée par une transcétolase⁵⁴. Par la suite, le glycéraldéhyde-3phosphate et le pyruvate ont été identifiés comme précurseurs de l'IPP chez *E. coli*⁵⁵. La voie du MEP ainsi élucidée est composée de sept étapes pour la synthèse de l'IPP et du DMAPP^{53,59,114} (Figure 11), conférant aux bactéries la capacité de synthétiser des isoprénoïdes. Elle est également retrouvée au sein des plastes de plantes et d'algues^{57,61,85}. De la même façon que dans le cadre de la voie du mévalonate, les différentes étapes de cette voie sont présentées séquentiellement, sur la base des travaux de Frank et Groll, Kuzuyama et Seto, et Dewick^{53,91,114} soulignant la diversité des catalyseurs et la complexité des mécanismes qu'ils catalysent.

^{*} Ces composés sont constitués d'un cycle benzoquinone auquel est lié une chaîne polyisoprénique dont la longueur dépend de l'organisme vivant d'origine¹¹¹.

 $^{^{\}dagger}$ Les hopanoïdes sont des triterpénoïdes pentacylcliques (C₃₀) dérivés du squalène et sont retrouvés au sein des bactéries. Ce sont des lipides qui entrent dans la composition de la membrane en régulant la fluidité et la stabilité¹¹³.



Figure 11 : Voie du méthylerythritol phosphate (MEP), adaptée de Dowd et collaborateurs (Wang *et al.,* 2018).

1. Condensation du pyruvate et du glycéraldéhyde-3-phosphate

La première étape de la voie du MEP consiste en une condensation, sur la base des réactions catalysées par les transcétolases¹¹⁵, entre le pyruvate et le D-glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) conduisant à la formation du 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP). Cette réaction est catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS, EC 2.2.1.7) dont l'activité dépend de la présence du cofacteur thiamine diphosphate (ThDP) et de cations divalents de type Mg^{2+ 91} (Figure 12).



Figure 12 : Première étape de la voie du méthylérythritol phosphate (MEP), catalysée par la déoxyxylulose phosphate synthase (adaptée de Frank et Groll, 2017).

Le mécanisme associé nécessite l'activation préalable du ThDP, possiblement au sein du site actif de la DXS. La déprotonation au niveau du carbone C₂ du cycle thiazolium du ThDP génère l'ylure d'azote correspondant (forme active du ThDP). Ce dernier réagit avec le carbone C₂ du pyruvate menant à l'intermédiaire lactyl-thiamine diphosphate (L-ThDP)¹¹⁴. Après décarboxylation, un carbanion est obtenu en équilibre avec la forme énamine, (dénommé aldéhyde activé) engageant ainsi une attaque nucléophile sur le G3P. Une dernière étape de déprotonation libère le DXP et régénère le cofacteur sous sa forme ylure, le rendant disponible pour un nouveau cycle catalytique (Figure 12).

2. Isomérisation et réduction du DXP

La désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR, EC 1.1.1267) catalyse une isomérisation et une réduction NADPH-dépendantes en présence d'un cation divalent, Mn²⁺ de préférence⁹¹. Cette réaction en deux étapes conduit à la synthèse du 2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate (MEP) à partir du DXP (Figure 13).



Figure 13 : Deuxième étape de la voie du méthylérythritol phosphate (MEP), catalysée par la méthylérythritol phosphate synthase (adaptée de Frank et Groll, 2017).

Concernant l'étape d'isomérisation, deux hypothèses mécanistiques sont proposées pour lesquelles le cation divalent agit comme un acide de Lewis, activant le groupement carbonyle du DXP. La première hypothèse repose sur un réarrangement α -cétol permis par la réduction du carbonyle en C₂ et l'arrachement d'un proton au niveau du carbone C₃, générant ainsi l'aldéhyde intermédiaire. La deuxième hypothèse consiste en une réaction de rétroaldolisation/aldolisation. L'hydroxyle porté par le carbone C₄ est déprotoné entrainant ainsi la rupture de la liaison C₃-C₄. Une réaction d'aldolisation entre les deux produits formés permet l'obtention du même intermédiaire aldéhyde, évoqué dans le cadre du réarrangement α -cétol. Cet intermédiaire est ensuite réduit en MEP, en présence de NADPH (Figure 13).

3. Transfert d'un groupement cytidylyle

Cette étape, catalysée par la MEP cytidylyltransférase (MCT, EC 2.7.7.60), consiste en la synthèse du 4-diphosphocytidyl-2-C-méthylérythritol (CDP-ME) en présence de cation divalent. L'attaque nucléophile impliquant le groupement phosphate terminal du MEP et le phosphate α de la cytidine 5'-triphosphate conduit à un intermédiaire pentacoordiné instable. Ce dernier évolue spontanément pour conduire au CDP-ME, libérant le groupement diphosphate (Figure 14).



Figure 14 : Troisième étape de la voie du méthylérythritol phosphate (MEP), catalysée par la MEP cytidylyltransférase (adaptée de Frank et Groll, 2017).

4. Phosphorylation du CDP-ME

La 4-(cytidine-5-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol kinase (CMK, EC 2.7.1.148) catalyse ensuite la phosphorylation ATP-dépendante du groupement hydroxyle en position 2 du CDP-ME. Au sein du site actif de l'enzyme, le CDP-ME est déprotoné et l'attaque nucléophile de ce dernier sur le phosphate terminal de l'ATP conduit à la synthèse du CDP-MEP, *via* un intermédiaire pentacoordiné (Figure 15).



Figure 15 : Quatrième étape de la voie du méthylérythritol phosphate, catalysée par la cytidine diphospho-méthylérythritol kinase (adaptée de Frank et Groll, 2017).

5. Cyclisation intramoléculaire du CDP-MEP

Le 2-C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate (MEcPP) est formé par cyclisation du CDP-MEP. Cette étape est conduite par la MEcPP synthase (MDS, EC 4.6.1.12) en présence de cations divalents de type Zn²⁺ et Mn²⁺ ou Mg²⁺.

Ces derniers agissent en tant qu'acides de Lewis facilitant l'attaque nucléophile du phosphate terminal (MEP) sur le phosphate β de la partie CDP. Une nouvelle fois, la réaction conduit à un intermédiaire pentacoordiné avant d'aboutir au produit MEcPP et à la libération du groupement partant cytidine 5'-monophosphate (CMP) (Figure 16).



Figure 16 : Cinquième étape de la voie du méthylérythritol phosphate (MEP), catalysée par la méthylérythritol cyclodiphosphate synthase (adaptée de Frank et Groll, 2017).

L'étape suivante de la voie du MEP consiste en une élimination intramoléculaire du groupement hydroxyle porté par le carbone C₃ du MEcPP, suivie d'une réduction à deux électrons médiée par un cluster [4Fe-4S]. Cette réaction est catalysée par la 4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate synthase (HDS, EC 1.17.4.3) en présence de NADPH et permet la formation du 1-hydroxy-2-méthyl-2-(*E*)-butényl 4-diphosphate (HMBPP) (Figure 17).



Figure 17 : Réduction du méthylérythritol cyclodiphosphate (MEcPP), catalysée par l'hydroxyméthylbutényl diphosphate synthase en présence de NADPH (donneur d'électrons) (adaptée de Frank et Groll, 2017).

Les résidus glutamate E_{332} et E_{350} sont les résidus impliqués dans le relais de proton dans l'HDS de T. thermophilus (nommée IspG). Les électrons sont apportés par le couple NADPH/NADP⁺ et transférés via le centre [4Fe-4S] au cours du mécanisme. Au début de la catalyse, une première étape non réductrice permet l'ouverture du cycle, par la suite deux électrons apportés au système via le cluster Fe-S conduisent à la formation d'intermédiaires carbocation et carbanion. Enfin, une étape de protonation et le départ d'une molécule d'eau permettent la libération du diphosphate et complètent le cycle catalytique. IET = transfert d'électron intramoléculaire. Pour finir, l'HMBPP subit une réduction bi-électronique, médiée de nouveau par un cluster [4Fe-4S] en présence de NADPH, et concomittante à une élimination du groupement hydroxyle porté par le carbone C₃ de l'HMBPP. L'HMBPP réductase (HDR, EC 1.17.1.2) convertit, lors de cette dernière réaction, l'HMBPP en IPP et en DMAPP (ratio de 5 à 6 : 1 en faveur de l'IPP¹¹⁶⁻¹¹⁸, à l'inverse de la voie du mévalonate où seul l'IPP est le produit directement synthétisé (Figure 18). Une IDI est également présente catalysant, comme décrit en dernière étape de la voie du MVA, l'isomérisation de l'IPP en DMAPP.



Figure 18: Réduction de l'hydroxyméthylbutényl diphosphate (HMBPP), catalysée par l'hydroxyméthylbutényl diphosphate réductase (IspH, *E. coli*) en présence de NADPH (donneur d'électrons) (adaptée de Frank et Groll, 2017).

Cette réduction en deux étapes est initiée par la formation d'un complexe entre le fer apical du cluster Fe-S et le groupement hydroxyle en position C1 de l'HMBPP (intermédiaire 1). L'intermédiaire II est obtenu après réduction monoélectronique du cluster et protonation du groupement hydroxyle via l'intervention du résidu glutamate 126 (IspH, E. coli). Le départ d'une molécule d'eau et la réduction à deux électrons du substrat conduisent à l'intermédiaire III dans lequel le substrat est sous la forme d'un anion allylique. Enfin, une dernière étape de réduction monoélectronique du cluster permet l'obtention de l'IPP et du DMAPP et clôture ainsi le cycle catalytique.

Les microorganismes utilisent en général l'une de ces deux voies pour synthétiser les isoprénoïdes dont ils ont besoin. Cependant, les eucaryotes chlorophylliens (algues et plantes) possèdent pour la plupart les deux voies métaboliques. La voie du MEP est retrouvée au sein du plaste et génère les monoterpènes, les diterpènes et les tetraterpènes. Dans le cytosol, la voie du MVA est impliquée dans la synthèse des sesquiterpènes et triterpènes^{119,120}.

La description de ces voies a permis de souligner que la biosynthèse des précurseurs IPP et DMAPP repose sur un grand nombre d'enzymes catalysant des réactions de réduction, de transfert de groupements ou de condensation, faisant appel à des cofacteurs divers ; CTP, ATP et ThdP. Comme dans toutes voies de biosynthèse, les voies du MVA et du MEP sont finement régulées par le microorganisme, au niveau d'étapes clés. De cette façon, ce dernier contrôle les phénomènes d'inhibition par le produit ou l'accumulation d'intermédiaires toxiques par exemple, afin de centraliser le flux métabolique pour la synthèse des composés d'intérêt, limitant ainsi la surconsommation d'énergie et de glucose. Dans la démarche actuelle de recherche de nouveaux procédés pour la synthèse de produits naturels, la compréhension des voies naturelles de biosynthèse est ainsi indispensable.

II. Les terpénoïdes

Les composés terpéniques de plus d'une unité isoprène nécessitent de condenser une molécule ou plus d'IPP sur une molécule de l'isomère allylique DMAPP, précurseurs synthétisés par les voies décrites précédemment. Cette réaction de condensation est catalysée par des prényl transférases linéaires en opposition aux prényl transférases aromatiques qui, elles, permettent l'alkylation régiospécifique d'un composé aromatique. Une fois les précurseurs linéaires générés, les terpènes synthases entrent en jeu pour la synthèse d'isoprénoïdes.

a. Les prényl transférases

Par définition, ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement prényle sur un substrat de façon régiospécifique. L'une des classifications possibles des prényl transférases (PTases) est basée sur la réaction qu'elles catalysent et la nature du substrat qu'elles utilisent. Ainsi, on distingue notamment les enzymes impliquées dans la synthèse de diphosphates isopréniques linéaires à partir des briques moléculaires IPP et DMAPP¹²¹, de celles catalysant la prénylation d'un composé aromatique¹²². Les prényl transférases aromatiques (A-PTases) sont elles réparties en deux catégories selon leur localisation cellulaire⁸ : les enzymes membranaires¹²³ et les enzymes solubles cytosoliques de type ABBA²⁴. Cette dernière catégorie est elle-même subdivisée en deux sous-familles correspondant aux prényl transférases de type diméthylallyl-tryptophane synthase (DMATS) et aux enzymes de type NphB/CloQ¹²⁴.

i. Les prenyl transferases lineaires

Lors de la biosynthèse des isoprénoïdes, les prényl transférases linéaires catalysent la formation de squelettes carbonnés, différenciés par la longueur de leur chaîne alliphatique. Ces derniers sont les précurseurs linéaires des différentes classes de terpénoïdes (*i.e.* GPP (C₁₀), FPP(C₁₅), GGPP (C₂₀), GFPP (C₂₅)) et résultent de la condensation séquentielle de DMAPP ou d'un autre diphosphate isoprénique avec un ou plusieurs IPP^{24,125}. La réaction de condensation suit généralement un mécanisme classique d'élongation 1'-4 (*i.e.* « tête-à-queue »), cependant d'autres types de condensation peuvent être observés, moins fréquemment, au sein d'isoprénoïdes naturels. C'est par exemple le cas du couplage irrégulier 1'-1 (*i.e.* « tête-à-tête ») ou 1'-2 (*i.e.* « tête-à-milieu »)^{8,24} (Figure 19).



Figure 19 : Les différentes connexions créées par les prényl transférases linéaires. Les unités isopréniques à cinq atomes de carbone sont représentées en noir, la liaison établie par action d'une prényl transférase linéaire est représentée en rose. La condensation 1'-4 (« tête-à-queue ») est décrite comme couplage régulier, les autres sont considérés comme irréguliers.

Selon la stéréochimie de la double liaison créée lors de la condensation (Z)/cis ou (E)/trans, les prényl transférases linéaires peuvent être réparties en deux classes : les cisprényl transférases (cis-PTases) et les trans-prényl transférases (trans-PTases)^{126,127}. Quel que soit le groupe considéré, le mécanisme associé à la réaction de condensation est toujours le même. Il consiste en la formation d'un carbocation allylique suite à la rupture de la liaison ester de diphosphate (ionisation), suivie d'une étape d'alkylation (ou condensation) et d'une élimination stéréospécifique d'un proton. Cette dernière étape est à l'origine de la classification en (Z) et (E) prényl transférases, selon que le proton éliminé du C₂ de l'IPP condensé est pro-S ou pro-R, respectivement^{126,128}. Par souci de clarification, les prényl transférases linéaires seront dénommées prényl élongases, par la suite, pour les distinguer des prényl transférases agissant sur des substrats non linéaires (prényl transférases aromatiques et prénylation des protéines ...).

1. Les trans-prényl élongases ou (E)-prényl élongases

Elles catalysent la condensation séquentielle d'IPP sur le DMAPP, générant les *trans*prényl diphosphates à courte (C₁₀-C₂₅), moyenne (C₃₀-C₃₅) et longue chaîne aliphatique (C₄₀-C₅₀), de 10 à 50 atomes de carbone. Les produits considérés à courte chaîne sont les diphosphates de farnésyle (FPP, C₁₅) et de géranylgéranyle (GGPP, C₂₀). Le diphosphate d'hexaprényle (HexPP, C₃₀) résultant de la condensation d'une molécule de FPP avec trois IPP est un exemple d'un *trans*-prényl diphosphate à chaîne moyenne. Enfin, le diphosphate de type solanésyle (SPP, C₄₅) est un diphosphate à longue chaîne¹²⁶.

Les *trans*-prényl élongases forment le *(E)*-GPP (C₁₀) par condensation d'un équivalent d'IPP sur le DMAPP, puis l'addition d'un IPP supplémentaire sur le GPP conduit au *(E,E)*-FPP (C₁₅). La chaîne aliphatique de ce dernier est allongée d'une unité IPP générant ainsi le *(E,E,E)*-GGPP (C₂₀) et ainsi de suite pour l'obtention du *trans*-GFPP (C₂₅)^{126,129} (Tableau 1). Ces étapes sont respectivement catalysées par une GPP synthase (GPPS), une FPP synthase (FPPS) et une GGPP synthase (GGPPS). Au niveau de leur structure primaire, elles ont en commun les deux mêmes motifs conservés riches en aspartates **D**Dxx**D**/**D**DxxD^{*}²⁴. Sur la base de la structure quaternaire adoptée par les protéines de ce groupe, une distinction peut être faite entre les homodimériques et les hétérooligomériques^{24,126}.

• Un exemple de trans-prényl élongase homomérique

La (*E,E*)-FPPS est à l'origine de l'élucidation des caractéristiques structurales et mécanistiques de cette classe d'enzymes¹³⁰⁻¹³². Enzyme modèle pour l'étude mécanistique des réactions de couplage de type 1'-4⁷¹, elle a été l'une des premières dont le gène a été isolé puis séquencé¹³³. Cette enzyme catalyse l'addition séquentielle de deux molécules d'IPP au DMAPP, formant ainsi le GPP (C₁₀) comme intermédiaire puis le FPP (C₁₅), produit final de la réaction⁷¹. Ce dernier est le précurseur direct des sesquiterpénoïdes et intervient également dans la biosynthèse des triterpénoïdes tels que les stéroïdes.

 $^{^{\}ast}$ Les résidus notés x désignent n'importe quel acide aminé, les résidus aspartates en gras sont ceux impliqués dans la coordination du cation divalent Mg^+.

Dans un premier temps, la structure cristalline de la FPPS de *Gallus gallus* (coq sauvage) a été élucidée à une résolution de 2,5 Å, par Tarshis et collaborateurs¹³⁰ (Figure 20). Ils ont ainsi révélé une structure quaternaire homodimérique dont chaque monomère adopte un repliement en faisceau d'hélices α anti-parallèles, observé pour la première fois, dénommé repliement « isoprénoïde » ou repliement α . Ce faisceau délimite une cavité hydrophobe, contenant le site actif (Figure 20). Par la suite, la détermination de la structure cristallographique des FPPS humaine¹³⁴ et bactérienne (*E. coli*)¹³⁵, en présence d'analogues des substrats isopréniques, a permis de confirmer l'achitecture en faisceau d'hélices observée précédemment. De plus, elle a révélé la présence de trois ions Mg²⁺ dans le site actif, coordiné par les deux motifs **D**Dxx**D**/**D**DxxD. Le groupement diphosphate du substrat allylique et des molécules d'eau complètent la coordination octahédrique des cations divalents¹³².

Les travaux de Cornforth et Popjak sur la biosynthèse du squalène¹³⁶ ont permis de définir, grâce à des expériences de marquage, la stéréochimie de l'élongation en deux étapes catalysée par la FPPS (Figure 20).



Figure 20 : Stéréochimie de la condensation 1'-4 ou « tête-à-queue » catalysée par la FPPS (d'après Kurokawa *et al.*, 2010) et structure quaternaire de la FPPS de *Gallus gallus*, retravaillée à partir de la PDB.



Ils décrivent ainsi qu'au cours de l'élongation, la formation de la liaison C-C entre le substrat DMAPP ou GPP et l'IPP (liaison entre le C₁ et le C₄ respectivement) induit une inversion de configuration au niveau de la position C₁ du DMAPP ou du GPP. La réaction de condensation de type 1'-4 implique l'addition du groupement allylique sur la face *si* de la double liaison de l'IPP. L'élimination de l'hydrogène pro-*R*, porté par le C₂ de l'IPP, conduit à la formation de la nouvelle double liaison de configuration (*E*).

La stéréochimie globale de l'addition du groupement isoprényle et l'élimination du proton ayant lieu sur la même face, est dite suprafaciale. Le groupement diphosphate libéré au cours de la réaction de condensation pourrait jouer le rôle de base pour l'arrachage du proton^{71,135}.

• La géranyl diphosphate synthase, une trans-prényl élongase hétéromérique

En 2010, les travaux de Wang et collaborateurs portant sur l'élucidation de la structure de la géranyl diphosphate synthase (GPPS) extraite de la menthe (Mentha piperita) ont permis une meilleure compréhension du mécanisme catalytique ainsi que l'extraction d'informations structurales quant aux prényl transférases hétéromériques²⁴. Cette dernière enzyme catalyse la condensation d'une molécule d'IPP sur une molécule de DMAPP selon le mécanisme et la stéréochimie décrits dans le cas de la FPPS. Impliquée dans la voie de biosynthèse du menthol, la GPPS est constituée de deux sous-unités dénommées grande sous-unité (LSU pour « large subunit ») et petite sous-unité (SSU pour « small subunit »). La LSU est étroitement liée aux trans-prényl élongases homomériques abordées ci-dessus, avec lesquelles elle présente 50 % d'identité et correspond à la sousunité catalytique du fait de son repliement en faisceau d'hélices α et à la présence des motifs DDxxD/DDxxD. A l'inverse, la SSU semble être une sous-unité régulatrice, elle présente une faible identité avec les autres *trans*-PTases homomériques (15 % environ) et n'arbore pas les motifs conservés. L'activité catalytique est dépendante de la présence des deux sous-unités¹³⁷⁻¹³⁹, la SSU régulant la longueur de la chaîne aliphatique du produit de réaction dans la sous-unité catalytique⁶⁷.

2. Les cis-prényl élongases ou (Z)-prényl élongases

Les enzymes de ce groupe sont à l'origine de la génération d'une double liaison de stéréochimie *cis* (ou (*Z*)) établie lors de la condensation entre les deux unités isopréniques (condensation « tête-à-queue », 1'-4), l'ensemble des autres liaisons étant de configuration *trans* (ou (*E*))¹²². Bien qu'elles soient, comme les *trans*-prényl élongases, Mg²⁺ dépendantes et qu'elles acceptent les mêmes substrats (notamment l'IPP), les *cis*-PTases se distinguent de par leur structure tridimensionnelle et leur séquence primaire en acides aminés, leur mécanisme catalytique et leur mode de liaison au substrat^{128,140,141}. Ainsi, une différence notable consiste en l'absence des motifs riches en acide aspartique au niveau de la séquence protéique¹²⁸.

Un seul résidu aspartate est retrouvé au sein d'un motif conservé de type $MDGN(R/G)RA_r^*$ et est impliqué dans la coordination du cation divalent Mg^{2+142} . En accord avec les différents produits qu'elles synthétisent, il a été proposé une classification en prényl transférases pour la formation de courte (C₁₀-C₂₀), moyenne (C₅₀-C₅₅) et longue chaines (C₇₀-C₁₂₀)¹⁴³.

D'un point de vue structural, le groupe de Fujihashi a résolu la structure cristalline de l'undécaprényl diphosphate synthase (UPPS) de *Micrococcus luteus* BP-26 à 2,2 Å¹⁴⁴, révélant ainsi la première structure 3D d'une *cis*-prényl élongase. Enzyme essentielle dans la biosynthèse des peptidoglycanes de bactéries, l'UPPS accepte le FPP comme substrat allylique et transfère séquentiellement huit molécules d'IPP permettant l'obtention de l'UPP (C₅₅)¹⁴¹. Elle adopte une structure quaternaire homodimérique dont chaque monomère est consituté de brins β parallèles, formant un feuillet β central (Figure 22). Ce dernier est entouré d'hélices α (Hx sur la Figure 21) constituant ainsi un nouveau repliement protéique, différent du repliement en faisceau d'hélices adopté par les *trans*prényl élongases homodimériques. Cette architecture structurale donne lieu à deux sites de fixation, le premier permet la fixation du substrat FPP dont la chaine aliphatique va être allongée. Le second site de fixation accueille le donneur de prényl IPP (Figure 21).



Figure 21: Dimère constitutif de l'UPPS de *Micrococcus luteus* BP-26 et représentation schématique du site actif dans lequel l'IPP, le FPP sont déjà fixés en présence du cation Mg²⁺ (adaptée de la publication de Fujihashi et *al.*, 2001).

La position du cation divalent est estimée à proximité du FPP lors de la cristallisation de l'enzyme ayant dans son site actif le FPP et l'IPP.

^{*} Le dernier résidu est désigné Ar correspondant à n'importe quel acide aminé aromatique.

Les travaux de Wang et collaborateurs sur la détermination de la structure cristalline de l'UPP synthase d'*E. coli* en présence de magnésium, d'IPP et d'un thio-analogue du FPP¹⁴² ont conduit à une meilleure compréhension du mécanisme catalytique de ces enzymes. L'ion Mg²⁺ est maintenu dans une géométrie octaédrique, coordiné par trois molécules d'eau, le groupement diphosphate du thio-analogue et le résidu conservé acide aspartique (MDGN(R/G)RA_r). Ce dernier semble jouer le même rôle que les acides aspartiques des motifs DDxxD/DDxxD *i.e.* faciliter l'ionisation du FPP *via* le Mg²⁺ en initiant la réaction de condensation de type 1'-4. Plus en détails, il a été proposé que l'étape d'ionisation du FPP était précédée de *i*) la fixation du FPP dans le premier site, suivie de *ii*) la fixation de l'IPP - au sein du second site - médiée par un ion Mg²⁺ et *iii*) la migration du cation divalent de l'IPP vers le FPP, assistée par le résidu aspartate conservé^{74,142,143}.

Sur la base de la stéréochimie décrite pour la réaction de *trans*-prénylation, l'arrachement par un résidu basique du proton pro-*S* porté par le C₂ de l'IPP conduit à la formation de la nouvelle double liaison de configuration *(Z)* (Figure 22).



Figure 22: Stéréochimie de la condensation 1'-4 catalysée par l'UPPS (d'après Kurokawa et Koyama, 2010) et structure quaternaire de l'UPPS de *Micrococcus luteus* BP-26, retravaillée à partir de la PDB.



Au sein de cette sous-famille, la distinction entre *cis*-PTases homomériques et hétéromériques est également possible et proposée par Sessa et collaborateurs¹⁴⁵. Les *cis*-prényl élongases homomériques sont impliquées dans la génération des disphophates à courte et moyenne chaîne tels que le (*Z*,*E*)-FPP de *Mycobacterium tuberculosis*¹⁴⁶, le diphosphate de nérylnéryle (C₂₀) d'espèces du genre *Solanum*¹⁴⁷, le diphosphate d'undécaprényle (UPP, C₅₅) de bactéries¹⁴⁰, et le diphosphate de décaprényle (C₅₀) de *Mycobacterium tuberculosis*¹⁴⁸.

Les polyprényl diphosphate synthases ou déhydrodolichyl diphosphate synthases sont des enzymes hétéromériques impliquées dans la synthèse du dolichol précurseur du dolichol phosphate (C55-C100) essentiel dans les processus de glycosylation chez les eucaryotes¹⁴⁵. Sur le modèle des *trans*-prényl élongases, ces enzymes sont constituées de deux sous unités, dont une est catalytique. Cependant, l'absence à ce jour d'une structure d'une polyprényl diphosphate synthase ne permet pas de préciser davantage la machinerie moléculaire responsable de la biosynthèse d'isoprénoïdes par ces enzymes²⁴.

ii. Les prenyl transferases aromatiques

Les prényl transférases aromatiques (A-PTases) catalysent le transfert d'un groupement prényle dérivé des diphosphates isopréniques correspondant (DMAPP, GPP, FPP...) sur une variété d'accepteurs aromatiques (acides aminés, flavonoïdes, certains alcaloïdes, chalcones...)¹⁴⁹. Le mécanisme mis en jeu repose sur une réaction de type Friedel-Crafts. La prénylation intervient naturellement dans les bactéries, les plantes ou les champignons et génère ainsi des produits naturels hybrides dont l'activité biologique est améliorée ou modifiée¹⁵⁰. A titre d'exemples, les flavonoïdes prénylés licoflavone C (8-prényl apigénine) et isobavachine (8-prényl liquiritigénine) présentent une activité cytotoxique plus élevée que leurs précurseurs non-prénylés¹⁵¹. Miranda et collaborateurs ont révélé l'activité antioxydante de chalcones qui en absence de groupements prényle ont un comportement pro-oxydant¹⁵². De plus, l'addition d'un motif isoprénique sur un accepteur aromatique accroit son caractère liphophile et influence potentiellement les interactions de ce composé avec les cibles biologiques (protéines, membranes ...)¹⁵³.

La prénylation régiospécifique peut être conduite sur différents atomes tels que le carbone, l'azote, ou l'oxygène d'un composé aromatique, définissant ainsi une *C-, O-,* ou *N*-prénylation. Ces dernières sont considérées comme « normales » lorsque le donneur de groupement prényle est lié au substrat aromatique par l'atome de carbone C₁ et « inversée » lorsque la liaison se fait *via* l'atome de carbone C₃. Deux familles de prényl transférases catalysent ces réactions *i*) les A-PTases solubles et *ii*) les A-PTases membranaires.

1. Les prényl transférases aromatiques solubles

Les A-PTases solubles sont des enzymes principalement bactériennes et fongiques. Elles sont caractérisées par une conformation en tonneau α/β résultat de l'enchainement d'un motif ($\alpha\beta\beta\alpha$)⁵ nommé tonneau PT¹⁵⁴. Les motifs riches en acides aspartiques **D**Dxx**D**/**D**DxxD impliqués dans la fixation du diphosphate isoprénique *via* la liaison à un cation divalent, le plus souvent Mg²⁺, sont absents. De ce fait, l'activité catalytique de ces prényl transférases est indépendante de la présence de cations divalents^{149,155}. Sur la base de leur similarité de séquence primaire et de la nature des substrats aromatiques à prényler, deux sous-groupes sont proposés. Le premier réunit les enzymes similaires à CloQ et NphB ayant permis l'identification de la conformation en tonneau α/β et de ce fait souvent nommées A-PTases de type ABBA, le second est constitué de diméthylallyltryptophane synthases (DMATS)¹²⁴. Les catalyseurs du groupe ABBA sont le plus souvent d'origines bactérienne et fongique, les DMATS sont des enzymes principalement fongiques^{149,156}.

A-PTases solubles de type NphB/CloQ ou ABBA

La découverte de cette famille d'A-PTases solubles est due à la caractérisation de différentes enzymes^{122,124}. Dans un premier temps, les PTases CloQ de *Streptomyces roseochromogenes* et NovQ de *Streptomyces spheroides* ont été identifiées et interviennent dans la biosynthèse de deux aminocoumarines caractérisées par une activité antibiotique *i.e.* la novobiocine^{* 157,158} et la chlorobiocine¹⁵⁹, respectivement. *In vitro*, elles catalysent la *C*-prénylation du 4-hydroxyphénylpyruvate (4-HPP) permettant de conduire au 3-diméthylallyl-4-hydroxyphénylpyruvate, en absence de cations divalents (Figure 23).



Figure 23 : C-prénylation du 4-HPP catalysée par NovQ et CloQ, impliquées respectivement dans la biosynthèse de la novobiocine et de la chlorobiocine.

^{*} La novobiocine est un antibiotique bactériostatique à spectre étroit, principalement actif sur les bactéries à Gram positif (<u>https://dictionnaire.acadpharm.org/w/Novobiocine</u>, consulté le 02/02/2021).

Peu de temps après, une nouvelle prényl transférase NphB (nommée auparavant Orf2) - isolée d'espèces du genre *Streptomyces* – a été décrite. Elle est l'une des enzymes de la voie de biosynthèse de la naphterpine^{*}. Elle intervient dans la synthèse du 4-géranyl-1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalène¹⁶⁰ et utilise préférentiellement le GPP en tant que donneur. Elle se caractérise, de façon exceptionnelle, par une dépendance vis-à-vis du Mg²⁺ pour catalyser la prénylation de divers accepteurs aromatiques : composés phénoliques, flavonoïdes et isoflavonoïdes, 4-HPP¹⁵⁴ (Figure 24).



Figure 24 : Rôle de NphB dans la biosynthèse de la naphterpine (a) et promiscuité de substrats (b) (d'après Singh et collaborateurs, 2020). La lettre « G » bleue indique la position prénylée par NphB de divers dérivés de naphtalène, de résorcinol, de flavonoïdes.

L'élucidation des structures cristallines de NphB¹⁵⁴ dans un premier temps, puis de CloQ¹⁶¹ révèlent un repliement rare en tonneau α/β (nommé PT-barrel)^{124,154}. Ce repliement consiste en un feuillet β cylindrique constitué de dix brins anti-parallèles et délimitant ainsi la cavité réactionnelle. Ce feuillet β est entouré par des hélices α , exposées au solvant. Les structures secondaires s'enchaînent de telle sorte que deux hélices α soient liées à deux brins β formant un motif ($\alpha\beta\beta\alpha$)₅, à l'origine du nom ABBA décrivant les A-PTases de cette sous famille¹²⁴ (Figure 25).

^{*} La naphterpine est un méroterpénoïde, composé mixte possédant un système cyclique de type napthoquinone et une chaîne cyclisée FPP (C_{15}) ou GPP (C_{10}). Elle est caractérisée par une activité antioxydante mise en évidence grâce à sa capacité à contrer le mécanisme de peroxydation des lipides (processus métabolique de détérioration oxydative des lipides insaturés) causé par des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou des enzymes ¹⁶⁰.



Figure 25 : Données structurales des A-PTases solubles CloQ et NphB (adaptées de Metzger *et al.*, 2010).

A gauche, structure quaternaire de CloQ (Streptomyces roseochromogenes) résolue à 2,22 Å par Metzger et collaborateurs. A droite, représentations cartoon **(a)** des structures des enzymes CloQ et NphB pour lesquelles l'accepteur (cyan) et le donneur de groupement prényle (magenta) sont localisés dans la cavité hydrophobe. Une coupe longitudinale **(b)** permet d'observer la cavité hydrophobe accueillant le substrat et produit de réaction, dont l'entrée et la sortie de la cavité sont représentées par des flèches discontinues rouges.

D'une façon générale, la cavité réactionnelle est subdvisée en deux régions, la première impliquée dans la liaison du groupement donneur de prényle et la seconde permettant la liaison du substrat à l'enzyme¹⁶² (Figure 25). La nature des acides aminés bordant la cavité réactionnelle est à l'origine de la sélectivité et de la potentielle promiscuité de ces enzymes, du fait des interactions qu'ils peuvent engager avec le substrat aromatique et le donneur isoprénique et de l'encombrement stérique lié à leur chaine latérale^{124,162}.

D'un point de vue mécanistique, à l'exception de NphB dépendante de l'ion Mg²⁺ pour l'ionisation du diphosphate isoprénique, les prényl transférases de type ABBA ne nécessitent pas de cations divalents du fait que le diphosphate allylique interagit avec des résidus chargés positivement pour la génération du carbocation^{124,161,162}. Quel que soit le mécanisme initial de formation du carbocation, il est stabilisé par délocalisation des charges, liée à sa nature allylique et permettant la prénylation d'un accepteur aromatique sur le modèle d'une alkylation de Friedel-Crafts^{8,124,154,161,162}.

Au fil des années, différents travaux ont permis d'étoffer cette famille de PTases et également d'étudier leur promiscuité de substrats considérant l'accepteur de prényle et le donneur isoprénique. Basé sur les revues récemment publiées de T. Mori¹⁴⁹ et Winkelblech et collaborateurs¹²², le Tableau 2 liste quelques PTases et pour chacune renseigne l'organisme d'origine, des exemples d'accepteurs aromatiques, le donneur isoprénique et également la voie de biosynthèse dans laquelle elle intervient, lorsque celle-ci a été identifiée.

ABBA PTases	Organisme	Accepteur(s) (exemples)	Donneur (s)	Voie de biosynthèse	Références
CloQ	S. roseochromogenes	4-HPP, flavonoïdes, isoflavonoïdes, stilbénoïdes	DMAPP	Chlorobiocine $\downarrow \downarrow $	153,159
NovQ	S. spheroids	4-HPP, phénylpropanoïde s, flavonoïdes, dihydronaphtalèn es (DHNs)	DMAPP	Novobiocine $\downarrow \qquad \qquad$	163
NphB	Streptomyces sp.	4-HPP, polycétides de plantes, DHNs	GPP	Naphterpine	154,164,165
Fnq26	S. cinnamomensis	DHNs, acide 4- hydroxybenzoïque , flavioline	GPP	Furano- naphthoquinone	166
SC07190	S. coelicolor A3	Polycétides de plantes, DHNs	DMAPP	' ö Inconnue	154,164,165

Tableau 2 : Exemples de prényl transférases aromatiques du groupe ABBA et leur substrats(adapté de Winkelblech et al., 2015 et de T. Mori, 2020).

Ainsi, CloQ (*S. roseochromogenes*) catalyse la prénylation de divers accepteurs tels que la lutéoline (flavonoïde), la génistéine (isoflavonoïdes), le resvératrol (stilbénoïdes)¹⁵³ (rendements inférieurs à 10 %). Identifiée dans *S. spheroids*, NovQ est capable de transférer le groupement allylique du DMAPP sur la naringénine et l'apigénine (flavonoïdes) et sur les 1,6- et 2,7-dihydronaphthalènes (DHNs) par exemple, avec des rendements allant de 15 à 90 %¹⁶³. L'A-PTase NphB (*Streptomyces sp.*) génère les dérivés prénylés par addition d'un groupement géranyle sur des accepteurs variés comme l'olivétol (polycétide), la naringénine et l'apigénine (flavonoïdes) et les 1,6- et 2,7-DHNs^{154,164,165}. SCO7190 de *S. coelicolor* A3 présente une gamme d'accepteurs similaire à celle de NphB, à la différence qu'elle catalyse le transfert d'un groupement diméthylallyle^{154,164,165}. Fnq26 (*S. cinnamomensis*) permet la synthèse du dérivé *C*-prénylé de flavoline, et la *O*-prénylation du 1,3-DHN et de l'acide 4-hydroxybenzoïque¹⁶⁶.

Adapté de la revue de T. Mori¹⁴⁹, la Figure 26 répertorie les structures des différents substrats des prényl transférases listées dans le tableau ci-dessus en mettant en évidence, lorsqu'elle est connue, la position prénylée.



Figure 26 : Exemples de substrats prénylés par les A-PTases de type ABBA CloQ, NovQ, NphB, Fnq26 et SC07190, adaptée de T. Mori (Mori, 2020).

Les positions les plus fréquemment prénylées sont désignées par un cercle orangé lorsqu'elles sont décrites.

Comme décrit précédemment, cette famille d'enzymes montre naturellement une certaine flexibilité envers différents accepteurs aromatiques. Cette promiscuité a également été étudiée vis-à-vis de divers analogues de diphosphates isopréniques, notamment non-naturels. En 2020, le groupe de Singh¹⁶⁷ a mis en évidence la capacité de NphB à transférer différents diphosphates naturels et non-naturels sur le 1,6-DHN (envisagé comme substrat potentiel car similaire au substrat naturel¹⁵⁴) et sur un nouvel accepteur identifié le sulfabenzamide *via* une *N*-prénylation. Pour ce faire, 66 diphosphates synthétiques ont été testés dont le DMAPP (**2**), le GPP (**32**) et le FPP (**42**) (Figure 27).



Figure 27 : Structures des diphosphates testés par Singh et collaborateurs pour l'alkylation du 1,6-DHN (accepteur décrit) et du sulfabenzamide (nouvel accepteur). Les composés ayant été acceptés comme donneur par NphB sont encadrés : en vert le GPP, unique composé ayant conduit à un taux de conversion supérieur à 50 % dans le cas du 1,6-DHN, en violet le DMAPP et le dérivé cyclopentyle, ayant permis d'observer un taux de conversion supérieur à 50 % dans le cas du sulfabenzamide.

Parmi eux, 44 sont des substrats allyliques et 22 sont des substrats aromatiques. Ces travaux ont révélé que l'enzyme accepte différents donneurs analogues du DMAPP et du GPP, les diphosphates à longues chaînes sont préférentiellement impliqués dans l'alkylation du 1,6-DHN alors que les diphosphates à chaine plus courtes sont acceptés lorsque le substrat est le sulfabenzamide. Le dérivé cyclopentyl du DMAPP (**12**) a permis d'atteindre 100 % de conversion et de générer un seul et unique produit *N*-prénylé dérivé du sulfabenzamide.

Ces travaux sont un bel exemple de la variabilité de substrats qu'acceptent ces prényl transférases, non seulement au niveau de l'accepteur mais également du diphosphate donneur. Cette famille d'enzymes est d'autant plus attractive qu'elle permet d'accéder à la production de nouveaux composés prénylés et d'explorer un peu plus l'espace chimique mais également la diversité d'activité biologique générée.

• DMATS

Les A-PTases de type diméthylallyl tryptophane synthases (DMATS) catalysent la prénylation régiospécifique d'un noyau indole principalement inclu dans les dipeptides cycliques constitués d'un tryptophane, les terpénoïdes indoliques et le résidu tryptophane lui-même^{122,149,168}. Certaines sont essentielles à la biosynthèse des alcaloïdes de l'ergot, mycotoxines isolées du champignon *Claviceps purpurea*¹⁶⁹. Bien que la présence de cations divalents ne soit pas une nécessité, l'activité de ces enzymes peut être améliorée en présence de Mg²⁺ ou de Ca^{2+122,170}. Ces enzymes ont été isolées des autres A-PTases aromatiques du fait qu'elles ne présentent pas d'homolgie de séquence avec NphB ou CloQ mais partagent la même conformation en tonneau $\alpha/\beta^{24,161}$.

La tryptophane *C*₄-prényl transférase DmaW, isolée du champignon *C. purpurea* a été la première DMATS identifiée. Elle intervient dans la biosynthèse des alcaloïdes de l'ergot en catalysant la première étape qui consiste en la *C*-prénylation d'un résidu tryptophane^{171,172} (Figure 28).



Figure 28 : Première étape de la biosynthèse des alcaloïdes de l'ergot catalysée par DmaW de *C. purpurea.*

A partir de la séquence de cette DMATS, d'autres membres de cette famille ont pu être découverts. L'identification et la caractérisation de FgaPT2 en 2005 a permis d'initier l'étude systématique de la famille des DMATS, *via* une approche génomique et biochimique¹⁷³. Ainsi, des enzymes catalysant la prénylation de l'ensemble des positions du noyau indole du tryptophane (N₁ et C₂₋₇) ont été décrites¹⁴⁹, un exemple pour chaque position de prénylation sera par la suite donné (Tableau 3).



Les PTases énoncées ci-dessus sont réprésentées selon la position du noyau indole prénylée et selon le sens de prénylation, les enzymes catalysant des prénylations inverses sont schématisées sur un fond rosé.

DMATS PTases	Organisme	Accepteur	Exemple de voie de biosynthèse	Références
CymD	S. arenicola	Tryptophane	Cyclomarazine A $\left\{ \begin{array}{c} & & \\ & & $	174
FtmPT1	A. fumigatus	c-L-Trp-L-Pro (Brévianamide F)	Fumitrémorgine B	175
CdpNPT	A. fumigatus	c-L-Trp-Ant (Benzodiazépinedione)	Inconnue	176
FgaPT2	A. fumigatus	Tryptophane	Fumigaclavine B	173
DMATS _{Ac}	A. clavatus	Tryptophane	Inconnue	177
IptA	Streptomyces sp.	Tryptophane	DMAI* carbaldéhyde	178
CdpC7PT	A. terreus	c-D-Trp-Ant (Benzodiazépinedione)	Inconnue	179

^{*}DMAI : Diméthylallyl indole

L'A-PTase CymD, première DMATS bactérienne isolée de *Salinispora arenicola* transfère un groupement diméthylallyle sur l'azote du noyau indole (N_1 -prénylation inverse) lors de la biosynthèse de l'antibactérien cyclomarazine A¹⁷⁴.

FtmPT1, une prényl transférase d'*Aspergillus fumigatus*, conduit en présence de la brévianamide F (BF, dipeptide cyclique composé d'un résidu tryptophane et d'un résidu proline) à la tryprostatine B prénylée en position C₂^{175,180}. Concernant la position C₃ du noyau indole de dipeptides cycliques, elle est par exemple inversement alkylée par l'enzyme CdpNPT (*Aspergillus fumigatus*)¹⁷⁶. FgaPT2 (*A. fumigatus*) génère le 4-diméthylallyl tryptophane dans la voie de biosynthèse de la fumigaclavine C¹⁷³. Les positions C₅, C₆ et C₇ peuvent être également alkylées par la DMATS d'*Aspergillus clavatus* (Yu 2012), l'IptA isolées d'espèces du genre *Streptomyces*¹⁷⁸ et la CdpC7PT d'*Aspergillus terreus*¹⁷⁹, respectivement (Tableau 3).

D'autres molécules que le tryptophane ou les dérivés indoliques évoqués jusqu'alors peuvent être alkylées^{170,181,182}, c'est par exemple le cas de la tyrosine *O*-prénylée par la DMATS SirD (*Leptosphaeria maculans*) impliquée dans la biosynthèse de la sirodesmine PL caractérisée par une importante activité antifongique¹⁸³ (Figure 29).



Figure 29 : Alkylation de la *L*-tyrosine catalysée par SirD, étape de la voie de biosynthèse de la sirodesmine PL.

Le groupe de Singh^{184,185} a publié très récemment deux études révélant l'acceptation de différents analogues des diphosphates naturels, de type alkyle et aryle, par la *O*-prényl transférase SirD (*Leptosphaeria maculans*) et FgaPT2 (*Aspergillus fumigatus*) *C*₄-prényl transférase capable de catalyser également une prénylation en C₅ en présence d'analogues testés. Dans le cas de l'étude portant sur SirD¹⁸⁴, sept analogues sur les vingt testés ont pu être transférés sur la tyrosine, générant des dérivés tyrosine *O*-prénylés avec un taux de conversion de plus de 50 % (Figure 30). Sur les 33 analogues de diphosphate non-naturels testés en présence de FgaPT2¹⁸⁵, sept ont conduit à la prénylation du tryptophane en position C₄ ou C₅ (régiosélectivité) avec un taux de conversion supérieur à 50 % (Figure 30).



Figure 30 : Promiscuité des PTases SirD et FgaPT2 envers différents donneurs analogues du disphosphate naturel DMAPP (figure adaptée de Bandari et al., 2017 et 2019). Les composés encadrés en orangé sont ceux ayant conduit à un taux de conversion d'au moins 50 % pour la O-prénylation catalysée par SirD. Les composés encerclés en violet sont les donneurs acceptés par FgaPT2 pour la C₄- ou C₅- prénylation du L-tryptophane et ayant conduit au moins à 50 % de conversion.

Ces études sont un nouvel exemple de la flexibilité des prényl transférases et particulièrement des A-PTases solubles vis-à-vis des donneurs (cycliques et/ou aromatiques, linéaires...).

Enfin, la compréhension du mécanisme enzymatique intervenant lors de ces différentes prénylations a été initiée par l'élucidation des structures cristallines de FgaPT2¹⁶¹, FtmPT1¹⁸⁶ puis de CdpNPT et AnaPT^{176,187}. Ainsi, il est proposé que les DMATS catalysent la prénylation par un mécanisme à trois étapes débutant par la formation du cation diméthylallyle *via* la rupture de la liaison ester de diphosphate permise par l'interaction entre le groupement diphosphate et des résidus chargés positivement¹⁸⁸, suivie d'une attaque nucléophile du cation par le noyau indole ou un atome riche en électrons (deuxième étape). L'arrachement d'un proton de l'intermédiaire formé conduit ensuite au produit final.

2. Les prényl transférases aromatiques membranaires

L'ajout d'un groupement prényle est à l'origine du caractère amphiphile de nombreux composés bioactifs leur permettant ainsi d'être liposolubles et fonctionnels dans les membranes biologiques¹⁸⁹. Les A-PTases membranaires sont ainsi à l'origine de cette alkylation et sont désignées UbiA prényl transférases, en référérence à la première prényl transférase membranaire découverte dans E. coli UbiA¹⁹⁰. Cette famille d'enzymes suscite l'intérêt de la communauté scientifique du fait que les membres qui la constituent sont impliqués dans de nombreux processus biologiques et sont la cause de plusieurs pathologies¹²³. Les voies de biosynthèse dans lesquelles les UbiA interviennent sont nombreuses, illustrant ainsi une diversité fonctionnelle et structurale, considérant les différents substrats convertis et de ce fait les produits formés. Elles entrent ainsi en jeu lors de la biosynthèse d'ubiquinones et de ménaquinones¹⁹¹⁻¹⁹³, des lipides constitutifs de la membrane des archées¹⁹⁴, de meroterpénoïdes fongiques¹⁹⁵, de l'hème d'oxydases de la chaine respiratoire mitochondriale¹⁹⁶ et sont impliquées dans la formation de la paroi cellulaire mycobactérienne¹⁹⁷. Dans les plantes, elles catalysent des étapes clés de la biosynthèse des plastoquinones, de la vitamine E et de métabolites spécialisés sous la forme d'aromatiques prénylés^{155,198-202}.

La plupart des enzymes de cette famille catalyse la prénylation de substrats aromatiques. Ainsi, UbiA d'*E. coli*¹⁹⁰ ajoute en position *meta* du *p*-hydroxybenzoate un groupement octaprényle, étape de la biosynthèse des ubiquinones²⁰³. MenA est une prényl transférase particulière d'*E. coli* générant le déméthylménaquinol à partir du 1,4dihydroxy-2-naphthoate (DHNA)¹⁹¹. Enfin, COX10 catalyse le transfert d'un groupement prényle sur un accepteur porphyrique de type hème¹⁹⁶ (Figure 31). Le mécanisme général de prénylation par les UbiA membranaires repose sur l'ionisation du diphosphate isoprénique par rupture de la liaison ester de diphosphate, médiée par un cation divalent Mg²⁺. Le carbocation intermédiaire ainsi formé engage l'attaque en position *meta* du substrat aromatique pour la formation d'une liaison C-C.



Figure 31 : Réactions catalysées par les PTases membranaires UbiA, MenA et COX10.

Les études structurales conduites sur AfUbiA d'*Archaeglobus fulgidus*²⁰¹ et ApUbiA d'*Aeropyrum pernix*²⁰⁴ - deux prényl transférases d'archées - ont confirmé la présence des motifs riches en acide aspartique et la présence du cation divalent Mg²⁺ indispensable à leur activité catalytique²⁰². Ces études ont également souligné l'absence de similarité structurale entre les A-PTases solubles ABBA et DMATS et les UbiA membranaires. En effet, ces dernières sont constituées d'une large cavité centrale délimitée par des hélices α transmembranaires adoptant une architecture en forme de U. La cavité centrale hydrophobe est fermée par un domaine extramembranaire comportant les motifs riches en acides aspartiques. Une ouverture latérale au sein de la bicouche lipidique est présente créant un passage unique, ce qui facilite l'accès des substrats et la sortie des produits du site actif. Cette cavité comporte une poche basique lieu de fixation du substrat aromatique, une paroi hydrophobe liant la chaine isoprényle et une zone polaire (extramembranaire) pour l'interaction avec le groupement diphosphate²⁰⁴ (Figure 32).

A l'identique des prényl transférases aromatiques solubles, certains des membres de cette famille présentent naturellement une affinité pour différents substrats aromatiques et différents donneurs de groupement prényle. C'est le cas de l'UbiA d'*E. coli* capable de convertir des dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et d'accepter le GPP et le GGPP comme donneurs²⁰⁵.



Figure 32 : Structure de l'UbiA d'*Aeropyrum pernix* et organisation du site actif de l'enzyme, d'après Cheng et Li, 2014.

Mise en evidence du repliement α consistant en plusieurs hélices transmembranaires qui délimitent une poche catalytique en forme de U. Le domaine extramembranaire (rose) vient fermer la cavité catalytique et contient les motifs conservés.

Outre les prényl transférases évoquées plus tôt dans ce chapitre, linéaires et aromatiques, le transfert d'un groupement prényle peut également étre réalisé, par exemple, sur une protéine. Cette modification post-traductionnelle implique la formation d'une liaison covalente entre un résidu cystéine d'une séquence consensus CaaX^{*206} située au niveau de l'extrémité carboxy-terminale d'une protéine et un groupement farnésyle ou géranylgéranyle. La prénylation crée une extrémité hydrophobe qui facilite ainsi l'ancrage aux membranes de ces protéines dans les eucaryotes et probablement les archées²⁰⁷. Les protéines concernées sont par exemple les protéines Ras, protéines régulatrices impliquées dans les processus de transduction du signal¹²⁶.

Parmi les PTases, la sous famille des prényl transférases linéaires ou prényl élongases est d'un intérêt particulier dans le contexte plus spécifique de la biosynthèse d'isoprénoïdes, dans le sens où elles sont à l'origine de la formation des précurseurs linéaires de l'ensemble des terpènes *i.e.* le GPP, le FPP, le GGPP et le GFPP. Une fois ces précurseurs synthétisés, ce sont les terpène synthases ou cyclases qui entrent en jeu pour la production des squelettes terpéniques particulièrement diversifiés.

^{*} CaaX désigne un motif retrouvé au niveau carboxy-terminal d'une séquence protéique constitué d'un résidu cystéine (C), deux résidus aliphatiques (aa) et un résidu d'acide aminé non spécifié noté x.

b. Les terpène synthases

Pour rappel, la biosynthèse des terpénoïdes repose dans un premier temps sur l'intervention des prényl élongases (Chapitre IB.II.a.i) pour la synthèse des précurseurs linéaires GPP (C10), FPP (C15), GGPP (C20) et GFPP (C25). Après déphosphorylation, ces hydrocarbures linéaires carbocationiques sont engagés pour la plupart dans des réactions en cascade, permettant leur cyclisation par des terpène cyclases et/ou la « décoration » ou fonctionnalisation par des cytochromes P450 monooxygénases, des oxydoréductases et des transférases (glycosyltransférases, méthyltransférases, acyltransférases)¹⁵⁶. Ces enzymes sont à l'origine d'une multitude de composés biologiquement actifs, mono- et polycycliques essentiellement^{8,34,74}. Les terpène cyclases, également nommées terpène synthases (TSs), si l'on considère que toutes ces enzymes ne génèrent pas des composés cycliques, sont réparties en deux classes. Cette subdivision est réalisée sur la base du mécanisme d'activation du substrat, à l'origine de la formation du carbocation^{8,74,208}. La première classe est constituée des terpène synthases dont le mécanisme catalytique débute par l'ionisation du substrat isoprénique, suite au départ du groupement diphosphate, médiée par des cations divalents Mg²⁺. Les terpène synthases de classe II nécessitent, quant à elles, une étape de protonation d'une double liaison du substrat allylique conduisant ainsi à l'espèce carbocationique.

i. Les Terpene synthases de type I

Les terpène synthases de la classe I (TSs-I) - telles que la pentalénène synthase catalysent une cyclisation à partir d'un carbocation allylique, généré par ionisation suite au clivage de la liaison ester de diphosphate. Au niveau de la séquence primaire en acides aminés, deux motifs riches en acide aspartique sont identifiés *i.e.* le motif **D**Dxx**D**, similaire à ceux retrouvés dans la famille des *trans*-prényl élongases, et (**N**,**D**)D(L,I,V)x(**S**,**T**)xxx**E** communément abrégé **NSE** ou **DTE**. Les résidus indiqués en gras participent à la liaison du centre trinucléaire de magnésium, facilitant l'ionisation du substrat^{209,210} (Figure 33). Ce deuxième motif **NSE/DTE** différencie ainsi les terpène synthases de classe I, des *trans*prényl élongases.


TSs-I, la pentalenene synthase (figure adaptée de Rudolf et Chang, 2019).



L'étape d'ionisation et la fixation du FPP sont facilités par la présence du centre trinucléaire de magnésium, coordiné également par les motifs riches en acide aspartique. Le domaine α de la pentalenene synthase est coloré en bleu, les motifs DDxxD et NSE/DTE sont colorés en rouge et rose, respectivement.

Les TSs-I adoptent un repliement identique à celui décrit dans le cas des *trans*-prényl élongases, ceci pouvant être lié au fait qu'elles partagent le même mécanisme d'ionisation. Ce repliement « isoprénoïde » formant un domaine α , consiste en un faisceau d'hélices α antiparallèles avec, en son centre, le site actif comprenant les motifs **D**Dxx**D** et **NSE/DTE** et le centre trinucléaire de magnésium (Figure 33).

ii. Les terpene synthases de type II

Les TSs-II sont caractérisées par un mécanisme impliquant la formation d'un carbocation tertiaire suite à la protonation, par un acide d'un alcène ou d'un époxyde^{8,208}. Dans cette sous-famille, les motifs **D**Dxx**D** et **NSE/DTE** ont pour équivalent le motif Dx**D**D dont le rôle mécanistique est différent. En effet, il est impliqué dans la protonation du substrat *via* le résidu acide aspartique central (rôle d'acide de Brønsted) mais n'intervient pas dans la coordination du cation Mg^{2+ 211,212}. Ce dernier interagit avec le groupement phosphate du substrat facilitant ainsi sa fixation au sein du site actif²¹³. La plupart des TSs-II nécessitent un ion Mg²⁺ pour leur activité catalytique ; cependant cette dépendance catalytique n'est pas vérifiée dans le cas de deux enzymes la squalène-hopène synthase et l'oxydosqualène cyclase, initiant respectivement la cyclisation par protonation d'une double liaison et d'un époxyde sur des substrats non phosphorylés^{211,212} (Figure 34).

D'un point de vue structural, le site actif de ces enzymes comprend le motif DxDD, localisé à l'interface de deux tonneaux formés d'hélices α et nommés domaines β et γ .



Figure 34 : Exemple de TSs-II dont la formation du carbocation tertiaire initial est dépendante d'une étape préalable de protonation, extraite de la publication de Rudolf et Chang, 2020.

La squalène synthase et l'oxydosqualène cyclase cyclisent des substrats non-phosphorylés, en absence de cation divalent. Le motif conservé DxDD ou VxDC initient l'étape d'ionisation en protonant la double liaison terminale du squalène et l'époxyde de l'oxydosqualène.

Les TSs-I et II peuvent également combiner un ou plusieurs des domaines α , β et γ évoqués ci-dessus, conduisant à des TSs monofonctionnelles dont au moins l'un des domaines est actif et possède le motif conservé et l'autre est considéré comme un vestige inactif. C'est ainsi le cas de la TSs-I taxadiène synthase de *Taxus brevifolia*, première terpène synthase pour laquelle une fusion des trois domaines ($\alpha\beta\gamma$) a été révélée. Le domaine α catalyse la synthèse du taxadiène, le domaine $\beta\gamma$ est inactif^{214,215}. La fusion des domaines peut également conduire à une TSs bi-fonctionnelle telle que l'abietadiène synthase d'*Abies grandis*. Elle est capable de catalyser, successivement, des réactions de cyclisation initiées soit par ionisation, soit par protonation qui sont les mécanismes caractéristiques des TSs-I et TSs-II, respectivement²¹⁶ (Figure 35). Concernant leur structure quaternaire, les terpène synthases s'organisent en dimères, tetramères et hexamères⁸.



Figure 35 : Classes de terpène synthases et domaines architecturaux correspondant (figure adaptée de Pichersky (Zhou *et al.*, 2020), et de Rudolf et Chang, 2019)).

La partie haute de cette figure donne un exemple d'une TS-I, d'une TS-II et d'une TS bifonctionnelle I et II ; elle donne les informations structurales et mécanistiques caractéristiques de chacune. La partie basse donne l'exemple de l'abiétadiène synthase (TS bifonctionnelle I et II) et indique la position des trois domaines et la localisation des motifs conservés responsables de la bifonctionnalité de cette enzyme. Sont également schématisées les différentes associations de domaines retrouvées dans la famille des terpène synthases (TS-I : α , $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\alpha\beta\gamma$, TS-II : $\beta\gamma$, $\alpha\beta\gamma$).

La sous partie suivante permet d'aborder différents exemples de terpène synthases (TS-I, TS-II, TS bifonctionnelle) à l'origine de la complexité et de la diversité structurale et fonctionnelle de l'espace chimique qu'offrent les terpénoïdes.

iii. Quelques exemples de terpene synthases

1. Monoterpène synthases

Les monoterpène synthases catalysent la conversion du GPP (C10) en un hydrocarbure monoterpénique principalement, un alcool ou un éther (monoterpénoïdes)²¹⁷. La cyclisation du GPP nécessite une étape d'isomérisation (Figure 36).



Figure 36 : Isomérisation et ionisation du GPP (adaptée de la publication de Dickschat, 2016). La cyclisation du GPP en monoterpénoïdes nécessite une étape d'isomérisation (formation du LPP) puis d'ionisation conduisant au carbocation α -terpinyle, intermédiaire commun à tous les monoterpénoïdes cycliques.

Ainsi, le clivage de la liaison ester de diphosphate du GPP génère le cation géranyle (**A**) et libère le groupement diphosphate. Ce dernier réagit avec le carbone en position C₃ du cation (**A**) pour former le diphosphate de linalyle (**B**, LPP). L'ionisation suivie de la cyclisation de ce dernier conduisent à la formation de la liaison C₁-C₆ générant ainsi le cation α -terpinyle (**C**) (Figure 36). A partir de ce cation, des étapes de déprotonation et de cyclisation conduisent à différentes structures monoterpéniques mono- et bicyliques^{17,72,218}. Les monoterpénoïdes peuvent également être acycliques et sont alors synthétisés à partir du cation géranyle ou du cation linalyle^{8,72,217}. Les monoterpénoïdes sont notamment connus pour leurs propriétés odorantes et aromatiques. Du fait de leur volatilité, ils entrent dans la composition de nombreuses huiles essentielles de plantes utilisées dans les secteurs des cosmétiques, arômes et parfums²¹⁸.

Afin d'exemplariser cette catégorie de TSs, les synthèses du linalool (monoterpénoïde acyclique) et du 1,8-cinéole (éther cyclique, monoterpénoïde bicylique) sont par la suite décrites.

• Linalool synthase

Le linalool est un alcool terpénique insaturé dont deux énantiomères existent. Il est possible de les distinguer par l'odeur qu'ils génèrent. En effet, le (*R*)-(-)-linalool est caractérisé par un parfum de lavande boisé et entre dans la composition des huiles de rose, de néroli et de lavande. L'énantiomère dextrogyre (*S*) possède quant à lui une odeur florale, légèrement citronnée et entre dans la compositon de l'huile essentielle de coriandre^{17,22}. Le linalool est principalement utilisé comme molécule odorante dans 60 à 80 % des produits d'hygiène parfumés (lotions, savons, shampoings...), cela représentait en 2017 plus de 1000 tonnes/an²¹⁹.

La linalool/nérolidol synthase (LnS) de *Streptomyces clavuligerus* est une terpène synthase dimérique de classe I caractérisée par deux domaines α^{220} . Le premier en position amino-terminale correspond à une organisation d'hélices α en tonneau dont la fonction n'est pas connue (domaine vestige), le second est localisé à l'extrémité carboxy-terminale et est responsable de l'activité catalytique (domaine α des TSs-I) par la présence des motifs **DDQFD** et **N**ELH**S**FEK**D** (variante du motif NSE/NDE) (Figure 37). Ces derniers sont responsables de la formation du complexe Mg²⁺-diphosphate-enzyme et de l'ionisation du diphosphate²²⁰. D'un point de vue mécanistique, cette terpène synthase catalyse la synthèse du (*R*)-linalool à partir du GPP, *via* le cation géranyle (transoïde, **A**). Brièvement, l'ionisation du GPP conduit au cation géranyle (transoïde, **A**). L'attaque par une molécule d'eau sur le composé (**D**) mène au (*R*)-(-)-linalool (**E**)^{217,219} (Figure 37).



Figure 37 : Structure quaternaire de la linalool synthase de *S. clavuligerus* **et représentation schématique de la conversion du GPP en linalool catalysée par cette enzyme.** *Sur la structure quaternaire, les deux monomères sont colorés différemment et pour l'un des monomères, la position des motifs conservés et la localisation du site actif sont mis en évidence (flèche et cercle).*

• 1,8-cinéole synthase

Le 1,8-cinéole est un éther bicyclique plus connu sous le nom d'eucalyptol²². A ce titre, il est le composant majoritaire de l'huile essentielle d'eucalyptus mais entre également dans la composition des huiles de lavande. Il est caractérisé par un parfum épicé (utilisé en cosmétiques, ou comme arôme) et des propriétés antioxydantes et antiinflammatoires^{17,41,221}. La 1,8-cinéole synthase de *Steptomyces clavuligerus* est une TS-I dimérique constituée du domaine α catalytique (extrémité C-terminale) comportant les motifs NDVLSLEKE et DDHFD^{217,219}. Elle catalyse la synthèse du 1,8-cinéole à partir du cation α -terpinyle (C, Figure 36) suite à l'isomérisation, cyclisation et ionisation du GPP. La première cyclisation suit le mécanisme général d'ionisation catalysé par les TSs-I (Chapitre IB.II.b.i) et conduit au α -terpinéol (F) suite à l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau, piégée dans le site actif de l'enzyme. Selon Scrutton et collaborateurs, l'addition de la molécule d'eau est suivie d'une étape de rotation. Cette dernière permet d'initier la seconde réaction de cyclisation par la protonation (intramoléculaire) de la double liaison du composé (F), générant un carbocation tertiaire intermédiaire. Ce dernier subit une attaque intramoléculaire par le groupement hydroxyle et conduit ainsi au 1,8-cinéole²¹⁹ (Figure 38).



Figure 38 : Mécanisme réactionnel associé à la conversion du GPP en 1,8 cinéole, par CinS de *S. clavuligerus* dont la structure quaternaire est présentée dans l'encadré (figure adaptée de la publication de Scrutton et collaborateurs (Karuppiah *et al.* 2017)).

2. Sesquiterpène synthases

Ces enzymes sont impliquées dans la synthèse des sesquiterpénoïdes à partir du précurseur linéaire FPP (C₁₅). A la différence du GPP, le FPP peut être directement cyclisé selon deux mécanismes différents, en fonction des atomes impliqués. La cyclisation 1-10 génère le cation (*E*,*E*)-germacrényle et la cyclisation 1-11 le cation (*E*,*E*)-humulyle. L'isomérisation du FPP en diphosphate de nérolidyle (NPP) permet quatre autres cyclisations *i.e.* 1-6, 1-7, 1-10 et 1-11 conduisant respectivement aux cations bisabolyle, cycloheptényle, (*E*,*Z*)-germacrényle et (*E*,*Z*)-humulyle (Figure 39).



Figure 39 : Les six réactions de cyclisation possibles à partir du FPP.

L'ionisation Mg^{2+} -dépendante du FPP conduit au cation farnésyle. Selon que la cyclisation implique le carbone 1 et le carbone 10 ou 11, les cations (E,E)-germacradiényle ou (E,E)-humulyle sont respectivement obtenus. L'isomérisation du cation farnésyle en cation nérolidyle permet quatre autre modes de cyclisation conduisant à quatre autres cations i.e. (Z,E)-germacradiényle (1,10), (Z,E)-humulyle (1,11), bisabolyle (1,6) et cycloheptényle (1,7).

Ainsi, une grande diversité de produits sesquiterpéniques peut être synthétisée. Cette diversité est illustrée sur la Figure 40 représentant l'ensemble des sesquiterpènes d'actinomycètes décrits jusqu'en 2017 et obtenus à partir du FPP *via* cinq des six cyclisations évoquées précédemment^{*}.

Les sesquiterpénoïdes constituent une classe très diversifiée de composés adoptant des structures majoritairement cycliques (mono-, bi-, tri-), mais également linéaires ou comprenant un système γ -lactone^{17,218}. Ces terpénoïdes entrent dans la composition d'huiles essentielles (camomille, patchouli...) et présentent des activités biologiques antibactérienne, antifongique et anti-inflammatoire²²².

^{*} Cette figure résulte d'une étude bibliographique que j'ai réalisée lors de ma deuxième année de Master sous la direction du Pr. Gilles Iacazio, dans le but de décrire de façon exhaustive l'espace chimique couvert par les sesquiterpène synthases d'actinomycètes.





• Amorphadiène synthase

L'amorphadiène est certainement l'un des exemples de sesquiterpénoïdes les plus connu du fait qu'il est un intermédiaire dans la biosynthèse de l'artémisinine, antipaludique produit naturellement par *Artemisia annua*^{91,223}.

Le groupe de Quax propose un modèle structural sur la base de l'homologie de séquence (89,6 % de similarité et 80 % d'identité) que partage l'amorphadiène synthase (AMS) avec une autre sesquiterpène synthase *d'A. annua*, l' α -bisabolol synthase cristallisée (ID PDB : 4GAX). Ainsi, l'AMS semble adopter les caractéristiques d'une terpène synthase de classe I *i.e.* un domaine α et la chélation d'un centre trinucléaire de magnésium par les motifs **D**DTY**D** et **N**DLM**T**HKA**E**²²⁴.

L'amorphadiène synthase catalyserait la cyclisation du FPP selon le mécanisme proposé par Brodelius et collaborateurs, représenté sur la Figure 41²²³.





Le FPP est dans un premier temps ionisé et le groupement diphosphate libéré. L'attaque nucléophile sur le carbone C₃ du cation par le groupement diphosphate génère l'intermédiaire (3*R*)-nérolidyl diphosphate (NPP). Par la suite, la rotation de la liaison C₂-C₃ conduit au conformère cisoïde. L'ionisation de ce dernier suivi d'une cyclisation de type 1-6 (numérotation initiale du FPP) permet l'obtention du cation bisabolyle. Un transfert d'hydrure 1,3 forme l'intermédiaire cationique, cyclisé suite à l'attaque électrophile sur le carbone C₁₀. Le cation amorphényle ainsi produit est déprotoné, dans une dernière étape conduisant au (1*S*,6*R*,7*R*,10*R*)-amorpha-4,11-diène, comme produit majoritaire^{223,224}.

• Pentalénène synthase

La pentalénène synthase régit la cyclisation du FPP en pentalénène, hydrocarbure tricyclique, et catalyse ainsi la première étape de la biosynthèse de l'antibiotique pentalénolactone, isolé de *Steptomyces roseogriseus* en 1957 ^{225,226}.

L'élucidation de la structure cristalline de la pentalénène synthase de *Streptomyces* UC5319 révèle qu'elle adopte une structure monomérique constitué d'un domaine α , la présence des motifs **D**DLF**D** et **N**DIA**S**LEK**E** étant impliqués dans la fixation du centre trinucléaire de magnésium, caractéristiques des TSs-I²²⁷.

Gutta et Tantillo proposent un mécanisme catalytique, sur la base de calculs théoriques, initié par la cyclisation 1-11 du FPP générant le cation (*E*,*E*)-humulyle (**A**, Figure 39). L'isomérisation de ce dernier (**B**) suivie d'une cyclisation conduit au cation 7-protoilludyle (**C**). Un réarrangement suivi d'une déprotonation permet de convertir le cation 7-protoilludyle en cation pentalényle (**D**), puis en pentalénène²²⁸ (Figure 42).



Figure 42 : Mécanisme réactionnel pour la conversion du FPP en pentalénène proposé par Gutta et Tantillo (figure adaptée de la publication de Gutta et Tantillo, 2006) et structure quaternaire de la pentalénène synthase de *Streptomyces* (issue de la PDB).

La pentalénolactone, antibiotique sesquiterpénique cyclique, est ensuite obtenue par conversion oxydative du pentalénène. La voie de biosynthèse associée permet d'illustrer comment la Nature génère des composés terpéniques fonctionnalisés et quelles sont les enzymes de « décoration » impliquées dans les processus d'oxydation, de réduction et de transfert de groupement. Ainsi, Cane et Ikeda³⁰ ont cloné et séquencé, dans leur intégralité, les gènes de clusters impliqués dans la biosynthèse de la pentalénolactone chez *Streptomyces exfoliatus* UC5319 et *Streptomyces arenae* TÜ469 (Figure 43).



Figure 43 : Clusters de gènes impliqués dans la biosynthese de la pentalenolactone chez *Streptomyces exfoliatus* UC5319 (cluster pen) et *Streptomyces arena* TÜ469 (cluster pnt) et voie de biosynthèse associée (figure adaptée de Cane et Ikeda, 2012 et Zhu *et al.*, 2013).

Au niveau des clusters de gènes, le code couleur utilisé permet de distinguer en vert le gène responsable de la résistance à la pentalenolactone, en mauve le gène codant la pentalenene synthase et en jaune celui codant la FPPS. Les gènes biosynthétiques sont eux représentés par une flèche rouge. Ces clusters sont constitués de 10 gènes dont la majorité codent des protéines impliquées dans des réactions d'oxydation. En effet, à l'exception des gènes gapR/gapN (résistance antibiotique), pntG/penG (transporteur d'efflux) et pntB/penB (FPP synthase), les huit autres gènes codent des cytochromes P450 (pntM/penM et pntI/penI), des monooxygénases de type Baeyer-Villigerases NADPH-dépendantes (pntE/penE) et des dioxygénases α -cétoglutarate dépendantes^{30,229}. La Figure 43 présente ainsi les différentes étapes permettant de convertir le FPP en pentalenolactone et les catalyseurs impliqués.

3. Diterpène synthases

Les diterpène synthases permettent la conversion du GGPP (C₂₀) en différents diterpénoïdes. Dans le même esprit que pour le FPP, différentes cylisations métal dépendantes du GGPP sont possibles impliquant la formation d'une liaison carbonecarbone C1-C6, C1-C7, C1-C10, C1-C11, C1-C14 et C1-C15 (sur le même principe que ce qui est observé pour la cyclisation du FPP, Figure 39), générant ainsi une grande diversité de composés en lien avec l'orientation spatiale du GGPP et la trajectoire selon laquelle ces liaisons sont établies²³⁰. En effet, cette diversité est étroitement liée au fait que cette classe d'enzymes regroupe des TSs de type I et de type II dont les mécanismes catalytiques diffèrent. Les TSs-I, constituées du seul domaine α, catalysent l'ionisation du GGPP par clivage de la liaison ester de diphosphate médiée par les motifs DDxxD et NSE/DTE. Les TSs de type II sont généralement multidomaines et initient l'ionisation du GGPP par une protonation via le résidu aspartate du motif DxDD (réaction type des TSs-II, Chapitre IB.II.b.ii). Selon la conformation adoptée par le cation géranylgéranyle (chaise-chaise, chaise-bateau ...), la cyclisation de ce dernier conduit à quatre différents stéréoisomères cationiques. Le groupement diphosphate étant toujours présent, ces composés peuvent par la suite être cyclisés selon un mécanisme de type I, par exemple^{8,217,230}.

Les diterpénoïdes sont composés de cycles dont le nombre et la taille varient considérablement, les casbènes possèdent par exemple un cycle impliquant 14 atomes de carbones¹⁷. Contrairement aux mono- et sesquiterpènoïdes, les diterpénoïdes ne sont pas des composés volatiles du fait de leur taille, ils possèdent cependant des activités

biologiques d'intérêt *i.e.* antifongique (casbène^{*})^{231,232}, anti-inflammatoire (facteurs Euphorbia[†])²³³, anticancéreuse (Taxol[®])²³⁴...

• Taxadiene synthase

Elle convertit le GGPP en taxadiène (produit majoritaire), précurseur diterpénique de l'anticancéreux paclitaxel plus connu sous le nom commercial de Taxol[®]. Ce dernier a été isolé de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*) et est utilisé entre autres dans le traitement de cancers bronchopulmonaires, du sein et de l'ovaire^{‡234,235}. La première étape de la biosynthèse du taxadiène consiste en une ionisation du GGPP en présence d'un cation divalent et par libération du groupement diphosphate. La formation d'une liaison C₁-C₁₄ conduit au cation cyclique verticillyle. Le transfert d'un proton directement du carbone C₁₀ au carbone C₆ (face ré) et la formation de la liaison C₂-C₇ permet la synthèse du cation taxényle. La déprotonation de ce dernier est la dernière étape pour l'obtention du taxa-4(5),11(12)-diène^{8,91,236} (Figure 44).



Figure 44 : Conversion du GGPP en taxadiène par la taxadiène synthase de *T. brevifolia,* dont la structure quaternaire monomérique est donnée dans l'encadré (figure adaptée de la publication Köksal *et al,.* 2011).

La position 1 est indiquée dès la première cyclisation afin de faciliter la compréhension des différentes étapes mécanistiques. Sur la structure quaternaire sont représentés avec une couleur différente les domaines α , β , et γ . Le domaine α , catalytique, contient le site actif typique des TSs-I avec les motifs DDxxD et NSE/DTE.

^{*} Les casbènes sont des métabolites spécialisés produits par les semis de ricin en réponse à un stress suite à une exposition à des champignons ; ils sont caractérisés par une activité antifongique.

[†] Ce sont des diterpénoïdes avec un squelette lathyrane, isolés et caractérisés chez les espèces du genre *Euphorbia.*

[‡] Le paclitaxel agit au niveau du cytosquelette des cellules eucaryotes et plus précisemment au niveau des fibres constitutives que sont les microtubules. Ces derniers jouent un rôle central dans la division cellulaire. Le paclitaxel stabilise les microtubules et favorise la formation de faisceaux, phénomènes provoquant la mort des cellules.

Dans le même esprit que précédemment décrit, le paclitaxel est obtenu à partir du taxadiène par des réactions d'hydroxylation, d'acétylation et d'acylation catalysées par des cytochromes P450 et des transférases (acyl- et acétyl-)⁹¹.

Les structures de la taxadiène synthase de *Taxus brevifolia* en présence de Mg²⁺ et soit d'un analogue non réactif du GPP, soit d'un analogue bicylique du taxadiene ont été résolues respectivement à 2,25 Å et 1,82 Å par Christianson et collaborateurs en 2011²¹⁵. Les auteurs décrivent un monomère constitué du domaine α au sein duquel est retrouvé le site actif associé aux TSs-I et le domaine mixte $\beta\gamma$ non-catalytique dont l'extrémité amino-terminale vient recouvrir le site actif lors de la fixation du substrat. Les données structurales confirment la présence du centre trinucléaire de magnésium coordiné par les motifs conservés **D**DMA**D** et **N**DTK**T**YQA**E** permettant la liaison du subtrat et du produit dans le site actif (Figure 44).

4. Une terpène synthase bifonctionnelle

• Géosmine synthase

La géosmine est un sesquiterpénoïde volatile généré par des espèces du genre *Streptomyces* vivant dans le sol, à l'origine d'une odeur terreuse souvent ressentie lorsque la terre est fraîchement retournée²³⁷. La géosmine synthase est une sesquiterpène synthase monomérique, constituée de deux domaines α catalytiques, lui conférant une bifonctionnalité²³⁸. De façon surprenante, elle génère la géosmine (produit majoritaire) à 12 atomes de carbone à partir du FPP, suggérant ainsi une réaction de fragmentation au cours du mécanisme qu'elle catalyse²³⁹. En effet, le premier domaine α , localisé au niveau de l'extrémité amino-terminale, est impliqué dans l'ionisation et la cyclisation du FPP médiée par le cation divalent Mg²⁺ (Figure 45). Le second catalyse la conversion Mg²⁺ dépendante du germacradiénol en géosmine et en acétone *via* une suite de réactions de protonation-cyclisation-fragmentation ^{239,240}.



Figure 45 : Mécanisme de cyclisation du FPP catalysée par la géosmine synthase dont la structure du domaine amino-terminal (géosmine synthase de *S. coelicolor***) est présentée dans l'encadré.** *La figure du mécanisme est adaptée de celle proposée par le groupe de Christianson et collaborateurs (Harris et al. 2015), les flèches violettes indiquant le mécanisme conduisant à la géosmine, produit majoritaire. La structure cristalline du domaine amino-terminal résolue par Christianson et collaborateurs est extraite et retravaillée à partir de la PDB.*

Brièvement, le FPP est fixé dans le site actif du domaine amino-terminal selon le modèle des TSs-I par l'intermédiaire de trois ions Mg²⁺ eux-même coordinés par les motifs conservés **D**DHFLE et **N**DLF**S**YQR**E** et des molécules d'eau²³⁸La cyclisation 1-10 du FPP a lieu après ionisation, suite au départ du groupement diphosphate, de ce dernier et permet l'obtention du cation (E,E)-germacrényle (A). Ce cation est dans un premier temps déprotoné générant l'isolépidozène (**B**), lui même converti après protonation-ouverture du cyclopropyl-attaque d'une molécule d'eau en germacradiénol (produit majoritaire, 85 %) (C). Christianson et collaborateurs proposent l'implication de résidus glutamate et histidine dans ces étapes de protonation et déprotonation. Par la suite, le germacradiénol se dissocie du site actif du premier domaine pour rejoindre le second domaine α (extrémité carboxy-terminale), possédant les motifs DDYYP et NDVFSYQKE²³⁸. Au sein de ce domaine, le germacradiénol subit une étape de protonation, *via* un ou deux des résidus aspartate(s) du motif DDYYP. Cette étape initie une nouvelle cyclisation et la fragmentation produisant l'acétone d'une part et la *trans*-octaline (**D**) d'autre part. Le composé **D** est ensuite protoné, subit un transfert d'hydrure 1,2 et l'attaque d'une molécule d'eau permettant la synthèse de la géosmine^{8,217}.

Les terpène synthases constituent une vaste famille d'enzymes et catalysent des réactions chimiques parmi les plus complexes rencontrées dans le monde vivant⁸. En effet, à elles seules, ces enzymes genèrent des composés à multiples centres stéréogènes, principalement constitués d'un ou plusieurs cycles^{25,75}, via des intermédiaires cationiques très réactifs, dont la formation est fortement dépendante de l'architecture de leur site actif¹⁵⁶. Ces composés ou terpénoïdes sont obtenus par action uniquement d'une terpène cyclase catalysant la formation de nouvelles liaisons, le changement d'hybridation d'un ou plusieurs atomes de carbone du substrat, des réarrangements et tout cela en une seule réaction multi-étapes⁸. Outre ces similitudes catalytiques, elles ont également en commun au niveau de leur séquence primaire des motifs conservés, impliqués dans l'activation du précurseur ou substrat linéaire. Lorsque l'on considère l'architecture tridimensionnelle de ces enzymes, une importante diversité est également observée liée au nombre et à la nature du ou des domaine(s) constitutif(s) α , et/ou $\beta\gamma$. Bien que certaines terpène synthases ne génèrent qu'un seul et unique produit (limonène synthase, δ -cadinène synthase), la majorité d'entre elles produisent plusieurs composés cycliques dont un est majoritaire¹⁵⁶. Tout comme les prényl transférases, les TSs peuvent également présenter une promiscuité naturelle envers différents substrats tels que : des diphosphates à plus longue chaîne hydrocabonée incluant les isomères des substrats naturels²⁴¹, des diphosphates à chaîne plus courte également tolérés du fait d'une accomodation dans le site actif (liée à un encombrement stérique moins important)²⁴²mais également des diphosphates non-naturels^{243,244}.

La diversité structurale ainsi générée par les terpène synthases et les propriétés biologiques des terpénoïdes sont à l'origine de la recherche de nouvelles stratégies de synthèse permettant une production à grande échelle de ces composés²⁴⁵. En effet, bien qu'utilisées initialement pour l'isolement des composés terpéniques, les sources naturelles telles que les plantes ne permettent pas de répondre à la demande croissante d'une production à grande échelle, efficace, et à faible coût (croissance des plantes, coût de l'extraction et faible rendement)^{3,246}. La synthèse chimique est également limitée par la complexité des structures terpéniques et plus particulièrement par la régio- et stéréo-spécificités que la production des isoprénoïdes nécessite, rendant les procédés chimiques difficilement viables et peu cohérents avec les enjeux environnementaux actuels (synthèses multi-étapes, contrôle de la spécificité, purification et/ou isolement d'intermédiaires, conditions réactionnelles...).

En réponse à ces problématiques, la communauté scientifique s'est orientée vers la biologie de synthèse utilisant notamment les techniques d'ingénierie pour façonner des microorganismes en de véritables usines cellulaires, impliquant le recours à des enzymes régio- et stéréosélectives.

C. LA BIOLOGIE SYNTHETIQUE POUR LA PRODUCTION DE TERPENES

L'approche biosynthétique vise à proposer une alternative adaptée (régiospécificité, stéréospécificité ...), économique (coût du procédé et durée de synthèse) et renouvelable (substrats d'origine naturelle ou biosourcés, conditions réactionnelles « douces », synthèse en phase aqueuse...) aux procédés de synthèse chimiques et d'extraction de sources naturelles, pour la production des terpénoïdes²³. Différentes stratégies ont été développées reposant, par exemple, sur l'ingénierie métabolique des voies de biosynthèses MVA et MEP (Figure 46)^{23,245,246}.



Figure 46 : Vue d'ensemble des voies de biosynthèses naturelles des isoprénoïdes du mévalonate (MVA) et du méthylérythritol phosphate (MEP), extraite de la publication de Ward et collaborateurs, 2020.

Pour chacune de ces deux voies métaboliques sont réprésentées par des flèches violettes les cofacteurs et partenaires Redox, les traits discontinus rouges indiquent les étapes négativement régulées alors que la flèche discontinue verte schématise une régulation positive.

En effet, elles représentent des cibles évidentes du fait qu'elles sont à l'origine des précurseurs isopréniques IPP et DMAPP, éléments clés dans la synthèse des isoprénoïdes²³. Cette stratégie d'ingénierie implique d'équilibrer la demande en énergie, en cofacteur et en source(s) de carbone (précurseurs et intermédiaires) de ces voies métaboliques²⁴⁵.

Il est également indispensable d'éviter l'accumulation d'intermédiaires toxiques (tel que l'IPP ²⁴⁷), et de contourner ou supprimer les limitations (enzyme et/ou substrat et/ou produit dépendantes)^{248,249} afin de maximiser la productivité des systèmes biologiques. Par la suite, quelques exemples d'approches conduites sur les systèmes modèles *E. coli* et *S. cerevisiae* seront détaillées.

Le groupe de Keasling se distingue particulièrement au travers notamment de l'ingénierie des microorganismes modèles *E. coli* et *S. cerevisiae* ^{247,250–253}. En 2003, ils décrivent la production d'amorphadiène, précurseur sesquiterpénique de l'antipaludique artémisinine (Figure 41), résultant de l'introduction chez *E. coli* de la voie du mévalonate de *S. cerevisiae* ²⁴⁷ (Figure 47).



Figure 47 : Conception d'une voie du mévalonate synthétique pour la production d'amorphadiène chez *E. coli* par le groupe de Keasling (Martin *et al.,* 2003).

En effet, bien que différents travaux d'ingénierie de la voie du MEP aient permis d'augmenter l'apport en précurseurs (IPP, DMAPP) et ainsi d'accroître la production de divers terpénoïdes tels que le taxadiène²⁵⁴ et des caroténoïdes ^{255,256}, les mécanismes de régulation contrôlant cette voie sont peu compris limitant ainsi les possibilités d'amélioration^{247,257,258}. Keasling et collaborateurs ont ainsi contourné cette limitation en concevant une voie du mévalonate hétérologue, ne pouvant être régulée dans *E. coli*, avec pour objectif l'augmentation de la concentration intracellulaire de FPP (précurseur linéaire des sesquiterpénoïdes et donc de l'amorphadiène)^{247,258}.

Pour cela, ils ont construit deux opérons assemblant les gènes responsables de la synthèse de FPP à partir d'acétyl-CoA. D'une part, l'opéron *mevT* est composé des gènes codant les enzymes responsables de la conversion de l'acétyl-CoA en mévalonate *i.e.* l'acétoacétyl-CoA d'*E. coli* (atoB), l'HMG-CoA synthase (HMGS) et l'HMG-CoA réductase de *S. cerevisiae* (tHMGR). D'autre part, le second opéron nommé *mbis* contient les gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse du FPP à partir du mévalonate *i.e.* : une mévalonate kinase (ERG1), une phosphomévalonate kinase (ERG8) et une mévalonate diphosphate décarboxylase (MVD1) de *S. cerevisiae* avec l'IPP isomérase (*idi*) et la FPPS (*ispA*) *d'E. coli.* A ces constructions est ajouté le gène synthétique de l'amorphadiène synthase permettant de compléter la voie de biosynthèse de ce dernier (Figure 47).

Dans ces conditions, la bactérie ainsi modifiée permet de multiplier par un facteur 36 la quantité d'amorphadiène produite, en comparaison de la quantité obtenue via la voie du MEV native et conduit après modification du milieu de culture (initialement milieu LB, puis supplémenté avec 0,8 % de glycérol) à une concentration en amorphadiène égale à 112 mg/L (en flasques)^{247,258}. Ces travaux ont permis la construction d'une souche recombinante capable de produire l'amorphadiène, un sesquiterpénoïde à haute valeur ajoutée, en offrant un facteur d'amélioration considérable. Suite à cette étude pionnière, le même groupe est parvenu à atteindre l'échelle du g/L après diverses optimisations reposant sur la prise en compte et la limitation de la volatilité de l'amorphadiène (fermentation liquide biphasique, milieu de culture/dodécane)²⁵⁹, la mise au point du milieu de culture (milieu LB, puis TB, puis milieu minéral tamponné supplémenté avec du glucose)^{247,251}, la régulation de la voie modifiée du mévalonate (accumulation délétère d'HMG-CoA* contrée par l'ajout d'acide oléique et palmitique dans le milieu de culture)^{260,261}, la modulation de l'expression des différentes enzymes en jouant sur la force des promoteurs et le nombre de copies de plasmide²⁴⁷. La voie optimale a conduit à 27,4 g/L d'amorphadiène²⁵¹ par un procédé de fermentation en mode « fed-batch »[†], plus haute concentration atteinte à ce jour chez un microorganisme^{23,258}.

^{*} Keasling et collaborateurs ont mis en évidence que la voie synthétique introduite chez *E. coli* conduisait à l'accumulation d'HMG-CoA inhibant la synthèse d'acide gras indispensable au maintient de la membrane cellulaire et donc de l'intégrité de l'hôte.

[†] Le procédé de fermentation « fed-batch » correspond à un système partiellement ouvert du fait que le milieu est supplémenté, au cours de la culture, par des nutriments et substrat. Ce procédé présente l'avantage de pouvoir étendre la durée de culture, et maximiser le rendement en produit final.

Plus récemment et dans le même esprit du procédé précédent, Keasling et collaborateurs se sont focalisés sur la voie du MEP dont l'efficacité carbone est supérieure à celle de la voie du MVA, permettant théoriquement d'atteindre de plus hauts rendements^{23,250}. Ces travaux combinant des approches de biologie synthétique, métabolomique et biochimie reportent pour la première fois, l'expression fonctionnelle de la voie du MEP chez S. cerevisiae, synthétisant naturellement les isoprénoïdes via la voie du mévalonate. Sur la base d'études indépendantes, la voie du méthylérythritol phosphate (MEP) exprimée chez *S. cerevisiae* ne permet pas de conduire aux intermédiaires IPP et DMAPP et est stopée au niveau du méthylérythritol cyclodiphosphate (MEcPP), produit de la cinquième étape de cette voie métabolique^{262,263} (Figure 16). Les étapes suivantes sont catalysées par deux réductases (IspG et IspH) à centre [4Fe-4S] en présence de NADPH et de partenaires Redox enzymatiques (flavodoxine et flavodoxine réductase chez *E. coli*) limitant l'ingénierie des levures par introduction de la voie du MEP. En effet, ces limitations sont liées à la difficulté d'assembler les clusters [4Fe-4S] fonctionnels dans les protéines hétérologues^{262,263}, à l'absence de flavodoxines et d'une réductase associée²⁶⁴, à la solubilité de IspG et IspH dans le cytosol de la levure²⁵⁰ et à la sensibilité de IspG à l'oxygène^{265,266}. Cependant, les auteurs sont parvenus à rendre fonctionnelle dans sa totalité, pour la première fois, la voie du MEP chez S. cerevisiae, suite au criblage de nouvelles réductases solubles et fonctionnelles et des partenaires Redox associés. Ainsi, la combinaison des enzymes IspG de Bacillus coagulans, IspH d'E. coli en présence de flavodoxines de Bacillus coagulans ont permis de valider la fonctionnalité de cette voie hétérologue, pour la synthèse d'ergostérol, en absence de mévalonate, en milieu liquide. Cependant, la croissance cellulaire n'étant possible qu'à très faible aération (afin de minimiser l'effet du stress oxydatif sur l'IspG *i.e.* la dégradation oxydative des clusters Fe-S), les auteurs décrivent l'accumulation d'intermédiaires dans ces conditions, suggèrant la disponibilité limitée du NADPH. Il apparait ainsi que l'IspG est l'un des points clés pour l'amélioration de ce système biologique et plus particulièrement la biosynthèse, l'assemblage et la réparation en conditions de stress oxydatif des clusters [4Fe-4S]²⁵⁰.

Ces deux exemples portant sur l'introduction d'une voie de biosynthèse complète chez un microorganisme ne sont qu'une partie de l'ensemble des études visant à produire des terpénoïdes par biologie synthétique. Ils permettent d'avoir une idée des possibilités qu'offre actuellement ce domaine de la science pour l'accès à des molécules biologiques, potentiellement à grande échelle. Ainsi, outre la conception de voies hétérologues pour l'ingénierie de microorganismes hôtes, d'autres stratégies sont également utilisées et/ou développées telles que l'ingénierie enzymatique, la création de nouvelles voies métaboliques, la co-culture de microorganismes, la conception d'un système « push-pull » et la synthèse acellulaire (production des systèmes enzymatiques d'intérêt par un microorganisme par la suite purifiés et utilisés en synthèse *in vitro*) pour la synthèse de composés terpéniques^{23,245,246}.



Figure 48 : Stratégies pour la production de composés terpéniques via l'approche « push-pull » (A) ou la co-culture mutualiste de microorganismes (B) (figure adaptée de Daletos *et al.*, 2020).

La stratégie « push-pull » (Figure 48A) correspond dans le contexte plus spécifique des isoprénoïdes, à la régulation d'une voie favorisant dans un premier temps par exemple la synthèse d'acétyl-CoA (point de départ de la voie du mévalonate), puis sa conversion en IPP et DMAPP pour la production de divers terpénoïdes²⁴⁶. Nielsen et collaborateurs ont appliqué cette stratégie^{23,250}, ce qui leur a permis d'augmenter d'un facteur quatre la production de santalène. Ils ont ainsi surexprimé une alcool déshydrogénase native, responsable de la conversion d'éthanol en acétaldéhyde pour augmenter l'apport en acétyl-CoA (« push »), et de l'acétyl-CoA acétyltransférase, première enzyme de la voie du mévalonate (« pull »). Afin de maximiser l'effet « pull », les réactions compétitives du cycle de Krebs, impliquant la consommation de l'acétyl-CoA, ont été bloquées.

La Figure 48B schématise le principe de co-culture qui présente notament l'avantage, lors de l'expression hétérologue de plusieurs gènes, de limiter la consommation excessive des ressources cellulaires. Cette stratégie permet également de minimiser l'accumulation d'intermédiaires toxiques et de sous-produit(s) pouvant être à l'origine d'un retard de croissance. Elle offre également une solution efficace aux problématiques de compatibilité rencontrées classiquement entre l'hôte sélectionné et le ou les protéine(s), le plus souvent hétérologue(s), qu'il doit produire. Autrement dit, cette stratégie offre plus de flexibilité en permettant l'expression de gènes dans l'hôte le plus adapté.

Cette approche consiste en un système combinant au moins deux souches et dont le produit synthétisé par l'une des souches est métabolisé en produit final d'intérêt par la deuxième. La co-culture de mêmes hôtes et d'hôtes différents a été conduite dans le cadre de différents travaux²⁶⁷⁻²⁷⁰. Ainsi, Stephanopoulos et collaborateurs ont développé une co-culture stable dans un même bioréacteur des souches E. coli et S. cerevisiae, modifiées de telle sorte que la bactérie synthétise le taxadiène, qui est ensuite oxydé par la levure via l'action de cytochromes P450. Le changement de la source de carbone du glucose vers le xylose a permis aux auteurs de mettre en évidence une interaction mutualiste entre les deux souches. E. coli synthétise l'acétate qui est utilisé comme seule source de carbone par la levure. De plus, cette co-culture diminue la concentration d'éthanol dans le milieu (issu du procédé de fermentation alcoolique de la levure), affectant la croissance bactérienne. Dans ces conditions, 4 mg/mL (pour une productivité égale à 0,056 mg/L/h) de taxanes oxygénés sont obtenus après 72 h, soit dans le même intervalle de temps, deux fois plus que lorsque la source de carbone était le glucose. Après optimisation, l'application de cette stratégie a permis d'atteindre une concentration en taxanes oxygénés égale à 33 mg/L correspondant à une productivité égale à 0,17 mg/L/h ²⁶⁹.

Dans une revue récemment publiée, Moser et Pichler répertorient à l'aide de la figure suivante (Figure 49) les productions de terpénoïdes les plus importantes réalisées par des microorganismes *via* l'une ou plusieurs des stratégies évoquées précédemment. Cette figure permet d'illustrer l'attrait de la communauté scientifique pour la production de ces composés par biosynthèse depuis 2009. Elle révèle ainsi l'intérêt de telles approches pour l'accès en quantité et d'une façon plus économique et écoresponsable à des molécules naturelles, pour la plupart biologiquement actives.



Figure 49 : Meilleures productions de terpénoïdes par des microorganismes depuis 2009 (figure adaptée de Malico, 2020).

Cette figure représente pour chaque classe de terpénoïdes, les productions les plus élevées au sein de différents microorganismes procaryotes et eucaryotes. L'intensité de coloration dans chaque classe terpénique est directement liée aux valeurs de production, ainsi plus la valeur est élevée et plus la couleur associée est foncée. Pour chaque production est donnée l'organisme hôte, le composé terpénique produit et la concentration associée, ainsi que le mode de culture (sf : en flasque, br : en bioréacteur, mtp : en plaque multipuits). Les travaux de Keasling décrits précédemment (Chapitre IC) sur l'introduction de la voie du MVA de S. cerevisiae chez E. coli pour la production d'amorphadiène correspondent à l'encadré noir sur la figure.

Ce chapitre a permis d'aborder les éléments clés relatifs à la production naturelle de composés terpéniques. Les travaux engagés durant cette thèse s'inscrivent dans une démarche de développement d'une alternative synthétique pour la production de ces composés d'intérêt. Les résultats obtenus seront, par la suite, organisés en deux chapitres. Le premier permettra de détailler le développement séquentiel d'une nouvelle mini-voie de biosynthèse artificielle des terpènes. Le second présentera les différentes applications de cette mini-voie répondant ainsi aux objectifs initiaux de proposer une alternative efficace et valide aux voies naturelles et d'explorer l'espace chimique qu'offrent les composés isopréniques.

Chapitre II



Chapitre II La mini-voie de biosynthèse des terpènes

Α.	CHOIX DES COMPOSANTS DE LA CASCADE ENZYMATIQUE	84
Ι.	Les substrats	84
П.	Les enzymes	87
а	. Etat de l'art	87
Ι.	CATALYSEURS POUR LA CONVERSION DES ALCOOLS D'INTERET IOH ET DMAOH	87
П.	CATALYSEURS POUR LA CONVERSION DES MONOPHOSPHATES EN IPP ET DMAPP	93
b	. Criblage à haut débit pour l'identification d'IPKs et de NSAPs compatibles	100
C.	Les enzymes sélectionnées	105
Ι.	La phosphatase acide de Xanthomonas translucens	105
П.	L'ISOPENTENYL PHOSPHATE KINASE DE METHANOCOCCUS VANNIELII	112
В.	MISE EN PLACE D'UNE PREUVE DE CONCEPT <i>IN VITRO</i>	117
Ι.	Synthèse de la tryprostatine B	118
а	. La prényl transférase d'Aspergillus fumigatus	118
Ι.	Generalites	118
П.	DONNEES STRUCTURALES	119
<i>III</i> .	MECANISME REACTIONNEL	121
b	. La cascade enzymatique	122
Ι.	OBTENTION DES CATALYSEURS D'INTERET	123
П.	PREUVE DE CONCEPT PAR SYNTHESE DE LA TRYPROSTATINE B	124
П.	Étude détaillée de la cascade à trois étapes	135
а	. Le système de recyclage d'ATP	135
b	. Le double enjeu autour de PhoNXt	138
C.	La détermination des facteurs influents et des interactions	144
Ι.	EFFETS PRINCIPAUX ET INTERACTIONS	146
П.	EFFETS D'INTERACTION DE PREMIER ORDRE	148
d	. L'optimisation	150
C.	APPLICATION A LA SYNTHESE IN VIVO DE TRYPROSTATINE B	156
CONCLUSION		

Au cours de ce chapitre, nous décrirons la mise en place d'une nouvelle voie de biosynthèse artificielle des terpènes. En effet, l'intérêt autour de ces composés naturels réside principalement dans le fait qu'ils présentent une grande diversité structurale et fonctionnelle. Cependant, leur accès peut être limité par *i*) une faible disponibilité par extraction directement à partir de sources naturelles, *ii*) une synthèse chimique souvent coûteuse et laborieuse, et *iii*) des voies naturelles de biosynthèse longues. Il existe de ce fait un intérêt grandissant à la mise en place d'alternatives biosynthétiques, dont certaines ont été détaillées dans le chapitre précédent (Chapitre IC), facilitant l'accès à ces composés.

Considérant que l'ensemble des terpènes et plus généralement des terpénoïdes résulte de la condensation d'unités isoprènes que sont les diphosphates de diméthylallyle et d'isopentényle, l'obtention de ces éléments de base définis comme précurseurs universels⁵³ s'est révélée être un point clé. En effet, comme détaillé dans l'introduction bibliographique (Chapitre IB.I) ces diphosphates d'intérêt sont naturellement synthétisés à partir de l'acétyl-CoA par la voie du mévalonate ou du pyruvate et du *D*-glycéraldéhyde phosphate, point de départ de la voie du méthylérythritol phosphate^{58,271}. Quelle que soit la voie considérée, la source de carbone est le glucose impliquant ainsi dix-huit étapes enzymatiques jusqu'à l'obtention du DMAPP et de l'IPP (Figure 50, Annexe N°1 pour une vue d'ensemble allant jusqu'à la synthèse des terpénoïdes à partir de ces précurseurs).



Figure 50 : Voies de biosynthèse naturelles des précurseurs universels IPP et DMAPP (adaptée de Li *et al.* 2018, Hoshino et Gaucher, 2018)

Les substrats à l'origine des voies du MVA (gauche) et du MEP (droite) sont issus de la glycolyse. Les étapes limitantes de chacune de ces voies sont mises en évidence via un cercle en pointillés encadrant le nom du catalyseur associé à l'étape. Des voies synthétiques alternatives à celle du MVA sont indiquées par des flèches grises. Les flèches en pointillés révèlent une synthèse multi-étapes. Chimiquement, ces derniers sont obtenus en deux étapes à partir des alcools correspondant l'alcool diméthylallylique (DMAOH, prénol, 3-méthyl-2-buten-1-ol) et l'isopenténol (IOH, isoprénol, 3-méthyl-3-buten-1-ol).

Selon Poulter et collaborateurs²⁷² la première étape consiste en l'obtention d'un intermédiaire activé, de type tosylate ou bromure, obtenu à partir de l'alcool en C₅. S'en suit une substitution nucléophile selon un mécanisme de type S_N2 entre l'intermédiaire activé et le diphosphate de tetrabutylammonium, l'agent phosphorylant, conduisant au diphosphate d'intérêt (Figure 51).



Figure 51: Synthèse chimique des diphosphates d'intérêt selon Poulter et collaborateurs (Poulter 1986).

(a) chlorure de tosyle, diméthylaminopyridine ;

(b) diphosphate de tetrabutylammonium ;

(c) N-bromoosuccinimide, diméthylsulfure.

Une alternative biosynthétique simple serait d'utiliser une approche similaire à la synthèse chimique, consistant à générer en deux étapes ces esters de diphosphate clés, à partir des alcools correspondant *via* une double phosphorylation, du groupement hydroxyle premièrement puis de l'ester de monophosphate résultant. Cette approche rétro-synthétique est à l'origine du développement de la mini-voie des terpènes (MVT) offrant un accès rapide et facilité aux deux précurseurs et, potentiellement, à l'ensemble de tous les terpènes. Cette voie artificielle utilise les deux terpénols industriels que sont le DMAOH et l'IOH comme sources de carbone pour la synthèse en deux étapes du DMAPP et de l'IPP (Figure 52).



Figure 52 : La mini-voie des terpènes comme alternative biosynthétique à l'accès aux précurseurs universels.

Ces étapes nécessitent deux enzymes capables de réaliser la double phosphorylation des terpénols dans les mêmes conditions de pH, de température et utilisant de préférence le même agent phosphorylant notamment pour le développement *in vitro* de la mini-voie. Une analyse de la littérature a permis de cibler deux classes d'enzymes : *i*) les phosphatases acides (PAs) dont certaines phosphorylent des alcools primaires en présence de diphosphate^{273,274} et *ii*) les isopentényl phosphate kinases (IPKs), décrites comme catalysant la seconde phosphorylation ATP-dépendante de notre cascade^{60,104,106}.

La stratégie d'identification des catalyseurs d'intérêt repose sur un criblage à haut débit conduit dans le cadre du projet ANR Reset^{*}. Réalisé au *Laboratoire de Clonage et de Criblage des Activités de Bioconversions (LCAB)* du Génoscope d'Evry, ce criblage a permis de sélectionner deux enzymes compatibles, correctement exprimées chez *E. coli* et actives sur les substrats d'intérêt, permettant le développement de la cascade *in vitro* : la PA de *Xanthomonas translucens* (PhoN_{Xt}) et l'IPK de *Methanococcus vannielii* (IPK_{Mv}). Concernant l'application *in vivo* de la mini-voie, notre intérêt s'est porté sur la phosphatase de *Salmonella enterica* (PhoN_{Se}) décrite par Wever et collaborateurs²⁷⁵ pour sa capacité à phosphoryler le dérivé hydrogéné du DMAOH et de l'IOH, le 3-méthyl-1butanol en présence de diphosphate. L'IPK sélectionnée est celle impliquée dans une version modifiée de la voie du mévalonate de l'archée *Thermoplasma acidophilum* (IPK_{Ta}) catalysant la phosphorylation de l'IP et du DMAP en présence d'ATP²⁷⁶.

La preuve de concept *in vivo* et *in vitro* de l'applicabilité de cette mini-voie a été faite sur la cascade enzymatique à trois étapes pour la synthèse de la tryprostatine B (TB, activité cytotoxique²⁷⁷) à partir du DMAOH et de la brévianamide F (BF). La troisième étape consiste en une *C*-prénylation du noyau indole de la BF, décrite et catalysée par la prényl transférase (PTase) *d'Aspergillus fumigatus* (FtmPT1_{Af})¹⁷⁵ (Figure 53).

^{*} Le projet ANR Reset (teRpenE mini bioSynthEtic paTh) d'une durée de 42 mois est à l'origine de ces travaux de thèse. Débuté en 2014, il avait pour objectif premier de développer une mini-voie de biosynthèse artificielle des terpènes, implémentable au sein de microorganismes ou utilisable *in vitro*, dans le but de développer une voie d'accès simple, non-polluante et universelle à un ensemble de composés naturels d'intérêt (caoutchouc, aromatiques prénylés, caroténoïdes, sesquiterpènes, diterpènes...). Il impliquait des partenaires industriels *i.e.* les sociétés Charabot et Emac mais également académiques tels que l'Institut des Sciences moléculaires de Marseille (Ism2, AMU), le Laboratoire de criblage des activités de bioconversion (CEA, Génoscope d'Evry) et le Laboratoire de chimie des polymères organiques (LCPO, CNRS, Université de Bordeaux).



Figure 53 : Application de la mini-voie des terpènes à la production de TB, *in vivo* et *in vitro* comme preuve de concept.

La première partie de ce chapitre présentera les différents composants de la mini-voie en développant la sélection des substrats et des enzymes impliquées. Par la suite, l'application *in vitro* (Partie B) et *in vivo* à la production de la TB par une cascade à trois enzymes sera détaillée.

A. CHOIX DES COMPOSANTS DE LA CASCADE ENZYMATIQUE

I. Les substrats

La mini-voie consiste en la synthèse des diphosphates de diméthylallyle et d'isopentényle, à partir d'isopenténol et de l'alcool diméthylallylique. Ces derniers sont des alcools primaires hemiterpéniques insaturés à cinq atomes de carbone (C₅) (Figure 54). Ils peuvent être utilisés comme arômes et parfums notamment dans le domaine des cosmétiques du fait d'une odeur fruitée. Ils sont naturellement retrouvés en faibles quantités au sein de microorganismes tels que *Bacillus subtilis*²⁷⁸ ou *E. coli* ²⁷⁹ du fait de la présence de phosphatases ou diphosphatases endogènes responsables de l'hydrolyse *in cellulo* des dérivés IPP et DMAPP, issus des voies de biosynthèse des terpènes.



Figure 54 : Structure des terpénols industriels, substrats de la mini-voie (gauche) et des diphosphates d'intérêt, produits de la mini-voie (droite).

D'un point de vue industriel, la synthèse de l'IOH **(3)** et du DMAOH **(4)** s'inscrit dans le cadre de la chimie de spécialité et consiste en une réaction de condensation de Prins acido-catalysée à partir d'isobutène **(1)** et de formaldéhyde **(2)**, dérivés du pétrole^{18,19,280} permettant une production de l'ordre de la dizaine de milliers de tonnes par an* et ce à faible coût (Figure 55).



Figure 55 : Procédé industriel de synthèse de l'isopenténol et de l'alcool diméthylallylique.

En accord avec notre volonté de proposer une alternative rentable aux biosynthèses actuelles, le choix de ces terpénols en C₅ est renforcé par le fait que leur synthèse peut être biosourcée. Pour exemple, l'entreprise française Global Bioenergies - fondée en 2008 et basée à Evry – s'est démarquée en développant un procédé innovant visant à convertir au sein d'un microorganisme et par fermentation en milieu liquide des ressources renouvelables (sucres, céréales, déchets agricoles et forestiers), en un gaz l'isobutène[†] facilitant sa récupération^{281,282}. Elle est actuellement à l'étape de commercialisation de ce procédé d'obtention d'isobutène à partir d'hydrolysat de paille de blé[‡] issu d'un partenariat entre Global Bioenergie (Procédé isobutène) et Clariant (Suisse, Technologie SunLiquid®) dans le cadre du projet Optisochem (Projets européens Horizon 2020).

Concernant le formaldéhyde, il est produit à l'échelle industrielle par oxydation catalytique du méthanol[§] *via* l'intervention de catalyseurs à base d'argent ou constitués d'oxydes métalliques^{283,284}. De la même façon que dans le cas de l'isobutène, une entreprise se démarque désormais en proposant un bio-méthanol entièrement biosourcé et renouvelable.

^{*90%} des parts du marché mondial de l'isopenténol sont détenues par les industries BASF (Ludwigshafen am Rhein, Allemagne) et Kuraray (Tokyo, Japon).

[†]L'isobutène est produit à hauteur de 15 millions de tonnes/an et trouve des applications dans le domaine des cosmétiques, des carburants pour l'automobile ou l'aéronautique et de la chimie des matériaux.

[‡]Un pilote industriel opérationnel depuis 2015 a permis d'entamer l'industrialisation du bioprocédé avec une production de l'ordre de la dizaine de tonnes/an.

[§] D'après le site internet <u>https://www.inkwoodresearch.com</u> proposant une étude du marché du méthanol entre 2019 et 2020, plus de 30 % du méthanol produit est utilisé pour la synthèse de formaldéhyde (consulté le 27/11/2020).

Fondée en 1983 en Suède, Södra - groupe international de l'industrie forestière^{*} - vient d'inaugurer le 7 octobre dernier à Mönsterås la première usine mondiale de bio-méthanol commercial, l'un des produits Liquid Forest[™] proposé par le groupe. Brièvement, le méthanol est un sous-produit du procédé kraft (également appelé procédé sulfate, procédé alcalin) permettant la production de pâte à papier à partir de copeaux de bois. Ces derniers sont exposés à de hautes température et pression et dilués dans une solution de sulfure de sodium (Na₂S) et d'hydroxyde de sodium (NaOH). Dans ces conditions alcalines, le bois est dégradé en ses différents constituants cellulose, hemi-cellulose et lignine. La cellulose est isolée par filtration pour la fabrication de pâte à papier, le restant donne lieu à une liqueur noire composée de lignine notamment. La déméthylation de la lignine en présence de soude conduit à la formation de méthanol brut. L'apport de la technologie A-recovery+ par le groupe Andritz[†] a permis l'installation d'une unité de purification du méthanol brut sur le site de Mönsterås. Au sein de cette unité, le méthanol est purifié après lavage par ajout d'eau puis par ajout d'un solvant organique non-polaire de densité supérieure conduisant à l'élimination des contaminants de types térébenthine et composés organiques soufrés²⁸⁵. Ainsi, le groupe Södra est actuellement en mesure de produire plus de 5000 tonnes de biométhanol par an, avec une pureté supérieure ou égale à 99,85 %‡.

De plus, il est intéressant de noter que le contexte économique, politique et environnemental actuel est à l'origine d'un intérêt grandissant autour de ces alcools car ils représentent une alternative renouvelable et durable aux carburants actuels du fait de leurs propriétés physico-chimiques (faible hygroscopie, densité énergétique élevée, meilleure fluidité à basse température)^{278,279,286}. En réponse à ce nouvel objectif, le recours à des usines cellulaires comme moyen de production à grande échelle d'isopenténol et d'autres bio-carburants potentiels ne cesse de s'intensifier.

^{*} Södra est également la plus grande association de propriétaires forestiers de Suède, composée de 53000 membres.

[†] Andritz, dont le siège social est situé à Graz en Autriche est un groupe technologique international fournissant des installations, des systèmes, des équipements et des services pour diverses industries. La société est l'un des leaders technologiques et mondiaux de plusieurs marchés : hydroélectricité, industrie des pâtes et papiers...

[‡] Les informations suivantes sont issues du site internet du groupe Södra et Andritz, consultés le 28/11/2020 aux adresses suivantes : <u>https://www.sodra.com</u> et <u>https://www.andritz.com</u>.

En effet, les microorganismes possèdent de nombreux avantages (taux de croissance élevé, culture et production dans des conditions douces de température et de pH, ...) dont le fait de proposer un système complet doté d'un métabolisme pouvant être modifié et orienté à façon grâce aux ingénieries métaboliques et enzymatiques. La plupart des études menées reposent sur l'ingénierie du microorganisme modèle *E. coli*^{253,255,258,287}.

Ainsi, la forte similarité de structure que partagent l'isopenténol et l'alcool diméthylallylique avec nos composés cibles (IPP et DMAPP), leur disponibilité (production à l'échelle industrielle et commercialisation à faible coût), et un intérêt croissant autour d'alternatives synthétiques biologiques sont autant d'arguments en faveur de la mise en place de la mini-voie à partir de ces terpénols.

II.Les enzymes

L'application de notre cascade bi-enzymatique nécessite des enzymes capables de convertir les alcools à courte chaîne, décrits précédemment, en leur dérivés mono- et diphosphates correspondant. Ainsi, deux types de biocatalyseurs sont recherchés : *i*) l'un permettant la conversion du DMAOH et de l'IOH en phosphate de diméthylallyle (DMAP) et d'isopentényle (IP) respectivement et *ii*) l'autre catalysant la phosphorylation de ces monophosphates en diphosphates d'intérêt (DMAPP et IPP).

a. Etat de l'art

i. CATALYSEURS POTENTIELS POUR LA CONVERSION DES ALCOOLS D'INTERET IOH ET DMAOH

La première étape de développement de la mini-voie consiste en l'identification d'un catalyseur de choix pour la conversion des alcools en C₅ en IP et DMAP. Notre intérêt s'est ainsi porté sur une classe d'enzymes particulières : les phosphatases acides non-spécifiques (NSAPs) dont la capacité de phosphorylation d'une grande variété de substrats et notamment d'alcools primaires a été décrite par Wever et collaborateurs. Elles utilisent pour cela, majoritairement, le pyrophosphate comme agent phosphorylant ^{275,288,289}.

Généralités

Les phosphatases acides non-spécifiques (EC 3.1.3.2) sont une famille de phosphatases bactériennes ubiquitaires et sécrétées catalysant l'hydrolyse d'une large gamme de monoesters de phosphate et dont l'activité catalytique est optimale dans une gamme de pH allant de l'acidité à la neutralité. D'un point de vue physiologique, elles sont impliquées dans la régulation métabolique, les mécanismes de signalisation et fournissent la cellule en éléments essentiels (sous-produits organiques et PO₄³⁻ noté Pi) en dégradant les monoesters de phosphate organiques tels que les nucléotides, l'acide phytique, les protéines et lipides phophorylés, ne pouvant traverser la membrane cytoplasmique.

Ce sont des enzymes constituées d'un ou plusieurs monomère(s) dont la masse moléculaire moyenne est comprise entre 25 et 30 kDa. Sur la base de leur séquence en acides aminés, cette famille est subdivisée en trois classes A, B et C^{290–292} (Tableau 4) dont les premières phosphatases identifiées de chaque classe sont respectivement PhoC_{Zm} de *Zymomonas mobilis*²⁹³, AphA_{Se} de *Salmonella enterica*²⁹⁴, et OlpA_{Cm} de *Chryseobacterium meningospeticum*²⁹⁵.

Classe	Motif(s) caractéristique(s)	Bactéries	Informations supplémentaires
Α	$KX_6RP-(X_{12-54})-PSGH-(X_{31-54})-$	Gram – de genres : Caulobacter,	
	SRX ₅ HX ₃ D (ref : 296)	Stenophomonas, Sphingomonas,	Monomérique/Oligomérique
		Xanthomonas, Pseudomonas,	
		Shigella	
В	PX4FDIDDTXVLFSSPXF (N-	Gram – de genres : <i>Aeromonas,</i>	Périplasmique
	terminal)	Aggrigatibacter, Citrobacter,	Métallo-protéine
	YGD(S/A)DXDX ₃ A	Enterobacter, Escherichia,	homotétramérique
	(C-terminal) (ref : 290)	Salmonella	
С	DXDET (N-terminal)	Gram – ou + de genres : Bacillus,	Associée à la membrane
	GDX3DF (C-terminal)	Clostridium, Erwinia, Lysobacter,	Lipoprotéine
	(ref: 290)	Pedobacter, Rhodobacter	

Tableau 4 : Caractéristiques des trois classes de phosphatases acides non-spécifiques.
L'activité catalytique a pour origine un résidu de type acide aspartique (Asp), retrouvé au sein des motifs conservés caractéristiques de chaque classe. Ils permettent la fixation du groupement phosphate agissant ainsi en tant que nucléophiles et la compensation des charges négatives des atomes d'oxygène du substrat. Ces résidus jouent également un rôle dans la stabilisation de l'état de transition et peuvent être impliqués au niveau de l'étape de protonation du groupement partant, en fin de mécanisme. L'hydrolyse suit un mécanisme en deux étapes qui, suite à la liaison du substrat (monoester de phosphate) à l'enzyme, débute par une attaque nucléophile conduisant à la libération de l'alcool premier produit de la réaction - et à l'obtention d'un intermédiaire phosphoryle-enzyme. Ce dernier subit une hydrolyse afin de régénérer l'enzyme sous sa forme libre et un groupement phosphate (PO4³⁻, Pi) (Figure 56)²⁹⁷⁻³⁰¹.



Cette NSAP est Mg²⁺ dépendante, ce dernier permet l'activation de la liaison P-0 facilitant ainsi la substitution nucléophile par la fonction carboxyle du résidu Asp₄₆. Figure 56 : Mécanisme catalytique proposé pour la NSAP de Salmonella enterica (AphAse), adapté de Calderone et al., 2006 et Makde et al., 2007.

• Une double activité

Dans les années 1950, Axelrod et Appleyard émettent l'hypothèse que des phosphatases d'extraits de jus d'orange ou prostatiques sont également dotées d'une capacité inverse à savoir le transfert d'un groupement phosphate d'un donneur vers un accepteur^{302,303}. En 1958, cette activité phosphotransférase est en effet décrite par Morton comme intrinsèque aux phosphatases²⁷⁴.

A partir de ces observations, le groupe d'Asano s'est démarqué par une étude pionnière décrivant la phosphorylation régiosélective de nucléosides catalysée par des NSAPs. Le pyrophosphate (PPi) est alors utilisé comme agent phosphorylant permettant – par exemple - à l'enzyme recombinante PhoC_{Mm} de *Morganella morganii* de convertir l'inosine en son dérivé phosphorylé en position 5' (Figure 57)²⁷³.



Figure 57 : Phosphorylation de l'inosine par la phosphatase acide non-spécifique PhoC (*M. morganii*).

Le pyrophosphate est un composé synthétisé à faible coût à partir de phosphate et dont l'utilisation présente l'avantage majeur d'éviter le recours à un système de recyclage, comme c'est le cas généralement pour les enzymes ATP-dépendantes.

Par la suite, les travaux de Wever et collaborateurs ont mis en évidence la capacité des phosphatases de *Salmonella enterica* ser. *typhimurium* LT2 (PhoN_{Se}) et plus particulièrement de *Shigella flexneri* (PhoN_{Sf}) à transférer un groupement phosphate du pyrophosphate à une large gamme de substrats tels que l'inosine mais également des hexoses, des pentoses ou des alcools simples (fonction alcool primaire de polyols préférentiellement, alcools cycliques et aromatiques, alcools primaires à chaîne carbonée branchée)²⁷⁵.

Parmi cette grande diversité de substrats, un résultat a particulièrement retenu notre attention puisque concernant la conversion du 3-methyl-1-butanol **(1)**, dérivé hydrogéné du DMAOH et de l'IOH, par PhoN_{Sf} en son dérivé monophosphate **(2)** (Figure 58).



Figure 58 : Mise en évidence de la capacité de phosphorylation de la NSAP de *Shigella flexneri* d'un dérivé du DMAOH et de l'IOH.

D'un point de vue mécanistique, la transphosphorylation débute par la liaison de l'agent phosphorylant (PPi) à l'enzyme (site actif) conduisant à la formation de l'intermédiaire clé phosphoryle-enzyme (E-P). L'étape suivante repose sur une compétition entre l'eau (réaction d'hydrolyse) et l'alcool substrat (transphosphorylation) (Figure 59). L'activité phosphotransférase de ces enzymes est de ce fait fortement liée aux concentrations en alcool, en PPi mais également à la constante d'affinité (K_m) de l'intermédiaire phosphoryle-enzyme pour l'alcool du fait des équilibres qu'impliquent la voie de phosphorylation. A noter que la concentration en PPi ne doit pas atteindre une valeur basse critique en cours de réaction sous peine de favoriser l'hydrolyse de l'ester de phosphate formé^{298,304}.



Figure 59 : Compétition entre hydrolyse et transphosphorylation au sein du site actif de PhoN_{Se} (d'après Faber *et al.*, 2016).

Ainsi, inspirés par le résultat présenté avec la phosphatase de *Shigella flexneri* nous avons ciblé cette famille d'enzymes comme source de biocatalyseurs pour la première étape de la mini-voie des terpènes, en vue d'assurer la conversion du DMAOH et de l'IOH en leur monophosphate correspondant.

ii. CATALYSEURS ENVISAGES POUR LA CONVERSION DES MONOPHOSPHATES EN IPP ET DMAPP

L'identification d'un catalyseur pour la deuxième étape de notre cascade s'est avérée simplifiée par l'existence d'une enzyme décrite pour la conversion de l'IP en IPP, l'isopentényl phosphate kinase (IPK).

Généralités

Les IPKs (EC 2.7.4.26) sont l'une des classes d'enzymes appartenant à la superfamille des AAKs (amino acid kinases). Les membres de cette superfamille nécessitent pour leur activité catalytique de l'ATP et des cations divalents préférentiellement de type Mg^{2+ 305} et peuvent être subdivisés selon deux catégories, en fonction du type de groupement transféré. Ainsi, sont classées séparément les enzymes transférant un groupement phosphoryle sur une fonction phosphate ou phosphonate (IPK, fosfomycine resistant kinase FomA, uridine monophosphate kinase UMPK) de celles catalysant la phosphorylation d'une fonction carbamate ou carboxylate (carbamate kinase, N-acétyl glutamate kinase NAGK, aspartokinase).

Présentes naturellement dans de nombreux organismes vivants, elles sont particulièrement retrouvées au sein du cytosol des archées. En effet, ces microorganismes présentent une voie de biosynthèse des isoprénoïdes alternative à la voie du mévalonate (Figure 50), dans le sens où les deux dernières enzymes impliquées dans cette voie ne sont pas retrouvées dans leur génome. Ainsi, les étapes successives de phosphorylation du phosphomévalonate (MVAP) et de décarboxylation du diphosphomévalonate (MVAPP) attribuées à la voie du mévalonate classique sont absentes.

93

Comme l'indique la Figure 50 *via* les flèches grises pleines, les étapes sont inversées principalement chez les archées puisque le MVAP est, dans un premier temps, décarboxylé par une enzyme de type MVAP décarboxylase (MPD) puis phosphorylé par une isopentényl phosphate kinase ATP-dépendante (IPK) décrite comme catalysant la conversion de l'IP en IPP^{58,60,104,106,109}.

L'alternative métabolique a été mise en évidence dans les travaux de Grochowski et collaborateurs¹⁰⁶, caractérisant l'IPK de *Methanocaldococcus jannaschii* (IPK_{Mj}). Par la suite, le groupe de Poulter a également confirmé l'activité isopentényl phosphate kinase de deux archées de *Methanothermobacter thermautotrophicus* (IPK_{Mt}) et de *Thermoplasma acidophilum* (IPK_{Ta}). Décrites comme promiscuitaires, ces IPKs acceptent préférentiellement l'IP (substrat naturel) mais sont également capables de convertir différents monophosphates à chaîne courte (C₄ et C₅) dont le diméthylallyl phosphate (DMAP)²⁷⁶.

Données structurales et mécanisme catalytique

L'élucidation des structures des IPK_{MJ}³⁰⁶, IPK_{Mt} et IPK_{Ta}³⁰⁵ a permis de mieux appréhender le mécanisme de phosphorylation développé par cette famille d'enzymes. Ce sont des enzymes dimériques dont les monomères constitutifs sont repliés en un domaine N-terminal et C-terminal structurellement distincts. La structure dimérique est maintenue, *via* un réseau de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes, et stabilisée grâce à des interactions électrostatiques. Bien que toutes les AAKs et, de ce fait, toutes les IPKs adoptent la même structure quaternaire (sous forme de dimères), chaque dimère est unique et caractérisé par l'orientation des deux monomères l'un avec l'autre³⁰⁷. Le domaine N-terminal est impliqué dans la fixation de l'IP/IPP, tandis que le domaine C-terminal permet la coordination du cation divalent Mg²⁺ et la fixation de l'agent phosphorylant ATP. Ces domaines sont constitués d'hélices α et de feuillets β dont l'association conduit à un repliement général sous la forme d'un « sandwich » $\alpha\beta\alpha$ ouvert, mis en évidence pour la première lors de l'étude de la carbamate kinase d'*E. faecalis*³⁰⁸. Les travaux de Mablango et collaborateurs sur les IPKs de *Methanothermobacter thermautotrophicus* (IPK_{Mt}) et *Thermoplasma acidophilum* (IPK_{Ta}) ont permis l'obtention d'une structure cristalline notamment de l'IPK_{Ta} (Figure 60) en présence d'IP et d'ATP (ID PDB : 3LKK), d'IPP et d'ADP (ID PDB : 3LL5) révélant pour la première fois l'aspect moléculaire de la fixation de l'IP au sein d'une kinase³⁰⁵. La spécificité des IPKs envers l'IP – substrat amphiphile – est intrinsèquement liée à la nature des acides aminés constituant la poche catalytique. Cette dernière se distingue ainsi de celles des autres AAKs du fait de la présence de résidus permettant d'établir des liaisons hydrogène et des interactions électrostatiques avec la partie polaire du substrat (groupement phosphate) et des interactions hydrophobes avec la chaîne aliphatique (partie apolaire).



Figure 60 : Structure cristalline déterminée par diffraction des rayons X de l'IPK dimérique de *Thermoplasma acidophilum* en présence d'ATP et d'IP. *Resolution: 2.00 Å R-value free: 0.231 / R-value work: 0.176 / R-value observed: 0.179*

Ainsi, ils proposent un mécanisme centré sur des résidus particuliers : l'histidine₅₀ (His₅₀), le triangle catalytique constitué par les résidus lysine_{5/14/205} (Lys₅, Lys₁₄, Lys₂₀₅) et l'aspartate en position 144 qui sont des résidus conservés au sein des IPKs.

> • Le résidu His₅₀ du domaine N-terminal permet la fixation du substrat IP au sein du site actif de l'enzyme *via* une liaison hydrogène avec un atome d'oxygène du phosphate terminal (P_{α}) de l'IP. Cette interaction permet de positionner l'ester de monophosphate pour l'attaque nucléophile sur le phosphate terminal (P_{γ}) de l'ATP. Les résidus glycine en position 45 et

aspartate en position 144 du domaine N-terminal participent également à la liaison de l'IP au sein du site actif. La liaison hydrogène avec l'aspartate se fait par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. L'IPP est quant à lui lié au résidus His₅₀ par une liaison hydrogène au niveau d'un des trois atomes d'oxygène du groupement phosphate terminal (P_β), les résidus Gly₄₅ et Gly₈ (appartenant à deux boucles distinctes riches en glycine) interagissent par une liaison hydrogène avec l'IPP au niveau de l'oxygène pontant entre les phosphates α et β , et une seconde liaison hydrogène avec l'un des trois oxygènes du groupement phosphate terminal. Le résidu Asp₁₄₄ joue le rôle de base.

 Le résidu Lys₁₄ du domaine N-terminal entre en jeu dans le positionnement de l'ATP via un réseau de liaisons hydrogène avec les oxygènes non pontant des phosphates α et γ et également de l'oxygène pontant entre les phosphates β et γ de l'ATP.

Ces deux résidus sont impliqués dans l'orientation du donneur (ATP) et de l'accepteur de phosphate (IP), ainsi que dans la stabilisation de l'état de transition.

- L'ATP est également imbriquée dans un réseau de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes et électrostatiques grâce à la présence des résidus Ile₂₀₂, Asp₁₆₄, Asp₁₄₄ et Lys₅.
- Enfin, du fait de leur charge positive et de leur position proche des composés phosphorylés, les résidus Asp₁₄₄, Lys₅ et Lys₂₀₅, mais également le cation divalent Mg²⁺ participent à la stabilisation des charges négatives de l'état de transition.

Le groupe de Poulter propose ainsi que la phosphorylation par ces enzymes soit associée à ces résidus caractéristiques³⁰⁵. Du fait de la superposition des sites de fixation du substrat et du cofacteur au sein des IPKs de *M. thermautotrophicus* et *T. acidophilum* avec ceux des *N*-acétyl-L-glutamate kinases (NAGKs), un mécanisme catalytique de type associatif est envisagé pour ces isopentényl phosphate kinases selon le modèle présenté dans la Figure 61. En effet, les NAGKs sont également des AAKs pour lesquelles un mécanisme associatif de transfert de groupement phosphate a déjà été décrit³⁰⁹.



Figure 61 : Mécanisme de phosphorylation de l'IPK_{Ta} proposé par Mablango et collaborateurs, 2010.

La position de l'ion Mg²⁺ est déduite de la superposition de la structure de l'IPKT avec celle de la fosfomycine kinase (FomA) du fait de leurs similarités structurales.

Une approche par modélisation moléculaire basée sur les méthodes hybrides de simulation QM/MM (quantum mechanics/molecular mechanics) a été conduite par McClory et collaborateurs sur l'isopentényl phosphate kinase de *T. acidophilum*³¹⁰. Par cette approche, le mécanisme proposé ci-contre est affiné et la position ainsi que le motif de coordination du cation divalent Mg²⁺ sont confirmés. En effet, trois molécules d'eau viennent compléter la sphère de coordination de l'ion, le plaçant dans une géométrie octaédrique. De plus, le résidu thréonine en position 163, conservé au sein de la famille des AAKs, s'avère en réalité être impliqué dans la fixation de l'ATP en établissant une liaison hydrogène avec l'oxygène porté par le phosphate β de ce dernier et une molécule d'eau. La partie flexible du cofacteur est alors stabilisée facilitant ainsi le transfert du groupement phosphate.

Dellas et collaborateurs³⁰⁶ complètent leur analyse structurale de l'IPK de *M. jannaschi* par une étude de mutagénèse dirigée sur le résidu central histidine en position 60 correspondant à l'histidine 50 évoquée dans le cadre du mécanisme catalytique de l'IPK_{Ta}. Ainsi, ils réalisent les mutations H60A, H60N et H60Q dont les deux dernières impliquent une substitution par un isostère de l'azote protoné N ϵ_1 et N ϵ_2 de l'histidine respectivement comme schématisé dans la Figure 62.



Figure 62 : Relations structurales entre les chaînes latérales des acides aminés glutamine, histidine et asparagine.

Les atomes sont représentés par des sphères dont la couleur est spécifique de l'atome qu'elle représente : azote en bleu, oxygène en rouge, carbone en noir.

La détection d'une activité kinase pour chacun de ces mutants est conduite à 25°C couplée à la réaction catalysée par la pyruvate kinase/lactate deshydrogénase. Seule la substitution de l'histidine par l'asparagine conduit à l'observation d'une activité kinase à partir de l'isopentényl phosphate. Cependant, les paramètres cinétiques apparents de ce mutant diffèrent de ceux caractérisant l'enzyme sauvage à savoir une diminution de l'affinité vis-à-vis du cofacteur ATP et du substrat IP, de la constante catalytique conduisant, de ce fait, à une efficacité catalytique 340 fois plus faible (Tableau 5).

Tableau 5 : Paramètres cinétiques de l'IPK de *M. jannaschii* sauvage et du mutant H60Qdéterminés à 25°C par Dellas et collaborateurs, 2010.

Crustàme átradiá	Paramètres cinétiques apparents						
Systeme etudie	$K_{m,IP}(\mu M)$	$K_{m,ATP}(\mu M)$	$k_{cat}(s^{-1})$	$k_{cat}/K_{m,IP}(s^{-1} \mu M^{-1})$			
IPK _{MJ} SAUVAGE	4,30 ± 0,58	198,2 ± 32,7	1,46 ± 0,03	0,34			
ІРК _{МЈ} –Н60Q	34,5 ± 7,2	559,3 ± 116,9	0,040 ± 0,002	0,001			

Ces données confirment le rôle essentiel du résidu histidine conservé au sein des IPKs et notamment l'importance de la liaison hydrogène établit par ce résidu avec l'IP, par l'intermédiaire de l'azote protoné Nɛ₂. De plus, la structure plus rigide de la chaîne latérale de l'histidine en comparaison de la flexibilité qu'apporte la substitution par la glutamine semble favoriser la fixation de l'IP et de ce fait l'affinité de l'enzyme pour ce substrat.

Enfin, le groupe de McClory évalue l'effet de mutations ponctuelles au sein de l'IPK de *T. acidophilum* sur les résidus essentiels à l'activité kinase par dynamique moléculaire³¹⁰. Les mutations d'intérêt simulées concernent les résidus Lys14, Gly8, Thr163 chacun substitué par une alanine. La mutation K14A induit la rupture des liaisons hydrogène établies par l'histidine catalytique avec le substrat et le cofacteur, altérant ainsi la disponibilité de l'histidine responsable de la fixation de l'IP et de l'ATP. Un rôle structural permettant le maintien de l'architecture du site catalytique est alors suggéré pour cette lysine. Un changement de conformation de l'histidine 50 est également observé lors de la substitution de la glycine en position 8 par une alanine dont la rigidité et l'encombrement stérique sont supérieurs. Ces modifications sont à l'origine du décalage de l'histidine vers l'extérieur de la poche catalytique en défaveur d'une activité enzymatique. En effet, la proximité de l'histidine avec le site de fixation de l'IP et de l'ATP est primordiale pour l'activité kinase puisqu'elle est à l'origine de la faisabilité du transfert de groupement phosphate. Enfin, la mutation T163A est également responsable de l'exclusion du résidu histidine du site actif et de la rupture de la liaison hydrogène établie avec l'ATP corroborant ainsi le rôle de la thréonine 163 dans la stabilisation du cofacteur.

La mini-voie des terpènes peut alors être envisagée comme la succession de deux étapes catalysées *i*) pour la première par une enzyme de type PhoN pour la conversion des alcools en C₅ en IP et DMAP et *ii*) par une IPK permettant l'obtention des précurseurs universels IPP et DMAPP. L'idée développée dans le cadre de l'ANR ReSeT, en collaboration avec Véronique de Berardinis (CEA/génoscope/UMR Génomique Métabolique), était d'identifier dans la biodiversité les enzymes les plus efficaces pour réaliser ces étapes.

Basée sur des séquences génomiques cibles d'IPK et de NASPs décrites dans la littérature et dont l'activité a été éprouvée, une analyse bioinformatique des génomes issus de la biodiversité, en vue d'établir une collection d'IPKs et de NSAPs d'origine procaryotique, a été réalisée par l'équipe du Laboratoire de Clonage et de Criblage des Activités de Bioconversions (LCAB) du Génoscope d'Evry. Des représentants de ces deux familles ont été sélectionnées lors des analyses, et les gènes correspondants ont été clonés dans *E. coli*. A partir de ces collections, un criblage d'activité à haut débit a été conduit afin d'identifier les meilleurs candidats pour l'application *in vitro* de la mini-voie, en prenant en compte la nécessite d'associer deux catalyseurs fonctionnant dans une gamme de pH et de température compatibles et utilisant le même agent phosphorylant. Dans le cadre de ce projet et compte-tenu des familles sélectionnées (IPKs et NSAPs), le criblage a pour but d'identifier une ou plusieurs NSAPs et IPKs capables de catalyser respectivement la conversion des terpénols en C₅ en leurs dérivés monophosphates et la phosphorylation des monophosphates en diphosphates correspondant (Schéma de la méthodologie suivie pour le criblage disponible en Annexe N°2).

b. Criblage à haut débit pour l'identification d'IPKs et de NSAPs compatibles

La recherche de catalyseurs de types IPK et NSAP est menée selon une approche basée sur l'homologie entre des séquences de référence et l'ensemble de séquences issues de la banque de données UniProtKB³¹¹. Dans le cadre plus particulier de ce projet, n'ont été ciblés que les catalyseurs issus d'organismes procaryotes. Deux ensembles de références distincts ont été préalablement constitués à partir de NSAPs et d'IPKs séquencées, décrites dans la littérature et dont l'activité de transphosphorylation et kinase respectivement a été mise en évidence. L'ensemble des NSAPs de référence était composé des séquences des deux phosphatases acides de classe A précédemment introduites (Chapitre IA.II.a.i) : PhoN_{Se} de *Salmonella enterica* ser. *Typhimurium*^{275,312} et PhoN_{Sf} de *Shigella flexneri*²⁷⁵. Concernant les isopentényl phosphate kinases, l'analyse de la biodiversité a été conduite sur la base des séquences de 4 enzymes : IPK_{Ta} de *Thermoplasma acidophilum* (Chapitre IA.II.a.ii) à laquelle sont ajoutées trois autres IPKs décrites lors de la mise en évidence d'une alternative à la voie du mévalonate (Figure 50) au sein de différents organismes, IPK_{Mj} de *Methanocaldococcus jannaschii*¹⁰⁶, IPK_{Mt} de *Methanothermobacter thermototrophicus*³¹³ et IPK_{Hv} *Haloferax volcanii*¹⁰⁷.

Une fois les ensembles construits, le programme « BLAST^{*} » (Basic Local Alignement Search Tool) avec l'option BL2 (alignement autorisant les «gap ») et la matrice de score BLOSUM62⁺³¹⁴ a été utilisé pour l'alignement et la comparaison des séquences des enzymes de l'ensemble de référence, correspondant à la totalité des séquences de la banque de données sélectionnée (UniProtKB). Seuls les alignements permettant l'obtention de plus de 30 % d'identités pour un recouvrement d'au moins 80 % de la longueur de la plus courte des deux séquences sont retenus. Afin de réaliser un criblage à haut débit par la suite, avec le minimum de protéines, un nombre de candidats nécessaires et suffisants mais représentatifs de la diversité de séquences est sélectionné. Ce choix se fait sur la base de l'hypothèse que des enzymes qui se ressemblent beaucoup en terme de séquences protéiques (ici plus de 80 % d'identité de séquences) ont la même activité. Un clustering des séquences est donc réalisé (méthode par « single linkage clustering ») sur l'ensemble des protéines rapatriées d'UniprotKB grâce aux enzymes de référence. Enfin, un représentant de chaque « cluster » est sélectionné sur la base de l'existence d'une souche bactérienne porteuse du gène correspondant, au sein de la collection génomique du Génoscope (plus de 1200 souches procaryotes) ou de la disponibilité commerciale de cette souche. Ainsi, 41 NSAPs et 93 IPKs couvrant une large diversité génomique ont été sélectionnées en vue d'un clonage et d'un criblage d'activité à haut débit^{315,316}.

^{*} Programme accessible en ligne : https://blast.ncbi.nlm.nih.gov

[†] Les matrices de score de type BLOSUM pour Blocks substitution matrix ont été développées par S. Henikoff et J.G. Henikoff en 1992. La construction de ce type de matrice de substitution repose sur la probabilité de correspondances et de mésappariements au sein d'une région conservée ou bloc de séquences de protéines apparentées. Ainsi, la marice BLOSUM62 est une matrice pour laquelle les valeurs de scores ont été obtenues à partir d'un jeu de séquences présentant une similarité inférieure ou égale à 62%.

Par la suite, les gènes des enzymes cibles ont été amplifiés par PCR à partir d'amorces d'ADN préalablement conçues et synthétisées afin d'introduire une séquence hexahistidine (purification éventuelle par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel) et permettre également l'insertion de ce dernier au sein du vecteur d'expression pET22b par la technique LIC (ligation independent cloning)*. Les plasmides recombinants ont ensuite été intégrés dans la souche d'*E. coli* BL21(DE3), mises en culture pour l'expression des protéines correspondantes.

L'objectif de ce travail était d'identifier, dans chacune des collections (collections de NSAPs et d'IPKs), des enzymes aux propriétés les plus proches de l'autre collection pour permettre le couplage. Cela consiste donc en l'identification parmi la famille des NSAPs, fonctionnant normalement à des valeurs de pH autour de 4, d'enzymes avec une bonne activité à pH égal à 7,5, pH d'activité des IPKs. A l'inverse, les IPKs décrites sont souvent issues d'organismes thermophiles caractérisées de ce fait par des températures optimales d'activité très élevées. L'objectif était de ce fait d'identifier des IPKs fonctionnant à température ambiante, comme c'est le cas des NSAPs.

Le criblage à haut débit d'activité de transphosphorylation (NSAPs) et d'activité isopentényl phosphate kinase a été exécuté sur les extraits cellulaires issus de la lyse des souches recombinantes. Ce criblage est conduit en microplaques de 96 puits, à température ambiante, à un pH égal à 6 et en présence d'ATP. L'analyse d'activité de phosphorylation a été réalisée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) permettant de quantifier les mono- et di-phosphates obtenus par conversion des alcools en C₅ ou des monophosphates correspondant. L'ATP est recyclée *in situ* grâce à l'ajout de la pyruvate kinase couplée à l'utilisation du phosphoénolpyruvate (PEP) comme donneur de groupement phosphate. Il est à noter que l'expression de ces enzymes est difficile dans *E. coli* et que la quantité de protéines, dans les lysats testés, était faible. Concernant les NSAPs, elles ont été également caractérisées par leur activité phosphatase à température ambiante, en plaques 96 puits. Cette mesure d'activité sur le 4-nitrophénylphosphate a été réalisée à partir d'enzymes purifiées et permet d'évaluer leur activité dans le sens physiologique (activité phosphatase).

^{*} La LIC est une méthode de clonage basée sur l'activité exonucléase $3' \rightarrow 5'$ de la T4 DNA polymerase permettant la création d'extrémités cohésives simple brin complémentaires entre l'insert et le vecteur et offrant donc la possibilité de s'affranchir d'une étape de ligation et d'enzymes de restriction.

L'activité phosphatase a été déterminée par spectrométrie UV puisque l'hydrolyse du 4nitrophénylphosphate conduit, en conditions alcalines, à l'obtention de la forme énolate correspondante présentant un maximum d'absorption à 402 nm (ϵ = 12900 M⁻¹, pH 7,5) (Section expérimentale : 1.2.3 Activité phosphatase).

Ainsi, 29 parmi les 41 NSAPs testées, présentent à la fois une activité phosphatase et une activité kinase sur l'IOH et le DMAOH (Figure 64) et 40 IPKs s'avèrent être actives sur l'IP et le DMAP dans les conditions choisies (Figure 63). A partir de ces criblages conduits au Génoscope, les IPKs de *Methanococcus vannielii* (IPK_{Mv}) et de *Methanolobus tindarius* (IPK_{Mt}) ainsi que la phosphatase acide de *Xanthomonas translucens* (PhoN_{Xt}) se distinguent par une production d'IPP/DMAPP et d'IP/DMAP respectivement parmi les plus importantes. Considérant dans un premier temps la mise en place de la mini-voie des terpènes *in vitro*, les catalyseurs évoqués ci-dessus doivent également être obtenus en quantité suffisante et sous forme active afin d'initier la mise en place de la mini-voie. Par la suite, l'IPK_{Mv} a été sélectionnée du fait d'une expression au sein *d'E. coli* supérieure à celle de l'IPK_{Mt}.

[A]	[B]	[C]	[D]			[E]		
A3DLV9	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Staphylothermus marinus					
A5UN67	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanobrevibacter smithii					
A6UQT1	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanococcus vannielii					
A6UVT7	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanococcus aeolicus					
B519J3	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Aciduliprofundum boonei					
B5IF05	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Aciduliprofundum boonei					
D5VQK8	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanocaldococcus infernus	0				
D7E6M7	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanohalobium evestigatum					
F7XLN9	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanosalsum zhilinae		(
Q2NG07	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanosphaera stadtmanae					
Q6L1S0	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Picrophilus torridus					
Q6LWR2	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanococcus maripaludis					
Q7LY02	Uncharacterized protein		Sulfolobus solfataricus					
A0A090I163	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanobacterium formicicum	j.				
A2SR98	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanocorpusculum labreanum					
A9AXV9	Aspartate/glutamate/uridylate kinase		Herpetosiphon aurantiacus					
A9WE94	Aspartate/glutamate/uridylate kinase		Chloroflexus aurantiacus					
B8GEF5	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanosphaerula palustris					
C5A1G2	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Thermococcus gammatolerans					
D1YZ38	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanocella paludicola	<u> </u>				
D2RER6	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Archaeoglobus profundus					
D3RYH0	Aspartate/glutamate/uridylate kinase		Ferroglobus placidus					
D9PV83	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanothermobacter marburgensis					
E1RIU6	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanoplanus petrolearius					
E8N5A7	Putative uncharacterized protein		Anaerolinea thermophila					
F2KQQ9	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Archaeoglobus veneficus					
H1YW91	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanoplanus limicola					
K2RT47	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanobacterium formicicum					
LOLOE3	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanomethylovorans hollandica					
Q12TH9	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanococcoides burtonii					
Q2FTP0	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanospirillum hungatei JF-1					
Q46CL3	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanosarcina barkeri					
Q8PW38	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanosarcina mazei					
W9DTD1	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanolobus tindarius					
A3CWI9	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanoculleus marisnigri					
A4WHC8	Isopentenyl phosphate kinase (EC 2.7.4)		Pyrobaculum arsenaticum					
D9Q1X2	Isopentenyl phosphate kinase		Acidilobus saccharovorans					
JORYF2	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Methanofollis liminatans					
Q5V5P5	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Haloarcula marismortui					
C7NZE3	Isopentenyl phosphate kinase (IPK) (EC 2.7.4.26)		Halomicrobium mukohataei	0				
				0	100	200	300	40

Seules les IPKs ayant conduit à l'obtention d'IPP/DMAPP détecté par LC-MS sont listées. [A] Identifiant UniprotKB de chacune des 40 IPKs actives. [B] Nomenclature basée sur l'annotation de la base de données UniprotKB. [C] Répartition phylogénétique des IPKs criblées : bactéries en jaune (Terrabacteria), archées (en rose : Euryarchaeota, en rouge Crenarcheota). [D] Organisme cible. [E] Quantification par LC-MS de l'IPP/DMAPP produit lors du criblage d'activité (μ M/L). Les encadrés noirs mettent en évidence les IPKs les plus actives.

(A)	(B)	(C)	(D)
060507	Mathylopopous consulatus	07PEK0(42/52)	
Q605Q7	Neuryococcus capsulaius	$Q^{7} BEK9(42/53)$	
QOAKF1	Desulfotalea psychrophila	$Q^{7} BEK9(43/01)$	
QUARINI	Desullotalea psychiophila Desulomonas fluoroscons	Q7BEK9(45/01)	
	Cupriovidus posstor	Q7BEK9(43/03)	
QUK100	Cupriavidus taiwapansis	Q7BEK9(43/00)	
A0A084LLI6	Yanthomonas campestris ny musacearum	Q7BEK9(40/03)	
08P342	Xanthomonas campestris pv. musacearum	Q7BEK9(47/58)	
105769	Xanthomonas translucens ny translucens	Q7BEK9(43/30)	
	Xanthomonas translucens	07BEK9(43/59)	
A0A077BI U5	Stenotrophomonas maltophilia	07BEK9(44/57)	
D5VPD4	Caulobacter segnis	07BEK9(41/56)	
D5VHV1	Caulobacter segnis	07BEK9(31/50)	
E8V1S9	Terrialohus saanensis	P26976(30/42)	
C4XPK0	Desulfovibrio magneticus	P26976(32/48)	
A8HUG7	Azorhizohium caulinodans	O7BEK9(30/46)	
K7S9P4	Gluconobacter oxydans	P26976(37/52)	
O5FOI1	Gluconobacter oxydans	O7BEK9(33/49)	
B1M195	Methylobacterium radiotolerans	P26976(35/52)	
C7CBS1	Methylobacterium extorquens	07BEK9(35/55)	
D5VNX8	Caulobacter segnis	P26976(32/50)	
O9AB73	Caulobacter crescentus	O7BEK9(35/51)	
J4J8N9	Achromobacter piechaudii	07BEK9(45/59)	
U9J1P3	Pseudomonas aeruginosa	07BEK9(46/58)	
K8WWS8	Providencia burhodogranariea	O7BEK9(42/57)	
A5FJG0	Flavobacterium iohnsoniae	P26976(38/58)	
Q6XW11	Shigella flexneri	O7BEK9(50/71)	
LOME45	Serratia marcescens	Õ7BEK9(53/72)	
X7FTV7	Serratia marcescens	Q7BEK9(50/65)	
P26976	Salmonella typhimurium	Set-ref	
E0NPG7	Prevotella marshii	Q7BEK9(47/66)	
D9RTT4	Prevotella melaninogenica	P26976(41/60)	
H2J260	Rahnella aquatilis	Q7BEK9(83/90)	
G8W7J6	Klebsiella oxytoca	Q7BEK9(83/90)	
K8WME8	Providencia burhodogranariea	Q7BEK9(78/87)	
Q7BEK9	Shigella flexneri	Set-ref	
Q99Q99	Shigella flexneri	Q7BEK9(100/10	0)
L7ZF59	Serratia marcescens	Q7BEK9(64/76)	
C7M7Z2	Capnocytophaga ochracea	Q7BEK9(59/73)	
D9RVD0	Prevotella melaninogenica	Q7BEK9(58/73)	
F8X0W7	Dysgonomonas mossii	Q7BEK9(58/71)	
B6VVC7	Bacteroides dorei	Q7BEK9(59/72)	
E6SSR5	Bacteroides helcogenes	Q7BEK9(58/71)	

Figure 64 : Criblage de NSAPs d'origine procaryotique actives sur l'IOH et le DMAOH.

Les identifiants Uniprot ainsi que le nom des organismes correspondants sont indiqués dans les colonnes A et B. Est indiqué aussi le meilleur hit de l'ensemble de référénce (Q7BEK9 de Shigella flexneri ou P26976 de Salmonella typhimurium) et le % d'identité et de similarité entre parenthèse (colonne C). Les carrés illustrent les activités phosphatases (oui ou non, pas de valeur) et les barres la détection de l'IP ou DMAP. Xanthomonas translucens (PhoN_{xt}) sélectionnée est notée en rouge et encadrée. Figure réalisée par Jean-Louis Petit (Génoscope).

c. Les enzymes sélectionnées

i. LA PHOSPHATASE ACIDE DE Xanthomonas translucens

La phosphatase acide non spécifique PhoN_{Xt} (ID Uniprot : A0A1C3TIA7) a été identifiée et séquencée à partir de la souche *Xanthomonas translucens pv. translucens* DSM 18974, dont le séquençage complet du génome a été réalisé par Jaenicke et collaborateurs³¹⁷. Cette bactérie phytopathogène est responsable de la glume noire de certaines céréales dont l'orge, le seigle ou le blé. Il est possible de prédire et d'estimer, à partir de la séquence protéique annotée et plus particulièrement de la proportion et des propriétés physico-chimiques de chaque acide aminé, les caractéristiques de cette enzyme et plus généralement de toute macromolécule biologique. Ces paramètres intrinsèques à la protéine d'intérêt peuvent être la masse moléculaire, le pH au point isoélectrique, la valeur absolue d'hydropathie moyenne et la solubilité, le temps de demi-vie, le coefficient d'extinction molaire ou encore l'appartenance à une famille de protéine par la présence de domaines spécifiques.

Pour collecter l'ensemble de ces informations relatives à PhoN_{Xt} différents outils en ligne ont été utilisés à partir de la séquence de la protéine native, longue de 291 acides aminés (Figure 65).

L'outil ProtParam d'ExPASy* permet de déterminer théoriquement que la PhoN_{Xt} présente un poids moléculaire de 30,442 kDa, un coefficient d'extinction molaire moyen égal à 28085 M⁻¹.cm⁻¹ et un pH isoélectrique[†] estimé à 8,97. La séquence contient 4,8 % d'acides aminés aromatiques (tryptophane : 4, tyrosine : 4, phénylalanine : 6) permettant d'utiliser l'absorbance à 280 nm pour estimer la concentration protéique après purification ainsi que 5 résidus cystéines (1,7 %). Le temps de demi-vie[‡] de cette protéine est prédit comme supérieur à 10 h, *in vivo* au sein d'*E. coli*. Enfin, le paramètre GRAVY (Grand average of hydropathy)[§] renseigne sur le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une protéine³¹⁸. Une valeur

^{*} ExPASy: expert protein analysis system. Il s'agit d'un portail de ressources bioinformatiques lancé en 2011 par l'Institut Suisse de Bioinformatique (ISB). L'un des outils disponibles est ProtParam permettant à partir de la séquence protéique d'estimer les paramètres caractéristiques de la protéine d'intérêt. Cet outil est disponible en ligne à l'adresse suivante : https://web.expasy.org/protparam/.

[†] Le pH isoélectrique est le pH pour lequel la protéine présente une charge nette égale à zéro, on parle alors de zwitterion. Il est noté pH_i. Il est recommandé de se placer *in vitro* à un pH à +/- 1 de la valeur du pHi afin de limiter les risques de précipitation.

[‡] Ce temps de demi-vie *in vivo* correspond au temps prédit pour que 50 % de la quantité de protéine synthétisée soit dégradée au sein de l'organisme ciblé. La détermination de ce paramètre est basée sur la nature de l'acide aminé en position amino-terminale, décrit comme déterminant pour la stabilité *in vivo* des protéines.

[§] Cette valeur est déduite de la somme des valeurs d'hydropathie de chaque acide aminé divisée par le nombre total de résidus de la séquence protéique considérée. Les valeurs d'hydropathie sont basées sur la nature de la chaîne latérale et donc des propriétés hydrophiles et hydrophobes de ces dernières. Une échelle d'hydropathie est alors conçue dont les valeurs extrêmes sont associées à l'isoleucine (4,5, hydrophobe) et l'arginine (-4,5, hydrophile).

positive est attribuée à un caractère hydrophobe, à l'inverse une valeur négative caractérise une protéine hydrophile. Considérant que la valeur attribuée à la phosphatase de *X. translucens* est proche de 0 (-0,074), nous la considérons comme neutre.

L'université d'Oklahoma propose en ligne un outil de prédiction de la solubilité de protéine recombinante au sein d'*E. coli**. Basé sur le pH_i, la masse moléculaire et la séquence protéique, PhoN_{xt} est considérée comme soluble, permettant ainsi d'envisager sa production au sein de la bactérie modèle.

Par analyse de cette séquence, Jeanicke et collaborateurs ont identifié un peptide signal de 28 résidus au niveau de l'extrémité amino-terminale de la protéine, à l'origine de sa sécrétion et de sa localisation périplasmique. De plus, la présence du motif de séquence conservé KX₆RP-(X₁₂₋₅₄)-PSGH-(X₃₁₋₅₄)-SRX₅HX₃D permet d'établir l'appartenance de cette NSAP à la classe A (Figure 65). Les enzymes constitutives de cette classe sont notamment caractérisées par une large spécificité de substrats, ne nécessitent pas la présence de cations divalents pour leur activité et sont résistantes à l'EDTA, au fluorure, au tartrate et au Pi³¹⁸.

10	20	30	40	50
MSAFPALRLR	PAALVLLTAA	LAACSTLATH	TLPASTSTST	STPATAAAAA
60	70	80	90	100
GKASGYLAPA	AIPASLQLLP	PPPAEGSPGQ	ALDLAVNREA	LAMRGSARWQ
110	120	130	140	150
QATRDADLSF	PAGAGHFACA	LGVAIDAQRT	PHLYALLERS	RIDASAATKA
160	170	180	190	200
A <mark>K</mark> NHYRRP RP	FMLNQQPSCT	PQDEEQLRHN	GSY <mark>PSGH</mark> SAI	GWTWALILSE
210	220	230	240	250
IAPDRADALI	LRGRSFSE <mark>SR</mark>	LVCNVHWHSD	VLAGRLMGAA	TVARLHADPT
260	270	280	290	
FRADLDAARG	EIARAOAOGA	MPGEDCAAOA	OTLOVRPASA	L

Figure 65 : Séquence protéique de PhoN_{Xt}.

La séquence signal en position amino-terminale est mise en évidence en gris. La présence des motifs de séquence conservés au sein de la classe A décrits par Stukey et Carman (rectangles rose, bleu, vert) corrobore l'appartenance de PhoN_{Xt} à cette classe de phosphatases acides non spécifiques. Les résidus d'acides aminés représentés en gras sont les résidus invariants au sein des motifs conservés.

^{*} Cet outil est disponible en ligne à l'adresse suivante : https://biotech.ou.edu/.

Comme évoqué précédemment dans la partie intitulée « Catalyseurs potentiels pour la conversion des alcools d'intérêt IOH et DMAOH » (Chapitre IA.II.a.i), les enzymes de cette classe ont été isolées de différents organismes tels que *Zymomonas mobilis*²⁹³ (ID Uniprot : P14924), *Shigella flexneri*³¹⁹ (ID Uniprot : Q7BEK9), *Salmonella enterica* ser. *typhimurium*³²⁰ (ID Uniprot : P26976), *Morganella morganii*³¹⁸ (ID Uniprot : P28581) mais également *d'Escherichia blattae*³²¹ (ID Uniprot : Q9S1A6). D'un point de vue structural et mécanistique, il est possible d'appréhender les propriétés de PhoN_{xt} à partir des données disponibles sur les NSAPs de la même classe. D'une part, les séquences protéiques de quelques acides phosphatases non spécifiques de classe A ont été alignées grâce à l'outil bio-informatique BLASTP et la matrice de score BLOSUM62* (Figure 66).

X. <u>translucens</u>	28	YLAPAAIPASLQLLPPPPAEGSPGQALDLAVNREALAMRGSARWQQATRDADLSFPAGAG	87
M. <u>morganii</u>	16	YLKNEQAIDSLKLLPPPPEVGSIQFLNDQAMYEKGRMLRNTERGKQAQADADLAAGGVAT	75
S. <u>flexneri</u>	16	YLTNDNAIDSLALLPPPPQIGSIAFLNDQAMYEKGRLLRNTERGKLAAEDANLSSGGVAN	75
E. <u>blattae</u>	18	YLKNSEAINSLALLPPPPAVGSIAFLNDQAMYEQGRLLRNTERGKLAAEDANLSSGGVAN	77
Z. <u>mobilis</u>	18	LLYLAPPPTSGSPLQAHDDQTFNSTRQLKGSTRWALATQDADLHLASVLK	67
S. <u>enterica</u>	18	YLPPPPGNDDPAYRYDKEAYFKGYAIKGSPRWKQAAEDADVSVENIAR	65
X. <u>translucens</u>	88	HFACALGVAIDAQRTPHLYALLERSRIDA-SAATKAAKNHYRRPRPFMLNQQPSCTPQDE	146
M. <u>morganii</u>	76	AFSGAFGYPITEKDSPELYKLLTNMIEDAGDLATRSAKEHYMRIRPFAFYGTETCNTKDQ	135
S. flexneri	76	VFSAAFGSPITAKDSPELHKLLTNMIEDAGDLATRSAKEYYMRIRPFAFYGVSTCNTKEQ	135
E. blattae	78	AFSGAFGSPITEKDAPALHKLLTNMIEDAGDLATRSAKDHYMRIRPFAFYGVSTCNTEQ	137
Z. <u>mobilis</u>	68	DYACAAGMNLDIAQLPHLANLIKRALRTE-YDDIGRAKNNWNRKRPFVDTDQPICTEKDR	126
S. <u>enterica</u>	66	IFSPVVGAKINPKDTPETWNMLKNLLTMGGYYATASAKKYYMRTRPFVLFNHSTCRPEDE	125
X. <u>translucens</u>	147	EQLRHNGSYPSGHSAIGWTWALILSEIAPDRADALILRGRSFSESRLVCVVHWHSDVLAG	206
M. <u>morganii</u>	136	KKLSTNGSYPSGHTSIGWATALVLAEVNPANQDAILERGYQLGQSRVICGYHWQSDVDAA	195
S. <u>flexneri</u>	136	DTLSRNGSYPSGHTSIGWATALVLSEINPARQDTILKRGYELGDSRVICGYHWQSDVDAA	195
E. <u>blattae</u>	138	DKLSKNGSYPSGHTSIGWATALVLAEINPQRQNEILKRGYELGQSRVICGYHWQSDVDAA	197
Z. <u>mobilis</u>	127	EGLGKQGSYPSGHTTIGWSVALILAELIPDHAANILQRGQIFGTSRIVCGAHWFSDVQAG	186
S. <u>enterica</u>	126	NTLRKNGSYPSGHTAYGTLLALVLSEARPERAQELARRGWEFGQSRVICGAHWQSDVDAG	185
X. <u>translucens</u>	207	RLMGAATVARLHADPTFRADLDAARGEIAR	
M. <u>morganii</u>	196	RIVGSAAVATLHSDPAFQAQLAKAKQEFAQ	
S. <u>flexneri</u>	196	RIVGSAIVATLHSNPVFQAQLQKAKDEFANNQKK	
E. blattae	198	RVVGSAVVATLHTNPAFQQQLQKAKAEFAQHQKK	
Z. <u>mobilis</u>	187	YIMASGEIAALHGDADFRRDMELARKELEKARTSAHTPDD	
S. <u>enterica</u>	186	RYVGAVEFARLQTIPAFQKSLAKVREEL	

Figure 66 : Alignements des séquences protéiques de 6 phosphatases acides non spécifiques bactériennes appartenant à la classe A, dont PhoN_{xt}.

La séquence signal associée à chaque protéine n'est pas représentée. Les résidus conservés au sein des motifs signatures de l'appartenance à la classe A (fond gris) et décrits comme impliqués dans le mécanisme catalytique de ces enzymes ont été mis en évidence (coloration en fonction du motif et police en gras). Les encadrés oranges mettent en évidence les résidus cystéines conservés pouvant être impliqués dans la formation d'un pont disulfure.

^{*} Pour cet alignement, les paramètres par défaut proposés par l'outil en ligne sont restés inchangés et les séquences signal de chacune des NSAPs ont été ôtées.

Les séquences sélectionnées présentent 41 à 43 % d'identité sur 74 à 80 % de longueur de séquence (E-value comprises entre 6 e⁻⁶⁰ et 5 e⁻⁵⁴). Malgré une faible similarité de séquence, les trois motifs caractéristiques de l'appartenance à la classe A sont retrouvés, au sein desquels plusieurs résidus d'acides aminés sont conservés et ce indépendamment du micro-organisme dont sont isolées les enzymes étudiées (Figure 66). Les résidus concernés sont la lysine et l'arginine (en violet) du motif 1, la serine, la glycine et l'histidine du motif 2 (en bleu) et l'arginine, l'histidine et l'acide aspartique du motif 3. La stricte conservation de ces derniers suggère leur implication dans le mécanisme catalytique de cette sous famille d'enzymes²⁹⁶.

D'autre part, la structure cristalline de la phosphatase de classe A d'*E. blattae* (nommée par la suite PhoN_{Eb}) complète les informations relatives à cette classe de phosphatases et plus particulièrement à PhoN_{Xt}. La résolution de la structure à 1,9 Å par Ichikawa et collaborateurs en 2000 a été faite en présence d'un ion sulfate marquant le site de liaison au phosphate, au niveau du site actif. PhoN_{Eb} est une protéine de 231 acides aminés adoptant une structure hexamèrique dont chaque monomère constitutif a une masse moléculaire de 25,13 kDa et n'est constitué que d'hélices α (13 au total). Au sein de chaque monomère, un pont disulfure engage les résidus cystéines en positions 132 et 186 (Figure 67).



Figure 67 : Structure cristalline d'un monomère de PhoN_{Eb} déterminée par diffraction aux rayons X avec une résolution de 1,9 Å.

Les 13 hélices α constituent un monomère présentant un seul pont disulfure, formé entre les résidus cystéines en position 132 et 186 (résidus encadrés en orange sur la figure 66).

Cette structure quaternaire résulte en réalité de l'association de trois dimères. Chacun des dimères est stabilisé *via* un réseau de liaisons hydrogène impliquant des résidus de chaque monomère et des molécules d'eau. Le trimère est quant à lui formé par des interactions hydrophobes, hydrophiles et électrostatiques (Figure 68).



Figure 68 : Structure cristalline déterminée par diffraction des rayons X de la phosphatase acide non spécifique hexamèrique d'*E. blattae* (extraite de la PDB et modifiée).

(A) Représentation en 3D permettant la visualisation des dimères constitutifs.

(B) Mise en évidence de l'organisation en trimère.

Resolution: 1,9 Å R-value free: 0,257 / R-value work: 0,216 / R-value observed: 0,215

La confrontation des données structurales disponibles³²¹ aux données résultant de l'analyse de la séquence protéique d'enzymes de la même classe permet l'identification de la nature et du rôle des résidus du site actif²⁹⁶. Ainsi, les résidus lysine et arginine du motif 1 (**K**X6**R**P) semblent être impliqués dans l'orientation du groupement phosphate du substrat au sein du site actif. En effet, ils permettent de positionner le substrat proche du résidus histidine du motif 3 (SRX5**H**X3D) responsable de l'attaque nucléophile et de la formation de l'intermédiaire phosphoryle enzyme. Les résidus invariants serine et glycine du motif 2 (**PSGH**) participent au positionnement du substrat au sein du site actif *via* des liaisons hydrogène. Le résidu histidine joue également le rôle de donneur de proton lors de la dernière étape de transfert de groupement phosphate. Selon Neuwald, l'acide aspartique du motif 3 (SRX5**H**X3D) maintient la chaîne latérale de l'histidine de ce même motif dans une conformation favorable à la formation de l'intermédiaire phosphoryle



Figure 69 : Site actif de la phosphatase acide d'*E. blattae.* L'ion sulfate marque le site de liaison au phosphate. Les atomes de soufre, d'oxygène et d'azote sont colorés respectivement en jaune, rouge et bleu. Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés gris.

Le mécanisme réactionnel associé aux phosphatases acides non spécifiques de la classe A et de ce fait à la phosphatase PhoN_{xt} – catalyseur d'intérêt pour le développement de la mini-voie des terpènes – est schématisé dans la figure suivante et fait intervenir les différents résidus décrits précédemment (Figure 70).



Figure 70 : Mécanisme catalysé par les phosphatases acides non spécifiques de la classe A, proposé par Neuwald en 1997.

ii. L'ISOPENTENYL PHOSPHATE KINASE DE *Methanococcus vannielii*

L'isopentényl phosphate kinase IPK_{Mv} (ID Uniprot : A6UQT1) a été identifiée et séquencée à partir de la souche *Methanococcus vannielii* DSM 1224 grâce au séquençage complet du génome de *M. vannielii* conduit par Copeland et collaborateurs^{*}. *M. vannielii* est une archée méthanogène[†] et mésophile[‡] isolée à partir d'une vasière[§] de la baie de San Francisco. D'une façon identique à celle décrite précédemment (Chapitre IA.II.c.i), nous avons pu estimer les caractéristiques de l'IPK_{Mv} native à partir de la séquence protéique annotée sur Uniprot, composée de 257 résidus d'acides aminés (Figure 71).

					Caractéristiques	
10	20	30	40	50	masse moleculaire (kDa)	29,180
MFAIL <mark>KLGGS</mark>	ILCD <mark>K</mark> NVPYS	INWENLQNIG	IEIKEALEYY	RKEEINLKLI	pHi	8,31
60	70	80	90	100	· proportion d'acides amines aromatiques	Trn - 3
IVHG <mark>GG</mark> EFG <mark>H</mark>	PVAKKYLKNG	KFVDMGKGYW	EIQKAMRKFN	NIVIDELQNF	proportion a actacs an incs aron augues	
110	120	130	140	150		Tyr: 7 soit 8,6 %
EIPVVSIQPS	SEITEDKDLN	LREDINALEK	MLEKDLIPVI 100	HGDIVIDERE		Phe : 12
NNEKTESCOH	T DHT SKKTN		DCAMDARERA T20	TEKIDSSNIN	Proportion de cystéines	2 soit 0,8 %
210	220	230	240	250	Temps de demi-vie in vivo (<i>E. coli</i>)	>10 heures
KVLESLKPSN	KEDVTG <mark>G</mark> HL	KVMECYNLGV	KTIIFNGSKK	RNIYNALLKN	Profil d'hydropathie (GRAVY)	-0,263 (caractère
VKGTSIN						hydrophile)
					Prédiction de solubilité (<i>E. coli</i>)	Protéine soluble

Figure 71 : Séquence protéique de l'IPK_{Mv} **et caractéristiques prédites à partir de cette séquence** Selon l'annotation proposée, différents résidus seraient impliqués dans la liaison au substrat, dans la fixation de l'ATP et dans la stabilisation de l'état de transition (respectivement colorés en jaune, rose et vert).

^{*} Le génome séquencé est référencé sous l'ID NCBI NC_009634 et a été conduit par Copeland et collaborateurs en 2007.

[†] Les organismes méthanogènes sont des anaérobies stricts dont le métabolisme cellulaire vise à produire du méthane à partir essentiellement de dihydrogène et de dioxyde de carbone.

[‡] Un organisme est décrit comme mésophile lorsque son développement est optimal à une température entre 20 et 40 °C.

[§] Définition d'après le dictionnaire Larousse (1/11/2020) : Étendue côtière ou sous-marine couverte de vase.

Sur la base de cette séquence, un alignement a été réalisé afin d'associer à ce type d'enzyme un mécanisme catalytique putatif et d'acquérir des informations structurales pour cette sous famille d'enzymes, relatives notamment à la poche catalytique. L'alignement a été conduit une nouvelle fois avec l'outil BLASTP, appliquant la matrice de score BLOSUM62 sur les séquences d'IPKs procaryotes caractérisées et dont la structure cristalline a été résolue (Figure 72). Ces IPKs ont été évoquées au début de ce chapitre précédent (Chapitre IA.II.a.ii) et correspondent à celles de *Methanocaldococcus jannaschii* (IPK_{Mj}, ID Uniprot : Q60352), *Methanothermobacter thermautotrophicus* (IPK_{Mt}, ID Uniprot : Q26153) et *Thermoplasma acidophilum* (IPK_{Ta}, ID Uniprot : Q9HLX1).

M. vannĺelii M. jannaschii M. thermautotrophicus T. acidophilum	1 1 3 3	MFAILKLGGSILCDKNVPY-SINWENLQNIGIEIKEALEYYRKEEINLKLIIVHGGGSFGH MLTILKLGGSILSDKNVPY-SIKWDNLERIAMEIKNALDYYKNQNKEIKLILVHGGGAFGH ILKLGGSVITRKDSEEPAIDRDNLERIASEIGNASPSSLMIVHGAGSFGH ILKIGGSVITDKSAYR-TARTYAIRSI-VKVLSGIEDLVCVVHGGGSFGH	60 60 52 50
M. vannielii	61	PVAKKYLKNGKFVDMGKGYWEIQKAMRKFNNIVIDELQNFEIPVVS	106
M. jannaschii	61	PVAKKYLKIEDGKKIFINMEKGFWEIQRAMRRFNNIIIDTLQSYDIPAVS	110
M. thermautotrophicus	53	PFAGEYRIGSEIENEEDLRRRRFGFALTQNWVKKLNSHVCDALLAEGIPAVS	104
T. acidophilum	51	IKAMEFGLPGPKNPRSSIGYSIVHRDMENLDLMVIDAMIEMGMRPIS	97
M. vannielii M. jannaschii M. thermautotrophicus T. acidophilum	107 111 105 98	IQPSSFITF-DKDLNLRFDTNAIEKMLEKDLIPVIHGDIVID-ERENNFKIFSGDHALPHL IQPSSFVVFGDKLIFDTSAIKEMLKRNLVPVIHGDIVID-DK-NGYRIISGDDIVPYL MQPSAFIRA-HAGRISHADISLIRSYLEEGMVPVVYGDVVLDSDRRLKFSVISGDQLINHF V-PISALRY-DGRFDYTPLIRYIDAGFVPVSYGDVYIK-D-EHSYGIYSGDDIMADM	165 168 166 150
M. vannielii	166	SKKLNPDLSLHASDVDGVWDTKFKVIEKIDSSNINKVLESLKPSNKEDVTGG	217
M. jannaschii	169	ANELKADLILYATDVDGVL-IDNKPIKRIDKNNIYKILNYLSGSNSIDVTGG	217
M. thermautotrophicus	167	SLRLMPERVILGTDVDGVYTRNPKKHPDARLLDVIGSLDDLESLDGTLNTDVTGG	219
T. acidophilum	151	AELLKPDVAVFLTDVDGIY	
M. vannielii M. jannaschii M. thermautotrophicus T. acidophilum	218 218 220	MHLKVMECYNLGVKTIIFNGSKKRNIYNALL-KNVKGTSIN MKYKIDMIRKNKCRGFVFNGNKANNIYKALL-GEVEGTEID MVGKIRELLLLAEKGVESEIINAAVPGNIERALLGEEVRGTRIT	

Figure 72 : Alignement des séquences protéiques des IPKs de *M. jannaschii, M. thermautotrophicus* et *T. acidophilum* avec la séquence référence de l'IPK de *M. vannielii.*

L'identification de résidus particuliers pour les IPK_{Ta} , IPK_{Mj} et IPK_{Mt} grâce aux travaux de Poulter et Dellas sont mis en évidence via un code couleur, les résidus correspondant sont également colorés pour l'IPK de M. vannielii.

- en orange, les résidus de la poche hydrophobe accueillant la chaîne aliphatique du substrat IP,
- en vert, les résidus impliqués dans la fixation du substrat IP,
- en bleu, les résidus qui interagissent avec la partie polaire du substrat,
- en rose, les résidus impliqués dans la fixation de l'ATP,
- en violet, ceux décrit comme stabilisant l'état de transition.

Les résidus sur fond gris sont susceptibles de participer à la fixation de l'ATP au sein du site actif.

Les séquences sélectionnées présentent 29 à 57 % d'identité sur 70 à 100 % de longueur de séquence (E-value comprises entre 2 e⁻¹⁰⁰ et 2 e⁻²²) vis-à-vis de l'IPK_{Mv}. Ainsi, l'IPK de *M. vannielii* partage une similarité de séquence minimale (29 %, 70 % de recouvrement, E-value : 2e⁻²²) avec celle de *T. acidophilum* et maximale (57 %, 100 % de recouvrement, E-value : 2e⁻¹⁰⁰) lorsqu'elle est comparée à celle de *M. jannaschii*. Cette plus forte similarité peut être en partie justifiée d'un point de vue phylogénétique. En effet, l'ensemble de ces archées sont issues de l'embranchement des euryarchées mais seuls *Methanocaldococcus jannaschii* et *Methanococcus vannielii* ont en commun l'appartenance à une même classe, celle des *Methanococci*.

L'analyse de la littérature réalisée en début de ce chapitre a permis de proposer un mécanisme catalytique et les résidus d'acides aminés associés ainsi qu'une structure quaternaire généralement adoptée par les IPKs, en s'appuyant sur l'exemple de l'IPK de *T. acidophilum* uniquement. La structure cristalline de l'IPK_{Mv} n'ayant pas été élucidée à ce jour, le but est ici d'affiner cette première description et de proposer un modèle structural et catalytique pour l'IPK de *M. vannielii*. Pour cela, la confrontation des données relatives à chaque isopentényl phosphate kinase impliquée dans l'alignement ci-dessus est essentielle. Pour rappel, les isopentényl phosphate kinases appartiennent à la famille des AAKs, caractérisées par une structure quaternaire dimérique et sont ATP/Mg²⁺ dépendantes³⁰⁵. Le domaine N-terminal de chaque monomère est impliqué dans la liaison du groupement phosphate (nucléophile) de l'IP, le domaine C-terminal est quant à lui responsable de la coordination du cation divalent Mg²⁺ et de la fixation de l'ATP (agent phosphorylant) au sein du site actif.

Le Tableau 6 répertorie les caractéristiques issues de la résolution par diffraction aux rayons X des structures cristallines en présence d'IP ou de glycérol des IPK_{Mj} (ID PDB : 3K52, résolution à 2,7 Å)³⁰⁶, IPK_{Mt} (ID PDB : 3LL9, résolution à 2,148 Å) et IPK_{Ta} (ID PDB : 3LKK, résolution à 2,001 Å)^{276,305}.

	IPK _{Mj}	IРК _{Mt}	IPK _{Ta}		
Masse moléculaire (kDa)	29,472	29,084	27,050		
	(dimère : 58,944)	(dimère : 58,168)	(dimère : 58,36)		
Structure tertiaire	16 feuillets β	16 feuillets β	16 feuillets β		
	8 hélices α	8 hélices α	8 hélices α		
	1 hélice 310	Non renseigné	2 hélice 310		
	« Sandwich » α	βα dont les éléments	centraux sont :		
	3 hélices α / 8 feuillets β / 4 hélices α				

Tableau 6 : Principales caractéristiques structurales des IPKs procaryotes décrites,caractérisées et dont la structure cristalline a été résolue.

A partir de ces données et en s'appuyant sur l'alignement de séquences protéiques précédent, il est raisonnable de proposer que l'IPK de *M. vannielii* (29,180 kDa, dimère : 58,36 kDa) est une enzyme dimérique. Chaque monomère adopterait un repliement global similaire aux autres IPKs à savoir sous la forme d'un « sandwich » $\alpha\beta\alpha$ constitué par 16 feuillets β , 8 hélices α et potentiellement une ou plusieurs hélice(s) 3_{10}^* . De plus, la conservation de résidus particuliers entre les kinases dont les séquences ont été alignées permet d'attribuer à l'IPK_{Mv} d'intérêt le même mécanisme associatif catalytique que celui décrit pour l'IPK_{Ta} (Figure 61).

La première partie de ce chapitre introduit les éléments essentiels à la mise en place de la mini-voie des terpènes. Nous avons choisi de l'appliquer à la synthèse des diphosphates de diméthylallyle et d'isopentényle (DMAPP et IPP). Ces derniers sont les précurseurs de l'ensemble des terpènes et naturellement synthétisés via la voie du mévalonate ou la voie du méthylérythritol phosphate.

^{*} Les hélices 3₁₀ sont un type particulier d'hélices. Elles sont peu fréquemment retrouvées au sein des protéines car plus instables, du fait d'une géométrie plus contrainte que les hélices α . Elles sont caractérisées par un pas de 3 résidus par tour d'hélice et une liaison hydrogène entre l'oxygène du groupement carbonyle du résidus *i* et le proton amide du résidus *i+3*.

Une approche rétrosynthétique a permis d'imaginer l'obtention de ces précurseurs clés à partir d'IOH et de DMAOH, du fait principalement d'une forte similarité de structure induisant l'obtention des produits d'intérêt en seulement deux étapes successives de phosphorylation. La disponibilité de ces alcools en C₅ – conséquence d'une production industrielle à faible coût pouvant être biosourcée – couplée à l'intérêt croissant autour d'alternatives synthétiques biologiques sont autant d'arguments confirmant l'intérêt de ces terpénols comme substrats.

Par la suite, une analyse de la littérature a permis de cibler deux classes d'enzymes : i) les phosphatases acides non spécifiques (NSAPs) et ii) les isopentényl phosphate kinases (IPK) Mg^{2+}/ATP dépendantes. Les NSAPs sont des phosphatases également capables de convertir une grande variété de substrats et notamment des alcools primaires en monophosphates correspondants. Un résultat a ainsi particulièrement retenu notre attention décrivant la phosphorylation du dérivé hydrogéné du DMAOH et de l'IOH, par la phosphatase acide de Shigella flexneri (PhoN_{Sf}). L'identification d'un catalyseur pour la deuxième étape de notre cascade s'est avérée simplifiée par l'existence des IPKs naturellement impliquées dans la conversion de l'IP en IPP. La double phosphorylation in vitro du DMAOH et de l'IOH nécessite, de ce fait, deux enzymes capables de fonctionner dans les mêmes conditions de pH, de température, utilisant de préférence le même agent phosphorylant et dont l'expression respective chez E. coli est correcte.

Basées sur ces données, la stratégie d'identification des catalyseurs d'intérêt a reposé sur un criblage à haut débit d'IPKs et de NSAPs d'origines procaryotiques décrites et dont l'activité a été éprouvée. Ce criblage a permis de sélectionner la phosphatase acide de Xanthomonas translucens (PhoN_{Xt}) ainsi que l'IPK de Methanococcus vannielii (IPK_{Mv}) pour une application in vitro de la mini-voie.



B. MISE EN PLACE D'UNE PREUVE DE CONCEPT IN VITRO

Afin de démontrer la faisabilité de la mini-voie de biosynthèse artificielle des terpènes décrite précédemment, nous avons souhaité développer une cascade enzymatique la plus courte possible et conduisant à un composé terpénique valorisable. De ce fait, l'application de la mini-voie couplée à la prényl transférase FtmPT1 d'*Aspergillus fumigatus* permet l'obtention en trois étapes de la TB à partir de diméthylallyl alcool (DMAOH) et de la BF (synthétisée chimiquement) (Figure 73).



Figure 73 : Cascade enzymatique à trois étapes pour la synthèse de tryprostatine B comme preuve de concept.

La tryprostatine B est un métabolite secondaire fongique appartenant à la classe des alcaloïdes indoliques prénylés de type fumitrémorgine. Ces derniers sont des produits naturels hybrides composés de groupements aromatiques de deux acides aminés et d'une parte isoprénique et principalement isolés des souches de type *Aspergillus* et *Penicillium* ^{322,323}. De fait, la TB est un exemple de meroterpénoïde naturel. Ces alcaloïdes indoliques dérivés de dicétopipérazine attirent l'attention de la communauté scientifique au fil des années d'une part grâce à leur structure si particulière et d'autre part du fait de la diversité des activités biologiques qui leur sont associées : antimicrobienne^{324,325}, anticancéreuse³²⁶, anti-inflammatoire³²⁷ ou encore anti-oxydante et insecticide³²⁸. En 2011, Grundmann et Li décrivent et caractérisent la prényl transférase FtmPT1 d'*Aspergillus fumigatus*. Elle catalyse majoritairement la prénylation en position C₂ du noyau indole de la BF (dicétopipérazine résultant de la condensation de deux acides aminés L-proline et L-tryptophane) en présence de DMAPP^{175,180,329}.

Nous avons ainsi ciblé la synthèse de la TB du fait *i*) qu'elle ne nécessite l'incrémentation que d'une seule enzyme à la mini-voie présentée précédemment, *ii*) qu'elle présente une activité cytotoxique envers différentes lignées cellulaires cancéreuses, en inhibant la progression du cycle cellulaire au niveau de la phase $G_2/M^{180,277,330,331}$. Il est également intéressant de noter que la BF ne présente aucune cytotoxicité, suggérant ainsi que la présence d'un groupement isoprène induit une activité biologique³³² et enfin *iii*) la synthèse en trois étapes que nous proposons constitue une alternative intéressante aux synthèses chimiques actuelles³³³⁻³³⁵.

I. Synthèse de la tryprostatine B

a. La prényl transférase d'A. fumigatus

i. GENERALITES

La prényl transférase FtmPT1_{Af} (EC : 2.5.1.106, ID Uniprot : Q4WAW7) a été identifiée à partir de la souche *Aspergillus fumigatus*^{*} Af293 dont le génome a été séquencé par Nierman et collaborateurs³³⁶. Au sein de ce champignon, FtmPT1_{Af} catalyse la seconde étape de la biosynthèse des alcaloïdes de type fumitrémorgine^{175,186,337} (Figure 74).



Figure 74 : Biosynthèse de fumitrémorgines fongiques dont la seconde étape est catalysée par la prényl transférase FtmPT1 et permet la C-prénylation de la brévianamide F (adaptée de Steffan *et al.,* 2009).

^{*} *A. fumigatus* est un champignon présentant la particularité d'être à la fois un parasite primaire et opportuniste et un allergène majeur.

FtmPT1_{Af} appartient à la classe des prényl transférases aromatiques solubles de type DMATS¹²² et permet le transfert d'un groupement isoprénique à partir du donneur DMAPP vers l'accepteur BF, en position C₂ du noyau indole¹⁷⁵. Au niveau de sa séquence, elle est caractérisée par l'absence des motifs riches en acide aspartique conservé(s) au sein de la classe des prényl transférases¹²¹ et impliqué(s) dans la liaison du donneur de groupement prényle (DMAPP) *via* un cation divalent. De plus, *a contrario* de nombreuses prényl transférases^{121,198}, l'activité FtmPT1_{Af} n'est pas dépendante de la présence de cation divalent bien qu'une concentration en Mg²⁺ à 2-5 mM induit une légère hausse de l'activité prényl transférase¹⁷⁵.

D'une façon identique à celle décrite précédemment (Chapitre IA.II.c.i), nous avons pu estimer les caractéristiques de FtmPT1_{Af} à partir de la séquence protéique constituée par 464 résidus d'acides aminés (Tableau 7).

Caractéristiques	
masse moleculaire (kDa)	52,607
pH _i	6,33
proportion d'acides amines aromatiques	Trp : 7
	Tyr:22 > soit 12 %
	Phe : 27
Proportion de cystéines	5 soit 1,1 %
Temps de demi-vie in vivo (<i>E. coli</i>)	>10 heures
Profil d'hydropathie (GRAVY)	-0,334 (caractère hydrophile)
Prédiction de solubilité (E. coli)	Protéine peu soluble

Tableau 7 : Caractéristiques prédites à partir de la séquence en acides aminés de FtmPT1_{Af}.

ii. DONNEES STRUCTURALES

Les travaux de Jost et collaborateurs publiés en 2010¹⁸⁶ ont permis la résolution des structures cristallines de la prényl transférase d'*A. fumigatus* en présence de BF seule (ID PDB : 3024, résolue à 2,5 Å) et en présence de BF et d'un analogue du substrat isoprénique DMAPP (ID PDB : 302K, résolue à 2,4 Å).

Comme illustré sur la Figure 75, cette PTase adopte un repliement rare en tonneau α/β , consistant en un noyau central de 10 brins β anti-parallèles formant un feuillet cylindrique entouré par 10 hélices α , partiellement exposées au solvant. Ces structures secondaires s'enchaînent de telle sorte à ce que deux hélices α soient liées à deux brins β formant un motif $\alpha\alpha\beta\beta$, répété cinq fois. Des interactions hydrophobes stabilisent la structure dans sa globalité. La fixation des substrats et la catalyse ont lieu au sein du tonneau formé par les feuillets β centraux.



Figure 75 : Structures quaternaire et site actif de la prényl transférase d'A. fumigatus.

A) Structure cristalline 302K de FtmPT1 d'A. fumigatus résolue par diffraction aux rayons X à 2,4 Å, en présence de la brévianamide F et d'un analogue non hydrolysable du DMAPP, le diméthylallyl S-thiolodiphosphate (DMSPP) (extraite à partir de la PDB et retravaillée).

R-value free: 0,235 / R-value work: 0,205 / R-value observed: 0,207.

(B) Partie du site actif de FtmPT1 en présence des substrats BF (violet) et DMSPP (orange) (Extraite de la publication de Jost et al.,2010). Les atomes impliqués dans la réaction de prénylation au niveau du DMSPP (C_1) et de la BF (C_2 du noyau indole) sont représentés par des sphères dont l'opacité a été diminuée. Les liaisons hydrogène et interactions ioniques sont représentées en lignes pointillées.

Brièvement, la fixation de la BF au sein du site actif se fait par l'intermédiaire de résidus hydrophobes du fait de la nature aromatique de ce substrat. Les résidus impliqués sont de type tyrosine, leucine, méthionine et phénylalanine. Les résidus d'acides aminés Glu₁₀₂, Tyr205, Ser92, Trp182 et Met94 forment un réseau de liaisons hydrogène maintenant la BF au sein du site actif de FmPT1_{Af}. Le DMSPP (analogue non hydrolysable du DMAPP) est situé dans la partie haute du tonneau, proche du centre. Des résidus chargés positivement (Arg113, Lys294) permettent d'ancrer le DMSPP par le groupement phosphate terminal, également maintenu par des liaisons hydrogène avec les chaînes latérales des résidus Gln₃₈₀ et Tyr₄₄₆. Le second atome de phosphate est imbriqué dans un réseau de liaisons ionique et hydrogène, résultat de la présence des résidus Arg₁₁₃, Tyr₂₀₃ et Tyr₄₅₀. Enfin, quatre résidus tyrosines centraux (Tyr203, Tyr296, Tyr383 et Tyr450) forment via le groupement hydroxyle de leur chaîne latérale une barrière. Cette dernière divise le tonneau en deux parties distinctes, la partie basse correspondant à une poche hydrophobe dans laquelle la BF et l'extrémité allylique du DMSPP sont fixées et la partie haute accessible au solvant et contenant le groupement diphosphate du substrat allylique. Ce « bouclier » tyrosine est décrit comme essentiel pour la catalyse puisque protégeant le cation résultant du clivage de l'ester d'acide phosphorique suite à l'attaque nucléophile. Les résidus évoqués dans ce paragraphe sont mis en évidence sur la Figure 75(B).

iii.MECANISME REACTIONNEL

Jost et collaborateurs suggèrent que FtmPT1_{Af} catalyse une alkylation de Friedel-Crafts en 3 étapes (Figure 76) basée sur le mécanisme dissociatif décrit pour une autre prényl transférase d'*A. fumigatus* : FgaPT2^{161,188}.



Figure 76 : Mécanisme réactionnel de FtmPT1_{Af}, proposé en 2010 par Jost et collaborateurs. Le substrat aromatique partiellement représenté est la BF, le substrat allylique est le DMAPP.

En effet, ces deux enzymes fongiques solubles partagent une forte similarité de structure et particulièrement au niveau de leur site actif¹⁸⁶ et une indépendance catalytique vis-à-vis des cations divalents¹⁷⁵. Ainsi, l'hydrolyse de la liaison ester d'acide phosphorique initie la réaction et conduit à la formation d'un carbocation. Cette étape est facilitée par les charges positives des résidus impliqués dans la fixation du groupement pyrophosphate à l'enzyme (Arg₁₁₃, Lys₂₉₄). Le carbocation ainsi obtenu est stabilisé par des interactions π cation - cycle aromatique (de la BF d'une part et de la Tyr₃₈₂ d'autre part). L'attaque nucléophile du noyau indole (dont la réactivité peut être accrue par la liaison hydrogène établit entre l'azote N₁ indolique et le groupement carboxylate du résidus Glu₁₀₂) sur le carbocation constitue la deuxième étape mécanistique. Enfin, l'arrachement d'un proton par une base restaure l'aromaticité et conduit à la TB. Le résidu Glu₁₀₂ et l'azote du noyau indole de la BF sont pressentis pour jouer le rôle de base.

Cependant, les données structurales acquises ne permettent pas de justifier la régiospécificité de FtmPT1_{Af}. En effet, elle catalyse la prénylation de la BF au niveau de la position C₂ du noyau indole, le groupement prényle est alors lié par son carbone en position 1. Les auteurs suggèrent alors une rotation au sein du site actif du cation allylique plan ayant lieu entre les deux étapes limitantes de ce mécanisme (l'hydrolyse et la formation de la liaison C-C). De plus, il est intéressant de noter que l'indépendance de FtmPT1_{Af} vis à vis des cations divalents, intervenant normalement dans la fixation du substrat allylique, est due à la présence des résidus chargés positivement (Arg₁₁₃, Lys₂₉₄) qui neutralisent les charges négatives apportées par le groupement diphosphate.

b. La cascade enzymatique

Nous proposons, par la suite, une synthèse de la TB en trois étapes enzymatiques. Les deux premières correspondent à des phosphorylations successives à partir du DMAOH et catalysées par la PhoN_{Xt} puis par l'IPK_{Mv}. Enfin, la prényl transférase FtmPT1_{Af} conduit à la prénylation en position C₂ du noyau indole de la BF (Figure 73). Nous avons décrit au préalable les caractéristiques de chaque enzyme intervenant dans cette cascade, à savoir la dépendance en ions ATP et en Mg²⁺/ATP pour la NSAP et l'IPK, respectivement.

i. Obtention des catalyseurs d'interet

Dans un premier temps, nous avons choisi de développer la preuve de concept de la mini-voie, appliquée à la synthèse de la TB, in vitro. Ainsi, les catalyseurs impliqués doivent être produits, purifiés et dosés. Afin de faciliter leur purification, les enzymes sont produites au sein du microorganisme modèle E. coli sous forme de protéine taguée, présentant une étiquette hexa-histidine. La présence de cette dernière permet une purification par chromatographie d'affinité sur colonne de Ni-NTA et une élution par gradient d'imidazole. L'étiquette, qui est ajoutée en position amino-terminale pour l'IPK_{Mv} et carboxy-terminale pour la PhoN_{xt} et FtmPT1_{Af}, ne modifie que très peu les caractéristiques prédites précédemment à partir de la séquence protéique des différentes enzymes natives. Une étape sur colonne de dessalage permet également l'obtention des catalyseurs dans le tampon sélectionné pour les essais in vitro. Enfin, la concentration en protéines totales est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm et prise en compte des paramètres intrinsèques à chaque enzyme : le coefficient d'extinction molaire ε et la masse moléculaire. L'absorbance à 280 nm est principalement liée à la présence d'acides aminés aromatiques dans une séquence protéique, propriété que partagent de nombreuses protéines. Elle permet d'apprécier la quantité de protéines en solution et ne peut représenter la quantité réelle de catalyseur purifié que si le profil de purification, notamment par analyses en gel SDS-PAGE, n'indique que peu ou pas de contaminants en solution. Ce dosage n'est donc pas protéine spécifique mais est utilisé initialement comme un outil visant à estimer une quantité utilisée de catalyseur.

Par la suite, la détermination d'une activité est conduite pour chaque enzyme issue de chaque purification par,

i) le test colorimétrique à partir du *para*-nitrophénylphosphate (pNPP) pour PhoN_{Xt} Activité phosphatase de PhoN_{Xt} : 1,32 ± 0,36 U/mg^{*}

ii) le test d'activité kinase couplé au recyclage de l'ATP *in situ via* le couple enzymatique PK/LDH pour l'IPK_{Mv},

Activité kinase de l'IPK_{Mv} mesurée sur l'IP : 8,52 ± 1,16 U/mg

^{*} Ecart-type basé sur quatre mesures d'activité dans le cas PhoN_{Xt} et IPK_{Mv} et sur vingt mesures dans le cas du DMAOH (substrat utilisé comme référence pour la détermination de l'activité kinase de ThiM_{Ec} à l'issue de chaque purification).

iii) le test au vert de malachite pour FtmPT1_{Af}. La valeur d'activité est alors utilisée pour normaliser la quantité de catalyseur nécessaire, permettant une reproductibilité des expériences en biocatalyse.

Activité prényl transférase de $FtmPT1_{Af}$ lorsque les substrats sont le DMAPP et la brévianamide F : 1,55 ± 0,23 U/mg

Les constructions génétiques, les conditions de production, de purification et de quantification de l'activité des différents catalyseurs sont détaillées dans la partie expérimentale (voir 1.1.3, 1.1.4 et 1.2.3).

ii. Preuve de concept par synthese de la tryprostatine B

La cascade « preuve de concept » a été développée selon une approche séquentielle *i.e.* à partir de l'étape de prénylation catalysée par FtmPT1_{Af}, à laquelle sont ensuite incrémentées dans un premier temps l'IPK_{Mv} puis PhoN_{xt}. A chaque étape, les substrats utilisés sont synthétisés chimiquement (à l'exception du DMAOH, alcool commercial). L'idée est de minimiser le temps de réaction permettant de conduire à une conversion totale de la BF en son dérivé C₂-prénylé, la TB. Pour y parvenir, nous avons choisi d'étudier pour chaque catalyseur la quantité nécessaire pour remplir cet objectif. Les bioconversions sont réalisées à 37°C en bain sec, sous une agitation de 1000 rpm (tubes Eppendorf[®]). Une fois la quantité de catalyseur optimale déterminée sur un volume réactionnel de 1 mL, une montée en échelle est réalisée en ballon. Cette dernière consiste en un volume réactionnel de 35 mL, agité à 400 rpm (agitateur magnétique couplé à un barreau aimanté) et thermostaté à 37°C par un bain d'huile. Ce changement d'échelle permet de valider la production d'une centaine de milligrammes de TB et une caractérisation par RMN. En effet, après extraction du mélange réactionnel en fin de réaction à l'acétate d'éthyle puis purification sur colonne de silice (éluant : acétate d'éthyle/méthanol, 90/10), une analyse RMN, un rendement en produit isolé ainsi qu'une masse finale obtenue complètent l'étude.
Toutes les synthèses sont réalisées « one-pot », les substrats et catalyseurs étant additionnées en début de réaction simultanément. Les conditions expérimentales relatives aux bioconversions en tubes Eppendorf[®] et en ballon sont abordées dans la partie expérimentale (1.2.4) et les détails des synthèses chimiques des substrats utilisés pour cette partie du projet sont présentés en (1.2.2) de la même partie. Pour chaque bioconversion, un suivi cinétique est réalisé *via* des prélèvements en cours de réaction auxquels sont ajoutés un étalon interne (indole, solution mère à 5 mM en acétonitrile) permettant de quantifier la consommation de BF à 280 nm, par HPLC en phase inverse^{*}.

L'étape de prénylation

Dans un premier temps, nous avons criblé les meilleures conditions d'utilisation de FtmPT1_{Af} pour l'étape de prénylation de la BF en présence de DMAPP (synthétisé chimiquement) (Figure 77). Les travaux de Grundmann et Li¹⁷⁵ ont permis de sélectionner le tampon Tris-HCl 50 mM, supplémenté par 5 mM de MgCl₂ dont le pH est ajusté à 7,5 comme tampon de réaction[†]. Par la suite, nous avons fixé les concentrations des substrats à 10 mM et 20 mM en BF et DMAPP respectivement. Le DMAPP est en solution dans le tampon de réaction et la BF solubilisée dans du DMSO (10 % final).



Figure 77 : Schéma de synthèse de la TB catalysée par FtmPT1_{Af} et utilisant le DMAPP comme agent de prénylation.

^{*} Colonne de type Nucleodur C18-Gravity-SB thermostatée à 50°C. L'élution est faite par un mélange 60/40 eau/méthanol, à un débit de 0,3 mL/min. Une courbe d'étalonnage BF/Indole permet de quantifier la consommation de BF en cours de réaction

[†] Le choix du tampon de réaction basé sur la littérature est en accord avec les différents catalyseurs que l'on souhaite purifier et intégrer en catalyse enzymatique du fait d'un pH distant d'au moins une unité du pH_i de chaque catalyseur.

La quantité de FtmPT1_{Af} purifiée est la variable testée, les réponses étudiées sont le temps de réaction et la conversion de BF en TB. Pour ce faire, cinq expériences sont conduites simultanément en tubes Eppendorf[®], différant les unes des autres, par la quantité d'enzyme purifiée utilisée égale à 0, 22, 55, 110 et 220 µg. Pour chacune de ces conditions, une cinétique de transformation de la BF est proposée sur la Figure 78 et résulte d'une analyse par HPLC de prélèvements au cours du temps auxquels est additionné l'étalon interne indole.

Dans l'intervalle de temps fixée de 24 h, seules deux conditions permettent d'atteindre une transformation totale de la BF. Ainsi, 110 µg d'enzyme purifiée permettent de compléter la réaction en 3 h et l'utilisation de 220 µg divise par trois ce temps de réaction. Parmi ces deux conditions, nous avons choisi celle permettant d'atteindre une conversion totale en un minimum de temps *i.e.* en 1 h, pour 220 µg de catalyseur purifié ajoutés au mélange réactionnel (Figure 78). De plus, en absence d'enzyme aucune conversion ou dégradation de la BF n'est observée (données non représentées sur la figure suivante), confirmant ainsi la stabilité du substrat dans les conditions testées et une disparition intrinsèque liée à l'enzyme prényl transférase.



Figure 78 : Cinétiques de transformation de la brévianamide F en fonction de la quantité d'enzyme purifiée FtmPT1_{Af} utilisée.

L'analyse par HPLC en phase inverse ainsi que celle par CCM (réalisée en parallèle) révèlent la formation d'un produit de réaction unique, moins polaire que la BF, UV actif et dont la quantité détectée par HPLC évolue de façon inversement proportionnelle à celle de la BF (Figure 79). Par conséquent, l'ensemble de ces premières observations corrobore l'hypothèse de la synthèse de TB.



Figure 79 : Chromatogramme illustrant le profil obtenu par HPLC à 280 nm en cours de réaction, révélant la présence de BF, d'indole (étalon interne) et de TB. *Ces derniers sont élués par un mélange 60/40 H*₂*O/MeOH, délivré à 0,3 mL/min.*

A partir de ce résultat, une montée en échelle est conduite sur 100 mg (10 mM) de BF solubilisés au préalable dans 3,5 mL de DMSO (concentration finale : 10%), tous les autres composants du mélange réactionnel ayant été ajustés proportionnellement. De la même façon que précédemment, un suivi quantitatif par HPLC *via* des prélèvements à 0/10/20/30/45 et 60 min a permis d'établir la cinétique de transformation de la BF. Cette dernière est similaire à celle observée en tube Eppendorf[®] et reproduit le résultat observé, à savoir une réaction totale en 1 h (Figure 80).



Figure 80 : Cinétiques de transformation de la brévianamide F conduites à partir de 220 µg d'enzyme purifiée en tube Eppendorf[®] (courbe verte) puis en ballon après montée en échelle (courbe rose).

La réaction, totale en 1h, est arrêtée et après extraction et purification, le seul produit de réaction est caractérisé par RMN validant ainsi l'obtention de TB avec un rendement en produit isolé de 92 %, correspondant à 114 mg de produit purifié.

Nous avons ainsi validé *in vitro* la synthèse de TB en 1 h, catalysée par 220 μ g de prényl transférase fongique d'*A. fumigatus*, à partir de BF (10 mM) et de DMAPP (20 mM) issus de la synthèse chimique. L'idée est par la suite d'incrémenter la cascade d'une étape correspondant à la phosphorylation du DMAP catalysée par l'IPK_{Mv}.

• La cascade à deux étapes

Disposant des catalyseurs IPK_{Mv} et FtmPT1_{Af} purifiés, la synthèse de TB est engagée selon le procédé décrit précédemment, cette fois, à partir de DMAP (synthétisé chimiquement) (20 mM) et de BF (10 mM). L'ajout de l'isopentényl phosphate kinase nécessite l'introduction d'ATP (agent de phosphorylation) à une concentration de 20 mM (1 équivalent) (Figure 81).



Figure 81 : Conversion de la brévianamide F en tryprostatine B, faisant intervenir l'isopentenyl phosphate kinase de *M. vannielii* et la prényl transférase d'*A. fumigatus*.

La concentration en DMSO est maintenue constante à 10 % finale comme la quantité de FtmPT1_{Af} fixée précédemment à 220 µg. Des expériences préliminaires permettant de cribler la quantité d'IPK_{Mv} nécessaire à la conversion totale de la BF dans ces conditions sont conduites en tubes Eppendorf[®]. Les quantités testées sont 0/10/20/50 et 100 µg d'enzyme purifiée. Pour chacune d'entre elles, une cinétique est obtenue par HPLC *via* des prélèvements à 0/10/20/30/45 et 60 min de réaction, immédiatement supplémentés d'indole (Figure 82 **A**)). Ainsi, la conversion complète de la BF en son dérivé C₂-prénylé à partir du DMAP est également observée à 1 h de réaction, et ce malgré l'ajout d'une étape supplémentaire. Considérant que nous souhaitons une conversion totale sur un intervalle de temps minimal, nous avons choisi de fixer la quantité d'IPK à 50 µg du fait que cette condition permet de convertir 90 % de la BF en 30 min avec une quantité d'enzyme raisonnable. En effet, l'ajout de 20 et 100 µg donnent à lieu à 85 et 88 % de conversion respectivement, 50 µg d'enzyme représente donc une quantité intermédiaire conduisant à un taux de conversion plus élevé.

A l'identique du procédé suivi pour l'étape de prénylation, la synthèse préparative a également été engagée dans ces conditions à partir de 100 mg de BF (10 mM) en solution dans du DMSO (10 % finale). Les quantités de catalyseurs (IPK_{Mv} et FtmPT1_{Af}) sont ajustées proportionnellement et la cinétique associée à cette montée en échelle est présentée dans la Figure 82 **B**). Afin de permettre une comparaison, sur la même figure est représentée la cinétique sur 60 min observée en Eppendorf[®] pour 50 µg d'IPK_{Mv}, conditions appliquées pour la synthèse préparative. Le profil des deux cinétiques est comparable dans cet intervalle de temps. Nous avons noté que la synthèse préparative conduit en 1 h à 98 % de conversion de la BF dont la totalité est consommée en 1h15.





B) Cinétiques de transformation de la BF à deux échelles conduite en tubes Eppendorf[®] en présence de 50 μg d'IPK_{Mv}, et en ballon pour la synthèse préparative correspondante.

Cette cascade à deux étapes permet la conversion totale de la BF en 1 h et mène après extraction et purification à 105 mg de TB, à un rendement en produit isolé de 85 %.

La mini-voie appliquée à la synthèse de tryprostatine B

Afin de compléter la preuve de concept que nous avions envisagée, l'étape de phosphorylation catalysée par PhoN_{Xt} est intégrée à la cascade mise en place jusqu'alors. L'ajout de la NSAP de *X. translucens* induit l'utilisation du DMAOH comme agent de prénylation et de ce fait, implique l'augmentation de la concentration d'ATP. La synthèse de la TB est alors engagée à partir de DMAOH (20 mM) et de BF (10 mM), tous deux en solution dans du DMSO dont la concentration dans le mélange réactionnel est maintenue constante (10 % final). La concentration d'ATP est amenée à 40 mM (2 équivalents) afin de permettre la double phosphorylation du DMAOH catalysée par la PhoN_{Xt} et l'IPK_{Mv} (Figure 83).



Figure 83 : Preuve de concept pour la synthèse de la TB, en trois étapes enzymatiques à partir de BF et de DMAOH.

Dans la continuité des essais précédents, trois quantités de PhoN_{xt} sont testées égales à 17,5/42,5/85 µg. Seul un suivi cinétique par CCM sur silice (éluant acétate d'éthyle/méthanol 9/1) a été conduit révélant que quelle que soit la quantité testée, la réaction est non totale en 24 h (données non montrées). Nous avons donc émis l'hypothèse que la réversibilité de la réaction catalysée par PhoN_{xt} à savoir la capacité de phosphorylation d'alcool mais également d'hydrolyse des esters de phosphate formés pouvait impacter la cinétique de la réaction et la quantité d'intermédiaires phosphorylés. Nous avons donc envisagé l'augmentation de la concentration d'ATP dans le milieu réactionnel par des ajouts en cours de réaction, fixés arbitrairement à 2 et 6 h de réaction et l'utilisation de la quantité minimale testée de PhoN_{Xt}. Ces conditions permettraient de favoriser la réaction de phosphorylation vis à vis de celle d'hydrolyse par déplacement de l'équilibre dans le sens de la formation de TB et d'augmenter la disponibilité de l'ATP indispensable également à l'IPK_{Mv}. Nous nous sommes appuyés sur cette hypothèse pour réaliser une synthèse préparative à partir de DMAOH (20 mM) et de BF (100 mg/10 mM), en présence de 40 mM d'ATP en début de réaction et impliquant la quantité minimale de phosphatase afin d'obtenir une cinétique et de pouvoir isoler et quantifier la TB produite. La Figure 84 représente la cinétique résultant de l'analyse par HPLC en phase inverse de prélèvements à 0/1/2/4/6 et 24 h de réaction.





La Figure 84 souligne que l'allongement de la cascade par addition de l'étape de phosphorylation catalysée par la phosphatase acide de *X. translucens* induit une augmentation considérable du temps de réaction, avec seulement 73 % de BF convertit en TB, en 24 h. L'ajout d'ATP en cours de réaction, arbitrairement fixé à 2 et 6 h (flèches bordeaux Figure 84) ne semble pas avoir d'effet sur l'avancement de la réaction. Il serait plus pertinent considérant la cinétique obtenue, d'introduire de l'ATP avant le point à 4 h à partir duquel le système n'évolue que très peu. En effet, le taux de conversion entre 4 et 24 h augmente seulement de 17 %, passant de 56 à 73 %. A 24 h, la réaction est stoppée et la TB résultante est purifiée conduisant en un rendement en produit isolé de 79 % soit 98 mg.

Ainsi, la double activité de PhoN_{xt} semble influencer considérablement notre système catalytique à 3 enzymes et représente donc l'étape limitante. Il est également possible que nous ne parvenions pas à atteindre une conversion totale dans l'intervalle fixée de 24 h du fait de la concentration élevée en ATP utilisée à cette étape et donc de l'accumulation d'ADP (~ 40 mM) dans le milieu, reporté comme inhibiteur pour certaines isopentényl phosphate kinases et pour les kinases plus généralement^{73,276,338}.

Jusqu'à présent, la quantité de chaque enzyme participant à la cascade était estimée à partir de la mesure de l'absorbance à 280 nm de chaque catalyseur purifié, en solution dans le tampon de réaction. Par la suite, la détermination d'une activité est systématiquement conduite pour chaque enzyme et chaque lot d'enzyme (purification) afin de quantifier le plus spécifiquement possible la quantité réelle d'enzyme ajoutée lors des bioconversions et de standardiser le protocole développé. Ainsi, l'activité des différents catalyseurs utilisés pour cette synthèse préparative a été déterminée. L'objectif est d'associer à chaque quantité massique une activité correspondante (en U ou μ mol/min) qui sera donc l'unité utilisée par la suite, relative aux proportions de chaque catalyseur dans le mélange réactionnel (Tableau 8).

CATALYSEUR	Activité spécifique (U/mg d'enzyme purifiée)	Masse utilisée en catalyse (µg)	Unité enzymatique correspondante (µmol/min)
PhoN _{xt}	0,9 (a)	17,5	0,015
IPK _{Mv}	4 (b)	50,0	0,20
FtmPT1 _{Af}	0,5 (c)	220	0,14

Tableau 8 : Quantification des catalyseurs utilisés en bioconversion.

(a) déterminée par test au pNPP

(b) déterminée par test couplé au système enzymatique PK/LDH

(c) déterminéee par test au vert de Malachite

Afin de démontrer la faisabilité de la mini-voie de biosynthèse artificielle des terpènes, nous avons souhaité développer une preuve de concept basée sur une cascade enzymatique la plus courte possible et conduisant à un composé terpénique valorisable. Notre intérêt s'est porté sur la TB du fait qu'elle présente une activité cytotoxique envers différentes lignées cellulaires cancéreuses, laissant présager qu'elle est un candidat probable pour le développent de nouveaux agents anticancéreux. La prényl transférase fongique FtmPT1_{Af} catalyse majoritairement la prénylation en position C₂ du noyau indole de la BF en présence de DMAPP conduisant à l'obtention de TB. Cette prényl transférase est caractérisée par i) un repliement global rare en tonneau α/β , ii) une activité catalytique indépendante de la présence de cation divalent, iii) la présence d'un bouclier tyrosine constituant une barrière physique entre le site de fixation de la BF et la partie allylique du DMAPP (majoritairement hydrophobe et enfoui) et le site de liaison du groupement diphosphate du DMAPP (plus exposé au solvant). La prénylation qu'elle catalyse correspond à une alkylation de Friedel-Crafts dont les 3 étapes mécanistiques proposées sont les suivantes : 1) l'hydrolyse de la liaison ester d'acide phosphorique conduisant à la formation d'un carbocation, 2) l'attaque nucléophile du noyau indole de la BF sur le carbocation, et 3) la restauration de l'aromaticité par arrachement d'un proton. Afin de faire correspondre les données structurales et la régiospécificité de la prényl transférase, une rotation du carbocation est proposée précédant l'attaque nucléophile pour une prénylation en position C₂ du noyau indole de la BF.

L'application de la mini-voie couplée à la prényl transférase FtmPT1 d'A. fumigatus permet l'obtention en trois étapes de la TB à partir de diméthylallyl alcool (DMAOH) et de la BF (synthétisée chimiquement). Développée in vitro selon une approche séquentielle, cette preuve de concept implique la production et la purification des catalyseurs d'intérêt et l'affinement des quantités dans lesquelles ces derniers sont introduits, premièrement exprimées en masse puis normalisés par l'utilisation d'unité(s) enzymatique(s). L'idée est de minimiser le temps de réaction permettant de conduire à une conversion totale de la BF en son dérivé C₂-prénylé, la TB. L'étape de prénylation seule, puis couplée à l'étape catalysée par l'IPK_{MV} ont toutes deux conduit à une conversion totale de la BF en 1 h. L'ajout de l'étape de phosphorylation par PhoN_{Xt} à partir de DMAOH a considérablement influencé notre système catalytique à 3 enzymes avec une conversion non totale en 24 h. Cette réaction semble être l'étape limitante de notre cascade du fait probablement de la double activité de la phosphatase acide mais également indirectement de la concentration élevée en ATP nécessaire (40 mM) générant une quantité non négligeable d'ADP dans le milieu, reporté comme inhibiteur pour certaines isopentényl phosphate kinases.



Encouragés par ces premiers résultats validant la preuve de concept et de ce fait la mini-voie que nous avions considérée, nous avons souhaité améliorer le système à 3 enzymes en se fixant comme objectif une conversion totale dans l'intervalle fixé à 24 h. Ainsi, nous devons envisager d'étudier plus en détails les conséquences de l'ajout de PhoN_{Xt} en s'attardant sur son activité phosphatase putative sur les différents intermédiaires phosphorylés de la cascade, rendant ces derniers moins disponibles pour les étapes suivantes. De plus, il est indispensable d'étudier la mise en place d'un système de recyclage *in situ* de l'ATP permettant de minimiser la quantité utilisée mais également de réduire au minimum la quantité d'ADP formée atténuant ainsi les phénomènes possibles d'inhibition de l'IPK_{Mv}.

Pour ce faire, nous avons dans un premier temps choisi de mettre en place un système de recyclage d'ATP *in situ.* Par la suite, nous nous sommes focalisés sur la phosphatase acide de *X. translucens* et avons premièrement étudié par RMN ³¹P l'hydrolyse potentielle de l'ensemble des composés phosphorylés intervenant dans la cascade (ATP, ADP, DMAP, DMAPP, et PEP par anticipation). A l'issue de ces expériences, nous avons ciblé des facteurs particuliers dont l'influence cinétique ainsi que les interactions ont été analysés à l'aide d'un plan d'expériences factoriel complet. L'objectif par ce choix de facteur est de limiter l'activité d'hydrolyse de PhoN_{Xt} afin de maximiser le taux de conversion de la BF et donc le rendement en TB, à 24 h.

II.Étude détaillée de la cascade à 3 étapes

a. Le système de recyclage d'ATP

Différents critères régissent le choix du système de régénération du co-substrat d'intérêt dont la concentration est ainsi maintenue constante au cours de la réaction. Ce système rend possible l'utilisation du co-substrat à des quantités sous stœchiométriques et diminue ainsi le coût du procédé développé, paramètre essentiel lorsqu'une application du procédé est envisagée à plus grande échelle. Brièvement, il est nécessaire que les composants de ce système soient disponibles, stables dans les conditions de bioconversion testées et bon marché, lorsque cela est possible. De plus, il est indispensable que l'étape de recyclage soit thermodynamiquement et cinétiquement favorable et que le(s) substrat(s) et sous-produit(s) lié(s) n'interfèrent pas avec les composants de la cascade principale. Enfin, le TTN (total turnover number) représentant le nombre total de moles de produit formé par mole d'enzyme pendant la durée de vie totale de l'enzyme³³⁹ appliqué au système de recyclage du cofacteur doit être élevé³⁴⁰. Une règle générale indique que pour qu'un système de régénération soit économiquement viable un TTN compris entre 10³ et 10⁵ est suffisant. Ce paramètre est d'autant plus important qu'une application à plus grande échelle, voire industrielle est envisagée.

Quatre systèmes enzymatiques sont décrits comme permettant le recyclage d'ATP à partir d'ADP dont les principales caractéristiques sont présentées dans le Tableau 9.

Système de recyclage			Caractéristiques	
Enzyme	Donneur	Sous-produit	Avantages	Limites
Pyruvate kinase (PK)	PEP	Pyruvate	 Stabilité du PEP K_{eq} favorable 	 Coût du PEP Inhibition de la PK par le pyruvate
Polyphosphate kinase (PPK)	pPi(n)	pPi (n-1)	• Coût et stabilité du donneur	-
Acetate kinase (AK)	acetylphosphate	acetate	• Coût et synthèse facile du donneur	• Hydrolyse rapide du donneur
Creatine kinase (CK)	creatine phosphate	creatine	• K _{eq} favorable • Coût donneur et enzyme	-

Tableau 9 : Caractéristiques des systèmes de régénération d'ATP in situ à partir d'ADP.(D'après Johannes et al., 2006)

Parmi ces systèmes, nous avons choisi de mettre en place celui impliquant la pyruvate kinase couplée à l'utilisation du phosphoénolpyruvate (PEP) comme donneur de groupement phosphate, du fait d'une disponibilité immédiate au sein du laboratoire (Figure 85).



Figure 85 : Système de recyclage de l'ATP catalysé par la pyruvate kinase à partir de PEP, appliqué à la preuve de concept à 3 étapes enzymatiques.

Régénérer l'ATP *in situ* à partir d'ADP permet *i*) de maintenir constante la concentration en ATP dont sont dépendantes la phosphatase acide et l'isopentenyl phosphate kinase, *ii*) de déplacer l'équilibre en faveur de la transphosphorylation catalysée par PhoN_{Xt}, *iii*) de lever le phénomène suggéré d'inhibition de la kinase. L'ensemble de ces conséquences conduirait d'une part à une synthèse de DMAP favorisée et d'autre part à sa prise en charge immédiate par l'IPK_{Mv} sans limitation causée par une inhibition.

Dans le cadre de la cascade décrite précédemment, nous avons fixé la concentration de PEP à 40 mM et celle d'ATP à 4 mM (noté R 4/40). Pour un système économiquement viable à plus grande échelle, il est envisageable de synthétiser le PEP à partir de pyruvate³⁴¹ mais plus probablement de choisir parmi les alternatives présentées dans le Tableau 9.

b. Le double enjeu autour de PhoN_{Xt}

Comme introduit en début de ce chapitre (Chapitre IA.II Les enzymes), les phosphatases acides sont caractérisées par une activité d'hydrolyse d'une large gamme de monoesters de phosphate. Bien que notre intérêt se porte sur la réaction inverse à savoir la transphosphorylation, il est essentiel d'étudier le comportement de PhoN_{Xt} en présence de l'ensemble des composés phosphorylés intervenant dans la cascade (les intermédiaires réactionnels DMAP, DMAPP) mais également vis à vis de l'ATP, de l'ADP, de l'AMP et du PEP introduit lors de la mise en place du système de recyclage précédemment décrit. En effet, une hydrolyse partielle de ces intermédiaires et/ou du co-substrat induirait une disponibilité moindre de ces composés en cours de réaction et pourrait être l'une des causes de la modification du profil cinétique observé.

Ainsi, nous avons conduit une étude cinétique par RMN ³¹P découplé ¹H en plaçant 0,2 U de PhoN_{Xt} en présence de 20 mM de chacun de ces composés en solution dans le tampon de réaction Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM dont le pH est ajusté à 7,5. La cinétique est menée à 37°C, pendant 24 h sous une agitation en bain sec fixée à 800 rpm. Des prélèvements à 0/1/2/4/6 et 24 h de réaction dilués au demi par ajout de DMSO-d₆ ont permis de suivre l'intensité des signaux caractéristiques de chaque composé.

Pour chaque essai, un témoin a été réalisé en absence d'enzyme toutes choses étant égales par ailleurs, afin de valider la stabilité des composés phosphorylés étudiés dans les conditions de bioconversion et d'associer tout phénomène d'hydrolyse uniquement à la phosphatase acide de *X. translucens*. Sur les Figure 86, Figure 87 et Figure 88 sont représentées la structure du composé testé, le spectre RMN ³¹P découplé ¹H associé ainsi que le profil cinétique résultant de l'action de la phosphatase sur ce composé. Un phénomène négligeable d'hydrolyse est observé en absence d'enzyme (témoins de stabilité) lorsque les composés sont seuls en solution dans le tampon de réaction. Ce phénomène reste cependant négligeable en comparaison des profils obtenus en présence de PhoN_{Xt} qui indiquent que l'ATP/ADP/AMP, le DMAP/DMAPP ainsi que le PEP sont tous entièrement dégradés après 6 h de réaction.

L'ATP et l'ADP sont tous deux hydrolysés par PhoN_{xt}. L'intensité du signal caractéristique de la présence de ces nucléotides en solution (-10 < δ (ppm)> -11) n'est plus détectable dès 4 h, indiquant une hydrolyse totale de ces composés. Cette hydrolyse est confirmée par la cinétique d'apparition de Pi (~-0,5 ppm) au cours du temps. Dans le cadre de l'hydrolyse de l'ATP, nous avons également pu observer l'apparition d'ADP de façon transitoire avant qu'il ne soit lui-même dégradé (données non représentées) (Figure 86). Nous avons également mis en évidence l'hydrolyse d'AMP en 4 h.



Figure 86 : Spectres RMN ³¹**P découplé ¹H de l'ATP et de l'ADP et cinétiques d'hydrolyse associées.** Pour chaque spectre RMN, la structure du composé correspondant est représentée dans l'angle supérieur gauche, les signaux mis en évidence par un cercle coloré sont les signaux dont l'intensité est suivie au cours de la réaction, enfin le profil cinétique observé est donné sur le graphe dans l'angle supérieur droit. Paramètres d'acquisition des spectres RMN : 121,49 MHz, 27°C, 128 scans, D1 = 2 sec. Échantillons : 300 µL de mélange réactionnel supplémenté par 300 µL de DMSO-d₆.

Le PEP, substrat impliqué dans le système de régénération d'ATP *in situ* est caractérisé dans nos conditions par un singulet autour de -2,5 ppm. L'intensité de ce signal diminue jusqu'à n'être plus détectable à 6 h de réaction (Figure 87). De la même façon que précédemment décrit, l'apparition de Pi, sous-produit de la réaction catalysée par la phosphatase acide, corrobore l'hypothèse de l'hydrolyse dans nos conditions expérimentales (Figure 87).





La structure du PEP est représentée dans l'angle supérieur gauche, l'intensité du singulet obtenu est rapportée sur un graphe en fonction du temps permettant l'obtention d'un profil cinétique en présence de la phosphatase acide (angle supérieur droit). Paramètres d'acquisition des spectres RMN : 121,49 MHz, 27°C, 128 scans, D1 = 2 sec. Échantillon : 300 μ L de mélange réactionnel supplémenté par 300 μ L de DMSO-d₆.

Enfin, les deux intermédiaires phosphorylés que sont le DMAP et son dérivé diphosphate (DMAPP) intervenant dans la mini-voie sont caractérisés par RMN ³¹P découplée ¹H par un singulet autour de 0 ppm et un doublet entre -7 et -10 ppm respectivement. En présence de PhoN_{Xt}, le DMAP n'est plus détecté à partir de 6 h, son hydrolyse semble donc être totale dans cet intervalle de temps, le DMAPP quant à lui est entièrement dégradé en 4 h (Figure 88).



Figure 88 : Spectres RMN ³¹P découplé ¹H du DMAP et du DMAPP et cinétiques d'hydrolyse associées.

Pour chaque spectre RMN, la structure du composé correspondant est représentée dans l'angle supérieur gauche, les signaux mis en évidence par un cercle coloré sont les signaux dont l'intensité est suivie au cours de la réaction, enfin le profil cinétique observé est donné sur le graphe dans l'angle supérieur droit. Paramètres d'acquisition des spectres RMN : 121,49 MHz, 27°C, 128 scans, D1 = 2 sec. Échantillons : 300 µL de mélange réactionnel supplémenté par 300 µL de DMSO-d₆.



Ces expériences ont permis de mettre en évidence que la phosphatase acide est capable d'hydrolyser l'ensemble des composés phosphorylés (intermédiaires réactionnels, cosubstrat et sous-produit associé, substrat du système de recyclage) intervenant dans la cascade à 3 étapes, développée précédemment. La déphosphorylation de ces composés s'inscrit dans un intervalle de temps de 6 h inférieur à 24 h, durée maximale que nous avons fixé pour la synthèse en 3 étapes de TB. A partir de ces données, l'utilisation d'ATP permet d'envisager trois opportunités de phosphoryler la NSAP puisque cette dernière semble accepter comme substrats l'ATP, l'ADP ainsi que l'AMP. Il est également possible que l'ADP et l'AMP puissent générer de l'ATP induisant une compétition entre le DMAOH et ces composés vis à vis du groupement phosphate au sein du site actif de l'enzyme. Il est à noter qu'il nous a été difficile de trouver un étalon interne pertinent dont la réponse en RMN ³¹P soit correcte et ne donne pas lieu à un signal superposé à un ou plusieurs des signaux caractéristiques de l'ATP/ADP/AMP et du DMAP/DMAPP/PEP. A ce jour, nous n'avons pas pu entreprendre une quantification via cette méthode d'analyse afin de compléter et normaliser les résultats obtenus. Nous avons également engagé des suivis cinétiques sur le système complet à deux enzymes qui ne se sont pas révélés concluants. En effet, les spectres *RMN se complexifient du fait de la superposition des signaux caractéristiques des différents* composés phosphorylés et ne permettent ainsi pas de suivre l'évolution de leur proportion dans le mélange réactionnel avec précision, ni d'envisager une quantification.

Ainsi, il apparait comme essentiel de limiter l'activité phosphatase de la NSAP de *X. translucens* limitant la disponibilité des intermédiaires mono- et di- phosphates en cours de réaction, pour envisager une synthèse totale de la TB en 3 étapes et en 24 h. De plus, du fait de sa dépendance catalytique envers l'ATP, l'IPK_{Mv} est également impactée par la dégradation du cofacteur. Nous avons donc choisi d'étudier l'impact et l'interaction de trois facteurs que nous avons jugés pouvoir influencer la cinétique globale de la cascade et de ce fait le taux de conversion de la BF afin de le maximiser *i.e. i*) la concentration en substrat DMAOH, *ii*) la quantité de PhoN_{Xt} et *iii*) la quantité de la dernière enzyme de la cascade FtmPT1_{Af}. Pour cela, nous avons adopté une démarche de recherche expérimentale *via* la construction d'un plan d'expériences.

c. La détermination des facteurs influents et des interactions

Afin d'améliorer le système à 3 enzymes permettant la synthèse de TB, un plan factoriel complet a été choisi. En effet, il correspond à notre volonté de déterminer l'influence de la concentration en DMAOH, et des quantités de PhoN_{Xt} et FtmPT1_{Af} mais également des éventuelles interactions entre ces facteurs, chacun étudié sur deux niveaux et générant ainsi une série de 8 expériences (plan factoriel complet 2³).

Nous avons choisi d'initier le plan d'expériences à partir des trois facteurs ci-dessus sur la base des quatre hypothèses suivantes :

- L'augmentation de la quantité de phosphatase acide peut conduire à une formation accélérée de DMAP, DMAPP et de ce fait de TB, mais également accroître l'hydrolyse des intermédiaires phosphorylés, et, dans ce cas, diminuer le rendement final.
- 2) A l'inverse, une diminution de la quantité de PhoN_{Xt} permettrait d'atténuer le phénomène d'hydrolyse en faveur de la synthèse de DMAP, DMAPP et donc de TB, synthèse qui pourrait être plus lente.
- 3) Fixer une concentration en substrat plus élevée permettrait de dynamiser le début de la cascade et ainsi d'induire préférentiellement la synthèse de DMAP par déplacement de l'équilibre.
- 4) Accroitre la quantité de FtmPT1_{Af} dans le milieu réactionnel contribuerait à consommer plus rapidement l'agent de prénylation DMAPP, le rendant moins disponible pour une éventuelle hydrolyse et de ce fait conduisant à une synthèse de TB favorisée.

Les synthèses correspondantes sont conduites à 37°C, 800 rpm durant 24 h et un suivi cinétique par prélèvement pour analyse par HPLC^{*}. Ce dernier permet l'observation de la réponse conversion en BF (%, Y) à 24 h, que l'on souhaite la plus élevée possible. Pour rappel, le milieu réactionnel a pour base commune le système de recyclage de l'ATP *in situ* composé d'ATP à 4 mM, de PEP à 40 mM et de PK, une concentration en BF (en solution dans le DMSO) fixée à 10 mM et une quantité d'enzyme IPK_{Mv} fixée à 0,26 unité enzymatique (U). Le plan d'expériences conduit et les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau 10.

	X7	¥7	*7	
	X 1	X ₂	X 3	Y
Expériences	[DMAOH]	PhoN _{xt}	FtmPT1 _{Af} (U)	Conversion
	(mM)	(U)		BF à 24 h (%)
1	10	0,033	0,0525	24,35
2	30	0,033	0,0525	24,57
3	10	0,099	0,0525	26,68
4	30	0,099	0,0525	29,25
4'	30	0,099	0,0525	27,28
5	10	0,033	0,21	23,03
6	30	0,033	0,21	57,49
7	10	0,099	0,21	25,97
8	30	0,099	0,21	44,99
Niveau -1	10	0,033	0,0525	
Niveau +1	30	0,099	0,21	

Tableau 10 : Plan d'expériences pour l'étude de l'influence et des interactions entre la concentration en substrat et les quantités de catalyseurs PhoN_{xt} et FtmPT1_{Af}.

L'analyse statistique de ce plan d'expériences a été réalisée à l'aide du logiciel AZURAD®.

^{*} Rappel : pour chaque bioconversion, un suivi cinétique est réalisé *via* des prélèvements en cours de réaction auxquels est ajouté un étalon interne (indole, solution mère à 5 mM en acétonitrile) permettant de quantifier la consommation de BF à 280 nm, par HPLC en phase inverse sur une colonne de type Nucleodur C18-Gravity-SB thermostatée à 50°C. L'élution est faite par un mélange 60/40 eau/méthanol, à un débit de 0,3 mL/min.

i. EFFETS PRINCIPAUX ET INTERACTIONS

Dans un premier temps, le graphique des effets principaux et interactions schématise l'influence de chaque facteur mais également de leur interaction sur la réponse étudiée Y égale au taux de conversion de la BF en fin de réaction (Figure 89).



Figure 89 : Graphique des effets principaux et interactions sur le taux de conversion de la BF à 24 h (Y).

Les coefficients b₁, b₂, et b₃ représentent l'effet principal de la concentration en DMAOH (facteur X₁), de la quantité de PhoN_{Xt} (facteur X₂) et de la quantité de FtmPT1_{Af} (facteur X₃) respectivement sur le taux de conversion de la BF (à 24 h). Les notations b₁₋₂, b₁₋₃ et b₂₋₃ décrivent les interactions de premier ordre entre les facteurs identifiés par les deux chiffres. Ainsi l'effet d'interaction noté b₁₋₂ schématise l'influence de l'interaction du facteur X₁ [DMAOH] avec le facteur X₂ (quantité de PhoN_{xt}) sur le taux de conversion en BF. Enfin, l'effet nommé b₁₋₂₋₃ est un effet d'interaction de deuxième ordre entre les trois facteurs testés. Les lignes verticales en pointillés forment la limite de signification calculée à partir de l'expérience 4 et de son duplicat (expérience 4'). Lorsque l'effet étudié est significatif (b > limite de signification) le bâton représentatif est coloré en rouge, à l'inverse une coloration bleue donne lieu à un effet non significatif sur le taux de conversion de la BF à 24 h. L'orientation des bâtons vers la gauche indique un effet négatif sur la réponse, l'inverse est observé vers la droite.

Enfin, l'interprétation des effets principaux et des interactions doit être conduit de l'effet le plus complexe vers le plus simple (des effets d'interaction de 2^{ème} ordre vers les effets principaux).

La Figure 89 représente les effets principaux et interactions sur le taux de conversion de la BF à 24 h (réponse notée Y) que l'on souhaite maximiser. L'effet principal significatif est uniquement lié au facteur « concentration en DMAOH » (bâton coloré en rouge, coefficient b> limite de signification). Cependant, cet effet ne peut plus être pris en compte car il existe un effet d'interaction significatif, entre la concentration en DMAOH et la quantité de FtmPT1_{Af}, sur le taux de conversion de la BF. Cet effet, noté b₁₋₃ est positif signifiant qu'il induit une augmentation du taux de conversion. L'effet du facteur « quantité de PhoN_{Xt} » n'est pas significatif. De ce fait, la variation de la quantité de catalyseur ne provoque pas une modification significative du taux de conversion à 24 h. De plus, aucun effet d'interaction entre la quantité de PhoN_{Xt} et la concentration en DMAOH ou la quantité de FtmPT1_{Af} n'est mise en évidence ce qui suggère une indépendance entre ces trois facteurs.



En conclusion, l'effet ayant le plus d'influence sur la variation de nos réponses concerne l'effet d'interaction entre le facteur X_1 « concentration en DMAOH » et le facteur X_3 « quantité de FtmPT1_{Af} ». Ce dernier à une influence positive sur la réponse Y « taux de conversion de la BF à 24 h » ce qui conduit à la maximisation de Y dans l'intervalle de temps fixé à 24 h. Ce résultat révèle ainsi une interaction et donc, une dépendance, que nous n'avions pas envisagée comme prépondérante lors de l'élaboration de ce plan d'expériences.

D'autre part, nous avions initialement supposé que PhoN_{xt} pouvait impacter l'ensemble de la cascade en diminuant la disponibilité des intermédiaires mono- et diphopshates et également du PEP et de l'ATP indispensable au bon fonctionnement de notre cascade. Le plan d'expériences proposé a donc été construit sur la base de facteurs pouvant déplacer l'équilibre de la réaction, dans le sens de formation de la TB. Cependant, cette étude statistique souligne que la quantité de phosphatase acide n'a pas d'influence significative sur la concentration finale en BF et sur la conversion de la BF à 24 h et qu'il n'existe aucune dépendance entre cette enzyme et les autres facteurs testés pouvant impacter la situation en fin de réaction.

ii. EFFETS D'INTERACTION DE PREMIER ORDRE

Le graphique ci-dessous (Figure 90) représente l'effet d'interaction d'ordre 1 significatif b₁₋₃ que nous avons identifié précédemment *i.e.* l'effet d'interaction entre la concentration en DMAOH et la quantité de FtmPT1_{Af}. A partir de ce graphique, il est possible de sélectionner le niveau de chacun des deux facteurs (10 ou 30 mM en DMAOH et 0,0525 ou 0,21 U en FtmPT1_{Af}) permettant de maximiser le taux de conversion de la BF à 24 h. Les deux valeurs de concentration en DMAOH sont en abscisses. Les lignes en pointillés verts (0,21 U de FtmPT1_{Af}) et rouges (0,0525 U de FtmPT1_{Af}) représentent donc les deux quantités testées de FtmPT1_{Af} soit 0,21 U et 0,0525 U, respectivement. Le taux de conversion est reporté en ordonnées.



Figure 90 : Effet d'interaction de premier ordre entre la concentration en DMAOH (abscisse) et la quantité de FtmPT1_{Af} (lignes pointillées) sur le taux de conversion de la BF en fin de réaction (ordonnée).

A partir de ce graphique, on observe que lorsque la concentration en substrat est égale à 10 mM, quelle que soit la quantité de FtmPT1_{Af} utilisée 0,0525 U (pointillés rouges) ou 0,21 U (pointillés verts) le taux de conversion ne varie pas ou très peu. Lorsque la concentration en DMAOH est égale à 30 mM, l'utilisation de 0,21 U de FtmPT1_{Af} permet d'augmenter considérablement le taux de conversion. Ainsi, 30 mM de substrat permettent de maximiser la conversion de la BF lorsque 0,21 U de FtmPT1_{Af} sont utilisées, ces paramètres sont ainsi les niveaux les plus significatifs des facteurs X₁ « concentration en DMAOH » et X₃ « quantité de FtmPT1_{Af} ».

A l'issue de ce plan d'expériences, un seul effet apparaît comme important et correspond à l'effet d'interaction entre la concentration en substrat DMAOH et la quantité de la dernière enzyme de la cascade. Cette interaction influence de façon significative la cinétique globale de la réaction et dans le but de conduire à une conversion la plus élevée possible il nous faut fixer à 30 mM la concentration en DMAOH et à 0,21 U la quantité de prényl transférase. Cela peut s'expliquer par le fait qu'une concentration plus élevée en DMAOH « pousse » PhoN_{Xt} à synthétiser le DMAP et la quantité élevée de FtmPT1_{Af} permet de déplacer l'équilibre dans le sens de la formation de la TB. Ainsi, l'hydrolyse des composés phosphorylés par PhoN_{xt} est limitée. A l'instar de l'importance de ces facteurs liés entre eux pour favoriser la conversion de la BF, la quantité de la première enzyme de la cascade n'est pas un facteur influent et aucune interaction avec les deux autres facteurs étudiés n'a été démontrée. Ces résultats suggèrent que la capacité de la phosphatase acide à hydrolyser l'ensemble des intermédiaires de la cascade ainsi que le co-substrat ATP dans un système isolé et simplifié (Pho N_{Xt} comme seule enzyme en présence d'un seul composé) n'impacte que peu notre cascade à trois enzymes dans les conditions fixées. Ainsi, la quantité de la phosphatase acide n'est pas un facteur déterminant. Nous pouvons donc choisir par exemple, dans un soucis d'économie de catalyseur, la quantité la plus basse fixée au sein du plan d'expériences soit 0,033 U pour PhoNxt.



d. L'optimisation

Nous avons initié le développement d'un plan factoriel complet 2³ via l'étude des trois facteurs « concentration en DMAOH », « quantité de PhoN_{Xt} » et « quantité de FtmPT1_{Af} ». Cette étude nous a permis de mieux appréhender le système à trois enzymes que nous développons ainsi comme preuve de concept, en nous basant sur le taux de conversion final, atteint à 24h. En effet, afin de relier les facteurs/niveaux/réponse aux expériences conduites en tubes Eppendorf[®], une conversion maximale entre 57 et 45 % a pu être respectivement atteinte lors des expériences 6 et 8 du plan factoriel complet (Tableau 10), différenciées par la quantité de PhoN_{Xt} utilisée 0,033 U et 0,099 U respectivement. Ces expériences sont les deux seules combinant 30 mM en DMAOH et 0,21 U en FtmPT1_{Af}, niveaux discriminant des facteurs X₁ et X₃ respectivement. Les cinétiques de ces deux expériences suivies par HPLC durant 24 h sont données ci-dessous, sur la Figure 91.



Figure 91 : Graphes représentant les cinétiques liées aux expériences 6 et 8 du plan factoriel complet ayant permis d'atteindre les plus hautes valeurs de conversion de la BF en 24 h.

Les profils cinétiques sont différents et sont initialement fonction de la quantité de phosphatase acide dans le milieu réactionnel, toutes les autres conditions expérimentales étant identiques. En effet, lorsque PhoN_{xt} est introduite en plus grande quantité (0,099 U, expérience 8), la consommation de la BF est accélérée durant la première heure de réaction et conduit à 45 % de conversion (ou 55 % de BF non consommée). Cependant, aucune évolution n'est observée après 1 h, la cascade dans son ensemble semble donc être dans une phase stationnaire. Lorsque la quantité de phosphatase est réduite à 0,033 U dans le cas de l'expérience 6, l'évolution est progressive entre 0 et 4 h, avec environs 24 % de BF converti en 1 h soit plus de deux fois moins que dans le cas précédent. Un palier est ensuite atteint après 4 h de réaction lorsque près de 57 % de BF ont été converti en TB (soit 43 % de BF non consommée). Il est intéressant de visualiser ces graphes qui complètent l'étude faite via le plan d'expériences factoriel complet. En effet, ils apportent une information supplémentaire en soulignant l'impact de la phosphatase sur la cinétique de notre preuve de concept et particulièrement durant les premières heures de réaction. Ainsi, l'hypothèse que nous proposions considérant que la quantité de phosphatase peut influencer la vitesse de réaction semble être validée.

L'atteinte d'un palier peut être liée à l'hydrolyse des intermédiaires réactionnels et cosubstrat ; cependant cette hypothèse ne semble pas être la plus pertinente puisque nous nous sommes placés à une concentration en substrat DMAOH et à une quantité de FtmPT1_{Af} élevées, conditions davantage favorables à la réaction de phosphorylation souhaitée. Une seconde hypothèse concerne la disponibilité d'une quantité suffisante d'ATP tout au long de la réaction afin que la PhoN_{Xt} ainsi que l'IPK_{Mv} puissent fonctionner dans des conditions idéales. Ce facteur n'ayant pas été introduit dans le plan d'expériences précédent, nous avons étudié différentes possibilités d'enrichissement du milieu réactionnel en ATP soit par modification du système de recyclage établit en amont (R 4/40), soit *via* des ajouts d'ATP en cours de réaction en présence d'un système de recyclage (R 4/40 ou R 40/40). Nous avons mené trois nouveaux essais en tubes Eppendorf[®] sur la base de l'expérience 6 ayant conduit à la valeur maximale de conversion soit 57 % : DMAOH 30 mM, PhoN_{Xt} 0,033 U, FtmPT1_{Af} 0,21 U, et R 4/40. Les variantes testées visent à augmenter la concentration d'ATP impliquée dans le système de recyclage (R 40/40), et à supplémenter le milieu réactionnel à 2 et 4 h de réaction par de l'ATP (0,015 mmol) en présence d'un système de régénération de type 4/40 et 40/40 (Tableau 11). Le suivi cinétique est conduit uniquement par CCM sur silice^{*}.

	Contrôle (expérience 6)	Modification du système de recyclage	Modification de la quantité d'ATP en cours de réaction en présence d'un système de recyclage	
[DMAOH] (mM)			30	
PhoN _{xt} (U)	0.033			
FtmPT1 _{Af} (U)		0.21		
ATP	Recyclage 4/40	Recyclage 40/40	Recyclage 4/40	Recyclage 40/40
	• ATP 4 mM	• ATP 40 mM	• ATP 4 mM	• ATP 40 mM
	• PEP 40 mM	• PEP 40 mM	• PEP 40 mM	• PEP 40 mM
	• PK 30-50 U	• PK 30-50 U	• PK 30-50 U	• PK 30-50 U
			+ (2 x 0, 015	+ (2 x 0, 015
			mmoles d'ATP)	mmoles d'ATP)

Tableau 11 : Conditions expérimentales pour les variantes de l'expérience 6 du plan d'expériences afin de modifier l'apport d'ATP au sein de la cascade.

Ces essais ont permis d'observer la conversion totale de la BF en TB, dans l'intervalle de temps fixé à 24 h, lorsque deux ajouts d'ATP sont réalisés à 2 et 4 h. Lorsque nous n'avons pas supplémenté en ATP le milieu réactionnel en cours de réaction, les CCMs sur silice révèlent que la BF n'est pas consommée dans sa totalité en 24 h. De plus, le suivi cinétique met en évidence que coupler le système de recyclage 40/40 à deux ajouts d'ATP permet d'approcher la conversion totale en 20 h de réaction.

^{*} La chromatographie sur couche mince est réalisée sur silice, l'éluant est un mélange d'acétate d'éthyle et de méthanol dans les proportions respectives 90/10. La révélation est faite par exposition aux UV et après contact avec du *p*-anisaldéhyde.

De ce fait, nous avons appliqué ces nouvelles conditions expérimentales lors d'une montée en échelle sur 100 mg de BF, toutes choses ayant été proportionnellement adaptées avec le système R 40/40 et deux ajouts d'ATP à 2 et 4 h de réaction.

La Figure 92 représente la proportion de BF disponible à un instant t, dans le cas de la cascade développée initialement*(première synthèse préparative pour la cascade à trois enzymes présentée, cinétique représentée en rose) et pour la cascade dont les conditions ont été ajustées à l'issue du plan factoriel complet et de l'optimisation d'apport en ATP (cinétique représentée en orange). Il est à noter que la synthèse optimisée a été réalisée deux fois afin de valider la répétabilité du procédé. Ces deux essais sont conduits à partir des mêmes solutions de substrat, de cofacteur, de la même synthèse chimique concernant la BF. Les catalyseurs étant purifiés fraîchement sont eux issus d'une campagne de production et de purification différente.



Figure 92 : Cinétiques de transformation de la BF sur 24 h, à l'échelle préparative avant (courbe rose) et à l'issue du plan d'expériences et de l'optimisation d'apport d'ATP (courbe orange).

 $^{^*}$ DMAOH 20 mM, BF 100 mg, 10 mM, ATP 40 mM (pas de système de recyclage), PhoN_{Xt} : 0, 015 U, IPK_{Mv} : 0,2 U, FtmPT1_{Af} : 0,14 U.

L'application de la méthodologie de recherche expérimentale à notre système à 3 enzymes couplée à l'amélioration des conditions de disponibilité du co-substrat ATP conduisent à une conversion totale moyenne dès 20 h (courbe orange) en comparaison des 30 % environ lors de la phase de développement (courbe rose) validant ainsi les objectifs de durée et de conversion fixés initialement. De plus, nous avons été en mesure de reproduire lors d'une deuxième synthèse ce résultat confirmant la répétabilité et la fiabilité de notre preuve de concept, dans ces conditions et à partir de deux lots de production de catalyseurs différents. Ces données sont en faveur de la méthode de quantification des enzymes impliquées dans la cascade que nous avons choisie, non plus uniquement selon une masse mais bien basée sur le nombre d'unités enzymatiques ajoutées au milieu réactionnel. En terme de rendements en produit isolé, la première expérience préparative (courbe rose) permettait l'obtention de 98 mg de TB pure (pour un rendement massique égal à 79 %). Les synthèses optimisées (courbe orange) ont généré une masse moyenne égale à 92 \pm 21 mg de TB après extraction et purification correspondant à un rendement en produit isolé de 74 \pm 17 %.

L'optimisation de la cascade à trois enzymes a été permise par utilisation de la plus faible quantité de PhoN_{xt} (expérience 6, Figure 91) avec une conversion totale en moins de 24 h, validant la preuve de concept que nous avions envisagé. Il semble évident qu'il ne s'agit pas d'un système optimal. Par exemple, une amélioration est envisageable au niveau de la méthode de régénération d'ATP sélectionnée pour l'efficacité de notre preuve de concept. En effet, le système de régénération PK/PEP est l'un des moins avantageux lié notamment au coût élevé du PEP. Bien qu'il soit possible de le synthétiser à partir de pyruvate, ce recours rendrait plus complexe notre cascade et l'utilisation par exemple des polyphosphates couplés à une PPK serait une alternative avantageuse à mettre en place dans l'idée d'une application à plus grande échelle. De la même façon, notre optimisation repose sur une concentration d'ATP en cours de réaction qui semblent nécessaires pour atteindre une conversion complète. Il est donc indispensable de trouver une alternative afin d'amoindrir les concentrations en cosubstrat et en PEP, pour un système catalytique plus économique.



Nous sommes parvenus à développer, in vitro, une mini-voie de biosynthèse offrant un accès simplifié à la TB, composé terpénique valorisable du fait de son activité cytotoxique. Cette mini-voie permet la synthèse de DMAPP, à partir du terpénol industriel DMAOH, en deux étapes de phosphorylation ATP-dépendantes successives, catalysées par la NSAP de X. translucens et l'IPK de M. vannielii. L'addition de la prényl transférase d'A. fumigatus conduit à l'obtention de TB par C-prénylation de la BF grâce au DMAPP. L'approche séquentielle a permis le développement initial de cette cascade à trois enzymes tout en révélant l'influence considérable de l'addition du DMAOH et de la phosphatase acide sur la cinétique de la cascade dans sa globalité. N'ayant pas atteint une conversion totale dans l'intervalle de temps que nous avions délimité à 24 h, nous avons engagé divers essais afin de mieux appréhender puis d'optimiser ce système catalytique. Pour ce faire, nous avons initialement supposé l'étape catalysée par PhoN_{xt} comme cinétiquement limitante du fait de la double activité de cette enzyme et avons donc cherché à contrôler et limiter l'activité non souhaitée d'hydrolyse. En effet, l'hydrolyse isolée de chaque intermédiaire réactionnel mais également du co-substrat ATP a été mise en évidence par suivi cinétique en RMN ³¹P. Un système de régénération d'ATP a été intégré avec l'idée de favoriser la réaction de transphosphorylation et limiter l'inhibition de l'IPK par l'ADP accumulé. Le recours à un plan factoriel complet 2³ a permis d'évaluer sur deux niveaux l'effet de la concentration en DMAOH (substrat), de la quantité de PhoN_{Xt} et de FtmPT1_{Af} mais également l'effet d'interaction entre ces facteurs sur la conversion de la BF à 24 h. Il en est ressorti que seul l'effet d'interaction entre la concentration en substrat DMAOH et la quantité de la dernière enzyme de la cascade influence de façon significative la cinétique globale de la réaction. Dans le but de conduire à une conversion la plus élevée possible, il nous faut fixer à 30 mM la concentration en DMAOH et à 0,21 U la quantité de prényl transférase. Dans ce contexte, la quantité de PhoN_{xt} n'est pas apparue comme significative ni dépendante d'autres facteurs. En changeant d'approche et en se focalisant non plus sur un point final mais davantage sur la cinétique réactionnelle dans sa globalité, la PhoNxt s'est avérée influencer de façon significative la vitesse initiale de réaction, une quantité plus élevée conduisant à 45 % de conversion en seulement 1 h de réaction. Nous avons préféré minimiser la quantité de ce catalyseur et avons par la suite engagé une optimisation centrée sur la disponibilité d'ATP en cours de réaction.

La mise en place d'un système de régénération d'ATP à 40 mM et l'ajout d'ATP a permis d'atteindre 100% de conversion en moins de 24 h et nous offre ainsi un système catalytique en 3 étapes conduisant à l'obtention d'un peu moins de 100 mg de TB (92 \pm 21 mg soit un rendement en produit isolé égale à 74 \pm 17 %).

C. APPLICATION A LA SYNTHESE *IN VIVO* DE TRYPROSTATINE **B**

Une version *in vivo* de la mini-voie a également été développée pour des premiers essais en amont des travaux jusqu'alors décrits en in vitro. Ils avaient ainsi pour objectif de valider une potentielle application in vivo pour ce projet Les travaux de Wever et collaborateurs^{275,288} évoqués en début de chapitre ont révélé la phosphatase acide de Salmonella enterica et plus particulièrement le simple mutant V78L comme capables de catalyser la phosphorylation d'alcools primaires notamment. Ils décrivent ainsi dans le cadre de la phosphorylation de la dihydroxyacétone³⁴² qu'à pH égal à 6 le simple mutant V78L de PhoNse est doté d'une activité dix-sept fois supérieure à celle de la version sauvage, elle-même six fois plus active que celle de Shigella flexneri ayant précédemment retenue notre attention pour sa capacité à phosphoryler le dérivé hydrogéné du DMAOH (Chapitre IA.II.a.i). Nous avons donc sélectionné la phosphatase acide de S. enterica ainsi que le simple mutant V78L pour catalyser la conversion du DMAOH en DMAP. L'IPK ciblée est celle impliquée dans une version modifiée de la voie du mévalonate de l'archée *Thermoplasma acidophilum* (IPK_{Ta}) catalysant la phosphorylation de l'IP et du DMAP en présence d'ATP. Enfin, la prényl transférase d'A. fumigatus est conservée pour la prénylation de la dicétopiperazine BF à partir de DMAPP^{175,180,329}.

Trois constructions génétiques ont ainsi été générées pour une intégration chez *E. coli* BL21(DE3), sélectionnée comme hôte. La première est identique à celle utilisée *in vitro* à savoir pET-*ftmPT1*_{Af} traduisant le clonage du gène *ftmPT1* d'*A. fumigatus* dans le vecteur pET-22b(+). Les deux autres correspondent au clonage des gènes *ipk*_{Ta} et *phoN*_{Se} ou *phoN*_{Se} (*V78L*) dans le vecteur d'expression pRSFDuet-1. De ce fait, les séquences codantes de chacune des protéines d'intérêt sont sous le contrôle du promoteur T7.

La co-transformation de la souche BL21(DE3) avec ces deux constructions a permis de réaliser des essais préliminaires. Deux souches recombinantes sont ainsi obtenues, d'une part celle ayant intégré les vecteurs pET-*ftmpt1*_{Af} et pRSF-*phoN*_{Se}-*ipk*_{Ta} et d'autre part celle portant les constructions pRSF-*phoN*_{Se} (V78L)-*ipk*_{Ta} et pET-*ftmPT1*_{Af} (Figure 93).



Figure 93 : Schématisation de la souche recombinante PhoNSe(V78L)-IPKTa-FtmPT1 construite pour la synthèse de tryprostatine B *in vivo*.

Chacune de ces souches recombinantes est mise en culture^{*} et lors de l'induction à l'IPTG, le milieu de culture est supplémenté par de la BF (en solution dans du dimethylformamide (DMF), 10% final) et du DMAOH à une concentration de 1 g/L. Différents paramètres ont été étudiés afin de proposer une première synthèse de TB *in vivo*, pertinente et prometteuse. Pour ce faire, nous avons fait varier différents paramètres tels que :

- la nature de la phosphatase utilisée native ou mutée (PhoNse ou PhoNse (V78L),
- la nature du milieu de culture LB ou TB
- la température de la phase post-induction fixée à 25, 30 ou 37°C et la vitesse d'agitation associée égale à 160 ou 200 rpm,
- la densité optique à laquelle l'induction est réalisée 1/1,5/2/2,5
- le moment d'ajout des substrats après induction 0/0,5/1/2 h
- le solvant utilisé pour la mise en solution de la BF éthanol/dioxane/DMF/DMSO

^{*}Pour rappel, les conditions de cultures sont les suivantes : milieu LB, 37°C, 200 rpm, induction à DO_{600} = 2 par IPTG 1mM, 37°C, 200 rpm, 24 h.

• l'addition ou non de glycérol (source de carbone).

La présence de TB dans le milieu de culture est estimée par suivi cinétique en CCM, sur silice, mais également par HPLC, à l'identique de ce qui a été fait dans les expériences in vitro. Nous avons pu observer la production de TB après 24 h, quelle que soit la souche recombinante considérée, et avons pu mettre en évidence que cette production est associée à l'introduction des constructions génétiques dans E. coli. En effet, la souche non recombinante (contrôle) ne produit pas de TB; de ce fait nous avons validé l'applicabilité de ce projet de mini-voie in vivo. La démarche engagée est identique à celle suivie in vitro avec le souhait d'atteindre une conversion totale dans un intervalle de temps limité à 24 h. Ainsi, il a été possible d'identifier les paramètres déterminants comme étant : PhoNse(V78L)/LB/37°C/200 rpm/DO₆₀₀ induction = 2/ajout des substrats lors de l'induction/ en présence de glycérol. Toutes ces conditions ont ensuite été appliquées lors d'un nouvel essai conduisant à une conversion totale de la BF en 24 h. Une montée en échelle à été faite et correspond à une synthèse de la TB à partir d'une solution de BF et de DMAOH à 1 g/L dans 100 mL de milieu de culture LB, toutes choses ayant été proportionnellement adaptées par ailleurs. A l'issue des 24 h d'incubation, après extraction et purification, 86 mg de TB sont obtenus correspondant à un rendement en produit isolé égal à 63 %. Ce rendement est dépendant des étapes d'extraction et de purification qui sont identiques à celles pratiquées dans le cadre des essais in vitro. En considérant comme point de départ une conversion totale de la BF, une perte de produit est envisagée pouvant avoir lieu in vivo par dégradation et/ou lors des étapes de traitement post-culture. La TB a ainsi été incubée durant 24 h dans les conditions de réaction précédemment décrites révélant une perte considérable (autour de 50 % à 24 h) de ce composé soit par dégradation suite à une instabilité dans les conditions réactionnelles fixées, soit à la suite d'une métabolisation par E. coli. La dégradation liée aux conditions réactionnelles est une hypothèse qui peut être invalidée puisque non observée lors des essais in vitro également conduit à 37 °C bien qu'une vitesse d'agitation considérablement plus élevée ait été appliquée.

CONCLUSION

La mini-voie de biosynthèse artificielle des terpènes (MVT) que nous proposons utilise les alcools DMAOH et IOH en lieu et place du glucose permettant à la fois de minimiser le nombre d'étapes catalytiques nécessaires à l'obtention du DMAPP et de l'IPP, précurseurs universels de tous les terpènes, et également de découpler les sources d'énergie et de carbone lors d'une synthèse *in vivo*. Le choix de ces terpénols n'est pas anodin puisque basé d'une part sur la similarité structurale qu'ils partagent avec les composés ciblés DMAPP et IPP obtenus ainsi par deux étapes de phosphorylations et d'autre part sur leur production à l'échelle industrielle à faible coût et pouvant être biosourcée.

Une analyse de la littérature a permis de cibler deux classes d'enzymes comme sources de catalyseurs potentiels pour conduire ces phosphorylations : *i*) les phosphatases acides non spécifiques (NSAPs) pour leur capacité également à catalyser des réactions de transphosphorylation sur des alcools primaires en présence d'ATP et *ii*) les isopentényl phosphate kinases (IPK) Mg²⁺/ATP dépendantes naturellement impliquées dans la conversion de l'IP en IPP. La stratégie d'identification de ces catalyseurs a reposé sur un criblage à haut débit de NSAPs et d'IPKs d'origines procaryotiques catalysant les réactions correspondantes à partir soit de DMAOH soit de DMAP, respectivement. Nous avons opté pour des catalyseurs capables de fonctionner à pH égal à 7 et à 37°C, conditions permettant d'envisager également une mise en place *in vivo* au sein de la bactérie modèle *E. coli*. Une application *in vitro* nécessite aussi de cribler les catalyseurs utilisant le même agent phosphorylant, ici choisi comme étant l'ATP, et dont l'expression protéique est suffisante dans *E. coli*. A l'issue de ce criblage, la phosphatase acide de *Xanthomonas translucens* (PhoN_{Xt}) ainsi que l'IPK de *Methanococcus vannielii* (IPK_{Mv}) ont été sélectionné pour une application *in vitro* de la mini-voie.

Afin de démontrer la faisabilité de la MVT, nous avons souhaité développer une preuve de concept sur la base d'une cascade enzymatique la plus courte possible et conduisant à à la TB, composé valorisable car présentant une activité cytotoxique envers différentes lignées cellulaires cancéreuses. La prényl transférase fongique FtmPT1_{Af} est caractérisée et décrite comme catalysant majoritairement la prénylation en position C₂ du noyau indole de la dicétopiperazine BF en présence de DMAPP, conduisant à l'obtention de TB meroterpénoïde naturel.

La mise en place de la mini-voie couplée à la prényl transférase FtmPT1_{Af} permet d'envisager l'obtention en trois étapes de la TB à partir de DMAOH et de la BF. Cette preuve de concept a été développée *via* une approche séquentielle pour une meilleure compréhension du système à trois enzymes et un affinement étape par étape du rapport molaire entre substrats, des quantités relatives de catalyseurs et de co-substrat. Cette démarche a révélé que l'étape de phosphorylation du DMAOH, impliquant PhoN_{Xt}, influence considérablement la cinétique globale de notre système catalytique avec une conversion non totale en 24 h, jusqu'alors atteinte en 1 h avant ajout de la première enzyme de la cascade PhoN_{Xt}. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que la double activité de la phosphatase acide ainsi que la concentration élevée en ATP, générant de l'ADP responsable de l'inhibition de nombreuses kinases, pouvaient limiter l'avancement de la cascade. Une étude cinétique par RMN ³¹P nous a permis de mettre en évidence que la phosphatase hydrolyse l'ensemble des composés phosphorylés (DMAP/DMAPP/ATP/ADP/AMP/PEP) intervenant dans la cascade en 6 h et ce dans un système simplifié à une seule enzyme en présence d'un substrat. Il est ainsi possible que les cinétiques de dégradation observées ne soient pas représentatives de la situation au sein de la cascade, car négligeant les interactions et liens entre les différents composants, mais ces données confirment une nouvelle fois la double activité de cette famille d'enzymes. Cette hydrolyse est dans notre cas une réaction secondaire complexifiant la démarche d'optimisation engagée, en réduisant potentiellement les quantités de DMAP/DMAPP/ATP indispensables au bon fonctionnement de la cascade. Nous avons noté qu'il est également envisageable que l'ATP puisse être régénéré à partir d'ADP et d'AMP in situ supposant une compétition avec le DMAOH quant à l'accès au groupement phosphate au sein du site actif de l'enzyme. Cela implique ainsi le besoin de se placer à des quantités d'ATP au delà des quantités stoechiométriques afin de s'assurer de la disponibilité suffisante de ce co-substrat indispensable à PhoN_{xt} et à l'IPK_{Mv}.
La mise en place du système de recyclage de l'ATP (ATP 4 mM/PEP 40 mM) in situ à partir d'ADP et faisant intervenir le couple PK/PEP a été décidée afin de répondre à ces problématiques et de ne pas générer d'ADP et d'AMP libres, limitant ainsi également le risque de compétition avec notre substrat d'intérêt et les risque d'inhibition de l'IPK_{Mv}. Le recours à un plan factoriel complet 2³ a permis d'évaluer sur deux niveaux l'influence de trois facteurs, sélectionnés en vue de favoriser la réaction de transphosphorylation, et de maximiser le rendement final de la cascade en TB. Il est ressorti de cette étude que seul l'effet d'interaction entre la concentration en substrat DMAOH et la quantité de la dernière enzyme de la cascade FtmPT1_{Af} influence de façon significative la cinétique globale de la réaction. Dans le but de conduire à un taux de conversion maximal, la concentration en DMAOH doi être fixée à 30 mM et la quantité de prényl transférase à 0,21 U. Dans ce contexte, l'effet de la variation de la quantité de PhoNxt n'est pas apparu comme significatif pour le taux de conversion observé, ni dépendant d'autres facteurs. Cependant, en changeant d'approche et en se focalisant non plus sur un point final mais davantage sur la cinétique réactionnelle dans sa globalité, PhoN_{xt} s'est avérée influer de façon significative la vitesse initiale de réaction, une quantité plus élevée conduisant à 45 % de conversion de la BF en seulement 1 h de réaction.

Nous avons préféré minimiser la quantité de ce catalyseur par souci d'économie lors de l'étape de production et avons, par la suite, engagé une optimisation, sur la base des conditions déterminées par le plan d'expériences, centrée sur la disponibilité d'ATP en cours de réaction. La mise en place d'un système de régénération d'ATP à 40 mM et l'ajout d'ATP à instants fixes a permis d'atteindre 100 % de conversion en moins de 24 h et nous offre ainsi un système catalytique en trois étapes conduisant à l'obtention de TB à l'échelle de 10 mM, mais également pour la première fois à une échelle de 100 mg *in vitro*. L'approche *in vitro* présente l'avantage de mieux comprendre le système catalytique ainsi construit et de pouvoir par la suite transposer les ajustements réalisés au développement *in cellulo*. Concernant l'accès *in vivo*, la MVT conduite à l'échelle préparative a permis d'atteindre une concentration en TB de l'ordre de 800 mg/L ; par comparaison les travaux de Maiya et collaborateurs au sein d'*Aspergillus nidulans* ont conduit en moyenne à 220 mg/L de TB à partir de BF synthétisée *in cellulo*³⁴³.

Nous proposons donc ici une alternative biosynthétique d'accès à la TB, alcaloïde indolique dérivé de la dicétopipérazine BF, intéressante en comparaison des synthèses chimiques existantes³³³⁻³³⁵. Pour exemple, Huisman et collaborateurs³³³ proposent récemment une synthèse asymétrique optimisée en six étapes à partir de gramine et conduisant à la TB avec un rendement global de 35 %. Bien que cette synthèse s'inscrive dans une démarche économique en terme d'étapes et de coût des réactifs, elle implique l'utilisation de solvants organiques (tetrahydrofurane, dichlorométhane, chloroforme...), de conditions plus dures de température (0 °C, - 78 °C, 250 °C) et de pH, d'étapes de purification intermédiaires. Par comparaison, la MVT offre l'avantage d'une synthèse « one-pot » en solution aqueuse qui minimise le nombre d'étapes à trois et le temps de réaction à moins de 24 h dans des conditions de pH et de température plus « douces » (pH proche de la neutralité, température égale à 37°C). Elle permet de se défaire des éventuelles purifications d'intermédiaires et génère comme seul sous produit du pyruvate.

De plus, il est possible d'envisager, *via* la mini-voie, la synthèse de divers alcaloïdes indoliques dérivés de dicétopiperazine grâce à la propension de FtmPT1_{Af} à accepter différents dipeptides cycliques contenant un résidu tryptophane¹⁷⁵, cette capacité étant intimement liée à la conformation ouverte du site actif¹⁵⁶. Il s'agit là d'une perspective révélant tout l'intérêt de ce type de voie de biosynthèse artificielle pour la production facilitée de composés à activités biologiques potentielles. Le remplacement de FtmPT1_{Af} par une autre prényl transférase étendrait le domaine d'application de la mini-voie et offre potentiellement accès à une large gamme de composés prénylés naturels¹⁵⁶ et nonnaturels sur la base de la promiscuité de substrats caractérisant ces enzymes. Enfin, le recours à une enzyme supplémentaire nommée FtmPS catalysant chez *A. fumigatus* la synthèse de la brévianamide F à partir de L-proline et de L-tryptophane³⁴⁴ rendrait la mini-voie 2.0 encore plus intéressante, et indépendante de synthèses chimiques, exception faite pour les alcools en C₅.

D'une manière plus générale, le développement d'une mini-voie à partir des alcools en C₅, permet de contourner le métabolisme natif en découplant la croissance cellulaire et la biosynthèse des isoprénoïdes. De plus, le nombre réduit d'étapes et donc de catalyseurs suscite un intérêt grandissant autour de ces alternatives biosynthétiques et permet d'envisager l'utilisation des méthodes d'ingénieries métabolique et enzymatique, auxquelles nous n'avons pas eu recours, offrant une marge d'amélioration/d'optimisation considérable de notre procédé. De plus, une grande diversité de produits peut être obtenue *via* la MVT basée sur la promiscuité de substrats que présentent par exemple certaines kinases. Ainsi, Lund et collaborateurs ont publiés très récemment une étude révélant la capacité de l'IPK_{Ta} à produire une vingtaine de monophosphates prénylés non-naturels³⁴⁵.

Chapitre III 🥌

Chapitre III Applications de la MVT

Α.	LA MINI-VOIE DES TERPENES 2.0	165			
Ι.	ThiM, l'enzyme clé de la MVT	166			
a	. Généralités	166			
b	Données structurales	167			
c.	La kinase de prénol ThiM _{Ec}	169			
П.	. Production optimisée de TB				
a	Production hétérologue de ThiM _{Ec}				
b	. La mini-voie 2.0	173			
c.	Synthèse de terpénoïdes non-naturels	178			
В.	LA MVT POUR LA PRODUCTION DE SESQUITERPENES NATURELS	185			
Ι.	Une nouvelle cascade pour la production de FPP	185			
a	Méthode d'analyse pour la quantification du FPP produit	187			
b	. Adaptation de la MVT 2.0 à la synthèse de FPP	187			
1.	PREMIERES SYNTHESES EXPLORATOIRES	187			
Ш.	CRIBLAGE DE FACTEURS INFLUENÇANT LA SYNTHESE DE FPP	189			
II.	Identification de nouvelles sesquiterpène synthases fongiques, l'exemple de L. menziesii	197			
a	Les sesquiterpène synthases de L. menziesii	198			
Сол	Conclusion				

Au cours des travaux précédemment décrits, nous avons validé l'approche imaginée, reposant sur la mise au point d'une mini-voie biosynthétique efficace, économique et inscrite dans une démarche « verte » pour l'obtention de terpénoïdes. En effet, nous avons montré qu'il était possible de produire les précurseurs IPP et DMAPP à partir d'alcools biosourçables *via* l'action de la phosphatase acide PhoN_{Xt} et de la kinase IPK_{Mv}, en lieu et place des dix-huit enzymes qu'impliquent les voies du MEP et du MVA, à partir du glucose.

Ce troisième et dernier chapitre a pour objectif de décrire les différentes applications de la mini-voie des terpènes (MVT) que nous avons engagées, consistant en son utilisation pour l'obtention de terpénoïdes naturels et non-naturels et le criblage de nouvelles terpènes synthases *via* différentes cascades *in vitro*.

A. LA MINI-VOIE DES TERPENES 2.0

Pour rappel, parmi les différentes expériences conduites lors du plan d'expérience visant à améliorer la MVT appliquée à la synthèse de TB, nous avions noté que la phosphatase acide non spécifique PhoN_{xt} n'influencait pas significativement le taux de conversion final / le rendement en TB, mais davantage la cinétique de la réaction au cours des premières heures. Cela suppose que cette phosphatase représente toujours un élément clé pour améliorer la MVT.

Ainsi, la publication des travaux de Yakunin, en 2018, a particulièrement retenu notre attention du fait qu'ils décrivent la capacité de ThiM, kinase d'*E. coli* agissant sur l'hydroxyéthylthiazole (Figure 94), à catalyser la phosphorylation du DMAOH³⁴⁶. Sur la base de ces travaux, nous avons donc remplacé la première enzyme de la mini-voie PhoN_{xt} par ThiM_{Ec}, en nous servant de notre réaction de référence de prénylation de la BF en TB.

I. ThiM, l'enzyme clé de la MVT

a. Généralités

L'hydroxyéthylthiazole kinase ThiM_{Ec} (ID Uniprot : P76423, EC 2.7.1.50) a été identifiée en 1989 par Mizote et Nakayama chez E. coli (souche K12) comme étant dotée d'une activité hydroxyéthylthiazole kinase en présence du cation divalent Mg²⁺ et d'ATP ^{347–349}. Elle catalyse, dans le cytosol, la phosphorylation de la fonction alcool primaire du 4-méthyl-5-β-hydroxyéthylthiazole (Thz) intervenant dans la voie de biosynthèse du cofacteur thiamine diphosphate (ThDP)³⁴⁸ (Figure 94). Ce dernier est un élément clé pour de nombreuses enzymes impliquées dans diverses voies métaboliques telles que la pyruvate déshydrogénase (à l'origine de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA, étape liant la glycolyse au cycle de Krebs), l'α-cétoglutarate-déshydrogénase (cycle de Krebs), et la déoxyxylulose phosphate synthase (voie du MEP, Chapitre IB.I.b) parmi de nombreuses autres³⁵⁰.



Figure 94 : Biosynthèse du cofacteur ThDP, d'après Mihara et *al.* (Tani *et al.*, 2016).

D'une façon identique à celle décrite précédemment (Chapitre IA.II.c.i), nous avons pu estimer les caractéristiques de ThiM_{Ec} native à partir de la séquence protéique obtenue sur Uniprot, composée de 262 résidus d'acides aminés (Figure 95, Tableau 12)^{*}.

^{*} Dans le cas de cette enzyme, du fait qu'elle soit native d'*E. coli* et cytosolique, les paramètres permettant de prédire sa solubilité dans ce microorganisme ne sont pas indiqués.

Caractéristiques			
Masse moléculaire (kDa)	27,339		
pHi	5,58		
Proportion d'acides aminés aromatiques	Trp:3		
	Tyr : 2 > soit 4,6 %		
	Phe : 7		
Proportion de cystéines	6 soit 2,3 %		
Profil d'hydropathie (GRAVY)	0,223		

Tableau 12 : Caractéristiques prédites à partir de la séquence en acides aminés de ThiM_{Ec}.

b. Données structurales

A ce jour, la structure de cette enzyme d'*E. coli* n'a pas été élucidée ainsi les informations suivantes sont basées sur les différents travaux décrivant les structures des enzymes équivalentes de *Bacillus subtilis*³⁵¹ (ID PDB : 1C3Q), *Klebsiella pneumoniae*³⁴⁹ (ID PDB : 6K28) et *Staphylococcus aureus*³⁵² (ID PDB : 5COJ). Quelle que soit l'enzyme considérée, elle adopte une architecture trimérique stabilisée par des liaisons hydrogène entre deux monomères. Au sein de chaque monomère, les hélices α et les brins β forment un repliement global de type « sandwich $\alpha\beta\alpha$ »³⁴⁹. Trois sites actifs sont donc disponibles pour la fixation d'une molécule d'ATP, d'un ion Mg²⁺ et d'une molécule de Thz (substrat naturel)³⁵¹. Les sites actifs sont situés à l'interface de sous-unités adjacentes, où vient se fixer le Thz *via* des résidus d'acides aminés conservés (encadrés en magenta sur la Figure 95 chez *B. subtilis*).



Figure 95 : Structures tertiaire et quaternaire de ThiM de B. subtilis (Campobasso et al., 2000) et alignement des séquences primaires de ThiM d'E. coli et de B. subtilis (Tani et al., 2016). La structure quaternaire de ThiM permet de visualiser le repliement global de type « sandwich $\alpha\beta\alpha$ » et le site actif accueillant le substrat naturel Thz (magenta) et l'ATP (jaune). Les résidus d'acides aminés impliqués dans la fixation du Thz et de l'ATP, chez B. subtilis, sont identifiés par le même code couleur sur l'alignement de séquence. L'ion Mg²⁺ est coordiné par trois résidus i.e. l'aspartate 94, le glutamate 126 et l'arginine 121.

Le substrat Thz est stabilisé par une liaison hydrogène avec un résidu méthionine, d'une première sous-unité (Met₄₅ chez *B. subtilis*, Met₅₀ chez *E. coli*, Met₃₉ chez *S. aureus* et Met₄₉ chez *K. pneumoniae*)^{349,351}. Une seconde liaison hydrogène est observée entre un résidu cystéine de la sous-unité adjacente (Cys₁₉₈ chez *B. subtilis*, Cys₂₀₁ chez *E. coli*, Cys₁₉₀ chez *S. aureus* et Cys₂₀₀ chez *K. pneumoniae*) et l'hydroxyle terminal du Thz. L'ATP est, quant à lui, imbriqué dans un réseau de liaisons hydrogène *via* les oxygènes portés par le phosphate γ (phosphate terminal). Ces liaisons impliquent les résidus Arg₁₂₁, Thr₁₆₈, Gly₁₉₇ et Cys₁₉₈ (encadrés en jaune sur la Figure 95) chez *B. subtilis* équivalent aux résidus Arg₁₂₅, Thr₁₇₁, Gly₂₀₀ et Cys₂₀₁ chez *E.coli*^{349,351}. Enfin, l'ion Mg²⁺ est maintenu, au sein du site actif, par trois résidus de type aspartate, glutamate et arginine ou lysine selon l'enzyme considérée (Figure 96).



Figure 96 : Sites de fixation du substrat Thz des hydroxyéthylthiazole kinases de *K. pneumoniae, B. subtilis* et *S. aureus,* **figure adaptée de la publication de Chen** *et al.,* **2019.** *Les résidus équivalents chez E. coli sont : Asp99, Arg125, Glu130 pour la coordination du Mg²⁺ ; Met50 et Cys201 liant le Thz par des liaisons hydrogène.*

Concernant le mécanisme réactionnel, Campobasso *et al.* suggèrent que le résidu cystéine joue le rôle de base en déprotonnant le groupement hydroxyle du Thz, permettant ainsi l'attaque de l'oxygène sur le phosphate terminal de l'ATP. Le transfert de groupement phosphate, de l'ATP vers le Thz, est médié par le cation Mg²⁺, qui semble être également coordiné par les oxygènes des phosphates β et γ de l'ATP³⁵¹.

c. La kinase de prénol ThiM_{Ec}

En 1999, Lange et Croteau révèlent que des lysats de cellules d'*E. coli* partiellement purifiés présentent une activité kinase sur le prénol DMAOH³⁵³. C'est avec les travaux de Yakunin et collaborateurs, en 2018, que cette activité kinase est associée à la présence de ThiM dans le cytosol d'*E. coli*³⁴⁶. Pour parvenir à cette conclusion, ils ont étudié la biosynthèse de cofacteurs flaviniques prénylés, indispensables à l'activité des décarboxylases de la famille des UbiD. Ces dernières sont impliquées dans la biosynthèse de l'ubiquinone et nécessitent la présence d'un cofacteur flavine mononucléotide (FMN) sur lequel est ajouté un groupement prényle issu du DMAP. A cette occasion, les auteurs ont révélé deux possibilités de biosynthèse du DMAP au sein d'*E. coli*. La première implique des hydrolases NUDIX^{*346} et particulièrement NudF²⁷⁹, une ADP-ribose diphosphatase, dont le rôle est de transformer le DMAPP en DMAP.

^{*} Ces hydrolases catalysent des réactions d'hydrolyses de désoxyribonucléosides triphosphates (dNTPs) tels que l'ATP, GTP mais également de dNTPs oxydés, de polyphosphates non nucléosidiques...Elles sont conservées dans toutes les espèces et leur(s) rôle(s) biologiques sont peu connus. Elles sembleraient être impliquées dans l'élimination de métabolites délétères tels que les dNTPs oxydés, régulant ainsi l'homéostasie cellulaire³⁵⁴.

La seconde a été associée à la présence de l'hydroxyéthylthyazole kinase ThiM_{Ec} suite à des expériences portant sur l'incubation de lysats cellulaires d'*E. coli,* en présence de DMAOH, d'ATP et d'un cofacteur flavinique. La détection d'une absorbance à 550 nm et la coloration rougeâtre de la solution de lysat révèlent la formation du cofacteur FMN prénylé, et de ce fait la phosphorylation du DMAOH en DMAP par la suite transféré sur le FMN. De plus, ThiM présente une activité comparable, *in vitro*, en présence d'ATP et de Mg²⁺ vis-à-vis du DMAOH et de son substrat naturel ThZ. L'affinité de ThiM pour le prénol est cependant inférieure à celle observée dans le cas du Thz (14 mM *vs.* 2,0 mM, respectivement)³⁴⁶.

A partir de ces observations et sur la base des résultats obtenus en fin de chapitre précédent (Chapitre IB.II.d), nous avons souhaité remplacer la NSAP de *X. translucens* à l'origine de nombreuses étapes de mise au point, dans le cadre de la synthèse de TB à partir de BF et de DMAP. Pour rappel, nous avions conduit un plan d'expériences suite à la mise en évidence de l'activité hydrolytique de PhoN_{Xt}, sur l'ensemble des mono- et diphosphates intervenant dans la cascade enzymatique. Suite à ce plan d'expériences et à la modification du système de recyclage de l'ATP, nous avions validé une conversion totale de la BF en TB en moins de 24 h et avions également noté que la quantité de PhoN_{Xt} influence la cinétique de la réaction dans les premières heures. En effet, multiplier par trois la quantité de PhoN_{Xt} permettait d'atteindre 45 % de conversion en une heure de réaction, en lieu et place des 24 % initiaux, toutes choses étant égales par ailleurs (Figure 91, p150). Bien que cette condition ne conduise pas à une conversion totale en 24 h, elle suggère que PhoN_{Xt} demeure un élément critique dans notre cascade enzymatique et que son remplacement par ThiM_{Ec}, véritable kinase, pourrait améliorer la MVT.

II. Production optimisée de tryprostatine B

a. Production hétérologue de ThiM_{Ec}

Afin d'apprécier l'influence du changement de la première enzyme de la MVT, nous avons intégré ThiM_{Ec} dans la cascade visant à produire la TB, système de référence dans le cadre de ces travaux de thèse. Pour cela, nous avons utilisé *E. coli* comme hôte pour la surexpression de ThiM_{Ec} sous la forme d'une protéine possédant une étiquette hexahistidine en position C-terminale^{*}. Cette dernière permet la purification de ThiM_{Ec} par chromatographie d'affinité[†]. Des tests de production de l'enzyme taguée ont été conduits en faisant varier uniquement la température d'incubation après induction (16 °C, 25 °C, 37 °C) et la nature du milieu de culture (LB ou TB)[‡]. La Figure 97 présente le profil d'expression établi par analyse électrophorétique SDS-PAGE, de ThiM_{Ec} en milieu LB (gauche) et en milieu TB (droite) lorsque l'incubation post-induction (IPTG 1 mM, $DO_{600} = 0.5$) est conduite à 16, 25 ou 37 °C[§]. Les profils d'expression et de purification obtenus sont en accord avec la masse moléculaire théorique de ThiM_{Ec}, estimée à 27,3 kDa.

^{*} Véronique de Berardinis et Jean-Louis Petit ont fourni la construction génétique correspondante.

[†] Les détails concernant la construction génétique et les conditions expérimentales de production et de purification et de détermination de l'activité kinase sont donnés dans la partie 1.1, p183 du matériel et méthodes.

[‡] Du fait des nombreuses autres enzymes produites dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons fixé les paramètres à tester en fonction des paramètres de culture des autres enzymes à produire, limitant ainsi les contraintes techniques liées à la production dans différentes conditions (disponibilité des incubateurs, durée d'induction compatibles...).

[§] Les tests d'expression et la production (fermenteur) ont été réalisé en collaboration avec Elise Courvoisier-Dezord (IE), responsable technique de la plateforme Analyse et Valorisation de la Biodiversité (AVB).



S M. Billes P1

NI

 P_2



D'après la figure ci-dessus, le profil d'expression de ThiM_{Ec} révèle une production conséquente dans le cas d'une culture en milieu TB et d'une induction à 25 °C entre 3 et 5 h. Nous avons de fait produit cette kinase, que ce soit pour la production en flasques ou en fermenteur (production engagée dans le cadre de synthèse à l'échelle préparative nécessitant une quantité importante d'enzyme et donc de biomasse), dans le milieu de culture TB et durant une phase d'induction de 5 h, à 25 °C. Ce choix est réalisé en accord avec notre volonté d'identifier dans le cas de synthèses enzymatiques *in vitro*, les conditions permettant l'accès à la plus grande quantité de biocatalyseur, souvent facteur limitant. ThiM_{Ec} a été purifiée à l'identique des autres enzymes utilisées dans ces travaux de thèse i.e. par une première étape de chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA, *via* l'étiquette hexahistidine à l'extrémité C-terminale. L'étape suivante permettant le dessalage et l'échange de tampon conduit à une protéine purifiée, dont l'activité kinase a été quantifiée sur l'IOH et le DMAOH *via* le test spectrophotométrique impliquant le couple pyruvate kinase/lactate déshydrogénase (sections expérimentales 1.1.4/p217 et 1.2.3/p229).

En moyenne, l'activité kinase de ThiM sur l'IOH est trois fois supérieure à celle sur le DMAOH, dans les mêmes conditions, à savoir égale à 0,071 ± 0,017 U/mg et 0,022 ± 0,004 U/mg*, respectivement. Il est possible que cette différence notable d'activité soit due à la position terminale de la double liaison dans l'IOH, mimant davantage le substrat naturel Thz. En effet, l'état d'hybridation sp2 des carbones, impliqués dans la double liaison terminale, confère une géométrie plane et une rigidité retrouvée au niveau du cycle thiazole du Thz.

Ainsi, du fait de l'activité kinase de ThiM_{Ec} et de sa capacité avérée à convertir le DMAOH en son dérivé monophosphate (DMAP) *in vivo*³⁴⁶, elle est un catalyseur de choix pour le remplacement de la PhoN_{Xt} dans la MVT. En effet, l'ambivalence de la phosphatase acide a été à l'origine de nombreuses mises au point de la mini-voie (objet du Chapitre II). Nous avons démontré, même en présence d'un système de recyclage maintenant des concentrations *in situ* en ATP au moins égales à 40 mM suite au plan d'expériences, qu'elle impactait toujours, et de manière considérable, la cinétique initiale de la cascade conduisant à la TB.

b. La mini-voie 2.0

L'introduction de ThiM_{Ec} dans la mini-voie, en lieu et place de la phosphatase acide non spécifique PhoN_{Xt}, permettrait de se défaire des contraintes liées à la double activité de cette enzyme, kinase de prénol d'une part et phosphatase d'autre part. De la même façon que nous avons validé la preuve de concept de la mini-voie par la cascade à trois enzymes permettant la synthèse de TB, nous avons étudié l'effet de l'introduction de ThiM_{Ec} sur la cinétique de cette réaction (Figure 98).

^{*} Ecart-type basé sur trois mesures d'activité dans le cas de l'IOH et sur vingt mesures dans le cas du DMAOH (substrat utilisé comme référence pour la détermination de l'activité kinase de Thi M_{Ec} à l'issue de chaque purification).



Figure 98 : Mini-voie des terpènes 2.0 et cascade enzymatique à trois étapes conduisant à la conversion de la brévianamide F en tryprostatine B, dont chaque étape est respectivement catalysée par la kinase Thi M_{Ec} , l'IPK_{Mv} et la prényl transférase FtmPT1_{Af}.

Il est cependant envisageable de minimiser les quantités d'ATP et d'alcool utilisées puisqu'elles avaient été augmentées, lors de l'optimisation, afin de limiter la réaction de déphosphorylation catalysée par PhoN_{Xt}. En réponse à cette hypothèse, nous nous sommes basés sur les conditions expérimentales ayant initié le développement et la mise au point de la MVT* (Chapitre II, p130) et avons donc réalisé des essais à petite échelle (tubes Eppendorf®) en se focalisant sur la nature de l'apport (avec ou sans recyclage) et la quantité d'ATP pour que les deux kinases ATP-dépendantes puissent fonctionner de concert. Brièvement, les essais consistent en une base commune dont la composition est donnée dans le Tableau 13, la quantité d'enzyme utilisée étant fixée uniformément à 0,2 U.

Nous avons conduit un essai en absence de recyclage, en fixant la concentration en ATP à 40 mM (pour conduire les deux phosphorylations ATP-dépendantes), et avons étudié l'influence de la variation du rapport molaire PEP/ATP, en veillant à maintenir au moins deux équivalents de PEP.

 $^{^{*}}$ BF 10 mM, DMAOH 20 mM, ATP 40 mM, DMSO 10 %.

Composé	Concentration de travail/ Unités enzymatiques	Variantes autour du système de recyclage			
Brévianamide F (solution dans le DMSO)	10 mM				
DMAOH (solution dans le DMSO)	20 mM	 (A) PEP 40 mM/ATP 4 mM (B) PEP 30 mM/ATP 10 mM + PK 			
Enzymes • ThiM _{Ec} • IPK _{Mv} • FtmPT1 _{Af}	0,2 U 0,2 U 0,2 U	(C) PEP 20 mM/ATP 20 mM			

Tableau 13 : Conditions testées pour le développement de la MVT en présence de ThiMEc.

Le suivi cinétique de chacune des ces expériences a été réalisé par CCM sur silice (données non montrées)*, suite à des prélèvements à 0/1/2/4/7/10 h. Cette analyse qualitative a révélé que le système de recyclage est la méthode la plus efficace pour atteindre une conversion totale en moins de 4 h. En effet, quelque soit le rapport PEP/ATP considéré, la totalité de la BF semble être convertie en TB en moins de 4 h. En comparaison, l'essai conduit en absence de recyclage avec un apport de 40 mM d'ATP en début de réaction ne permet pas d'atteindre une conversion complète dans cet intervalle de temps (conversion totale estimée entre 4 et 7 h de réaction). Parmi les conditions de recyclage testées, le rapport molaire 1 pour 10 en faveur du PEP (PEP 40 mM/ ATP 4 mM) permet d'atteindre 100 % de conversion en environ 2 h. Il semblerait également que plus le rapport PEP/ATP est grand et plus rapide est la conversion, le rapport équimolaire PEP/ATP étant la condition moins favorable.

Nous avons une nouvelle fois confirmé l'utilité d'un système de recyclage dans le cadre de cette mini-voie, limitant ainsi les phénomènes connus d'inhibition par l'ADP de kinases ATP-dépendantes^{73,338,355} comme tel est le cas de Thi M_{Ec} et IPK_{Mv}^{73,256,257}. De plus, bien qu'il soit impossible de comparer réellement l'expérience ayant conduit ici à une conversion totale en 2 h, avec l'un des essais présentés dans le chapitre précédent, ce résultat confirme le pouvoir limitant de PhoN_{xt} sur la cascade.

^{*} Eluant : 9/1 acétate d'éthyle/méthanol ; révélateur *p*-anisaldéhyde.

Ainsi, l'intégration de ThiM_{Ec} dans la mini-voie, appliquée à la synthèse de TB, a permis de réduire d'un facteur 10 la durée de réaction précédemment établie comme optimale (plan d'expériences et mise au point du système de recyclage, Chapitre IB.I.b.ii, p124) passant ainsi de 20 h, lorsque PhoN_{Xt} est intégrée dans la cascade enzymatique optimisée, à 2 h simplement en ayant interverti cette première enzyme limitante. De ce fait, nous retrouvons l'intervalle de temps observé lors du développement séquentiel de la cascade de référence permettant la prénylation de la BF en TB (avant ajout de PhoN_{Xt}, Chapitre IB.I.b.ii).

Sur la base de cette série d'expériences conduites en Eppendorf[®], nous avons réalisé un suivi cinétique quantitatif par analyse en HPLC^{*} de prélèvements à 0/0,5/1/2/4 et 6 h. Nous avons réitéré l'essai impliquant le système de recyclage PEP 40mM/ATP 4 mM à l'identique et tenu à le comparer au système dont l'apport en ATP est réalisé par un seul ajout en début de réaction afin d'illustrer l'intérêt de recycler l'ATP *in situ* (Figure 99).



Figure 99 : Cinétiques de conversion de la brévianamide F en tryprostatine B, catalysées par ThiM_{Ec}, IPK_{Mv} et FtmPT1_{Af}, en présence (courbe orange) et en absence (courbe violette) de recyclage d'ATP *in situ*.

^{*} HPLC en phase inverse, colonne Macherey-Nagel de type Nucleodur C18-Gravity-SB (100 mm x 2 mm, 1,8 mm) chauffée à 50°C. L'éluant consiste en un mélange 6/4 eau/méthanol délivré avec un débit de 0,3 mL/min.

Les cinétiques résultantes permettent de confirmer les observations faites par analyse en CCM sur silice. En effet, le système de recyclage PEP 40 mM/ATP 4 mM conduit à une conversion complète en 1h de réaction, là où une concentration initale en ATP égale à 40 mM ne permet de convertir que 40 % de la BF, indiquant qu'une limitation est levée lorsque la concentration en ATP est maintenue faible et constante et que l'accumulation de l'ADP est évitée.

La montée en échelle à partir de 10 mM en BF (50 mg) a été conduite pour l'expérience impliquant le système de recyclage PEP 40 mM/ATP 4 mM^{*}, cette dernière a permis d'obtenir après extraction et purifcation 58,4 mg de TB, soit un rendement en produit isolé égal à 92 %. Une analyse par RMN a permis de confirmer la synthèse de TB comme unique produit de réaction.

Les expériences précédentes ont permis de mettre au point une nouvelle version de la MVT, grâce au remplacement de la phosphatase PhoN_{Xt} par la kinase ThiM d'E coli. Cette version 2.0 de la mini-voie a permis de supprimer l'effet délétère de la double activité de la NSAP sur la cinétique de la réaction de synthèse de la TB en trois étapes. En effet, nous avons été en mesure de convertir totalement la BF (10 mM) lorsque ThiM_{Ec} est la première enzyme de la cascade et qu'un système de recyclage PEP 40 mM/ATP 4 mM est mis en place. Ces conditions ont conduit à une amélioration considérable de la mini-voie puisque la conversion est totale en seulement 1 h de réaction, en lieu et place des 20 h nécessaires à la cascade optimisée (plan d'expériences et mise au point du système de recyclage) comprenant PhoNxt, pour l'obtention de TB. De fait, nous proposons à cette étape, une mini-voie de biosynthèse artificielle efficace pour la synthèse en une heure d'un terpénoïde d'intérêt, la TB, en uniquement trois étapes enzymatiques.



^{*} BF 10 mM, DMAOH 20 mM, ATP 4 mM, PEP 40 mM, ThiM_{Ec}, IPKMv et FtmPT1_{Af} : 0,2 U, DMSO 10 % 177

c. Synthèse de terpénoïdes non-naturels

L'idée de la MVT étant de permettre un accès facilité aux terpénoïdes dans leur ensemble mais également d'explorer l'espace chimique de cette famille de composés, nous avons souhaité appliquer la mini-voie à la synthèse de terpénoïdes non-naturels, afin de valider l'objectif initial de ces travaux de thèse et valoriser cette nouvelle alternative synthétique. Pour ce faire, la première étape consiste à introduire des substrats analogues des alcools isopréniques dans la mini-voie appliquée à la synthèse de la TB, notre modèle d'étude.

Nous avons déjà souligné la promiscuité dont plusieurs A-PTases font preuve vis-à-vis du donneur de prényle, lors du chapitre introductif (Chapitre I, p50). En effet, FgaPT2 une autre A-PTase d'*A. fumigatus* est, par exemple, capable de transférer des dérivés du DMAPP de nature cyclique, linéaire ou branchée, sur le résidu tryptophane, avec des taux de conversion supérieurs à 50 %¹⁸⁵(Chapitre I, p50). Ainsi, la probabilité que la prényl transférase aromatique FtmPT1_{Af} puisse également présenter une certaine flexibilité quant au donneur de prényle qu'elle transfère sur la BF, nous permet d'envisager d'autres alcools initiaux dérivés du DMAOH.

De plus, lors de l'étude des IPKs d'archées (*M. thermautrophicus* et *T. acidophilum*), le groupe de Poulter a mis en évidence que les IPKs peuvent également être promiscuitaires³⁵⁵. En effet, ils ont testé la capacité de ces deux IPKs à catalyser la monophosphorylation de différents substrats dérivés de l'IP *i.e.* le DMAP, l'isopentényl thiolophosphate, le 1-butyl phosphate, le 3-buten-1-yl phosphate et le phosphate de géranyle. A l'exception du phosphate de géranyle (monophosphate linéaire à 10 atomes de carbone), l'ensemble des composés testés se sont révélés être substrats des deux enzymes, avec des paramètres cinétiques comparables³⁵⁵ (Figure 100).



Figure 100 : Structures des substrats non-naturels acceptés par les IPKs de *M. thermautrophicus et T. acidophilum,* d'après les travaux du groupe de Poulter (*Chen et al., 2010*).

Le fait que l'hydroxyéthylthiazole kinase d'*E. coli* ThiM soit capable de phosphoryler le DMAOH³⁴⁶ et l'IOH (d'une façon préférentielle pour ce dernier, voir p172) indique qu'elle est également flexible quant aux substrats qu'elle accepte. En prenant en compte l'ensemble de ces informations, nous avons synthétisé des dérivés cycliques du DMAOH *i.e.* le 2-cyclopropylidènéthanol, le 2-cyclobutylidènéthanol et le 2-cyclopentylidènéthanol pour, *in fine,* additionner un cycle à la TB (analogues **A**, **B** et **C**, les synthèses correspondantes sont décrites en partie expérimentale 1.2.2) et étudier l'effet de cet ajout sur les propriétés biologiques des dérivés obtenus (Figure 101).

Notre choix s'est porté sur ces composés du fait qu'ils diffèrent très peu du DMAOH : modification minimale de l'encombrement stérique par ajout d'un ou deux atomes de carbone ou simple cyclisation (dérivé cyclopropyle), absence d'hétéroatome(s) ou d'aromaticité pouvant générer des interactions nouvelles dans le site actif des catalyseurs. Il est donc parfaitement envisageable que ces substrats potentiels soient acceptés par l'ensemble des enzymes intervenant dans la synthèse de la TB.



Figure 101 : Dérivés cycliques de la tryprostatine B envisagés par introduction des alcools cyclopropylidèn-, cyclobutylidèn- et cyclopentylidènéthanol.

Pour cette série d'expériences, nous avons reproduit les conditions expérimentales ayant permis la conversion en 1 h de la BF en TB, à partir du DMAOH^{*}. Nous avons conduit quatre essais, un premier de référence impliquant le DMAOH comme substrat et un essai pour chaque dérivé cyclique. Un suivi cinétique par HPLC, grâce à des prélèvements en cours de réaction, a conduit à l'obtention des cinétiques de conversion de la BF suivantes (Figure 102). La cinétique donnée dans le cas du DMAOH permet de souligner que nous avons conduit deux fois cette synthèse dans les mêmes conditions, mais à partir de deux lots de production de catalyseurs différents (duplicat) et valide ainsi la répétabilité et la fiabilité des résultats observés avec la mini-voie 2.0, pour la prénylation de la BF en TB. Un suivi par CCM a été réalisé afin de confirmer la détection d'un produit analogue de la TB, lorsque la BF est consommée.

^{*} Alcool 20 mM, BF 10 mM, ATP 4 mM, PEP 40 mM, DMSO 10 %, 0,2 U de chaque enzyme.



Figure 102 : Cinétiques de conversion de la brévianamide F en tryprostatine B, à partir du DMAOH (courbe orange), du dérivé cyclobutyle (courbe violette), du dérivé cyclopentyle (courbe bleue) et du dérivé cyclopropyle (courbe verte).

Sur les trois dérivés synthétisés chimiquement, le cyclobutylidènéthanol est le seul alcool permettant de convertir la totalité de la BF, signifiant que le dérivé cyclobutyle, dans une moindre mesure que le DMAOH, est accepté comme substrat par ThiM_{EC}, IPK_{Mv} et FtmPT1_{AF}. La cinétique relative à ce composé indique une bioconversion totale à 24 h, qui, d'après l'allure de la courbe, devrait être totale entre 4 et 8 h. Lorsque le dérivé cyclopentyle est utilisé comme substrat, la conversion de la BF est considérablement ralentie, avec un taux final de conversion autour de 16 %. Dans le cas du cyclopropylidènéthanol, la synthèse d'un analogue de la TB n'est pas observée (HPLC, CCM).

A deux heures de réaction, il est possible de proposer un lien entre la taille du groupement terminal (gem-diméthyle ou cyclique) et la vitesse de conversion de la BF, seule différence notable entre les quatre alcools testés. En effet, la totalité de la BF est convertie lorsque l'alcool utilisé est le DMAOH. Lorsque le cyclobutylidènéthanol est introduit comme substrat dans la cascade, le taux de conversion est alors égal à 57 %. Enfin, dans le cas du dérivé cyclopentylidènéthanol, seuls 12 % de BF sont convertis soit près de cinq fois moins que dans le cas de l'alcool avec un cycle à quatre atomes de carbone.

Ces dérivés cycliques ne diffèrent que par la taille du groupement terminal (gemdiméthyle, cyclopropyle, cyclobutyle, cyclopentyle) puisqu'ils ont en commun une géométrie partiellement plane due à la double liaison accolée au cycle, l'absence d'hétéroatome et d'aromaticité. Ainsi, il apparaît que plus la taille du cycle augmente, plus le taux de conversion à un instant t diminue, exception faite pour le dérivé cyclopropyle qui lui n'est pas substrat. Des études cinétiques, sur la base du test d'activité kinase, ont été conduites par spectrophotométrie en utilisant ThiM_{Ec}. Elles ont montré que cette enzyme n'était pas capable de phosphoryler le cyclopropylidènéthanol, contrairement au cyclobutylidènéthanol et au cyclopentylidènéthanol. Le susbtrat préférentiel étant l'IOH. Les données d'activité obtenues pour chaque alcool cyclique et pour l'IOH sont normalisées par la mesure d'activité sur le DMAOH (référence) réalisé dans les mêmes conditions et à partir du même lot de production (Tableau 14). Ceci permet une comparaison plus juste, du fait que les mesures n'ont pas été conduites simultanément et corrobore ainsi les observations faites suite aux cinétiques précédentes *i.e.* une activité kinase très faible sur le dérivé cyclopropylé, quatre fois plus faible – a minima – en comparaison de celles associées au dérivés cyclobutyle, cyclopentyle et à l'IOH.

Composé	Activité relative (Activité du composé d'intérêt/activité du DMAOH)				
ЮН	3,24				
cyclopentylidènéthanol	2,69				
cyclobutylidènéthanol	2,97				
cyclopropylidènéthanol	0,64				

Tableau 14 : Activités relatives de ThiM_{Ec} sur les différents alcools testés au cours de ces travaux de thèse.

Le cyclobutylidènéthanol ayant conduit à une bioconversion totale observée à 24 h, nous avons engagé une synthèse préparative (50 mg de BF, 10 mM)^{*}, après extraction et purification du produit unique de réaction, afin de valider la synthèse du dérivé cyclobutyle de la TB par RMN, et d'obtenir 44,7 mg de ce composé correspondant à un rendement en produit isolé égal à 72,4 %.

^{*} Alcool 20 mM, BF 10 mM, ATP 4 mM, PEP 40 mM, DMSO 10 %, 0,2 U de chaque enzyme.



Basés sur la MVT optimisée suite au changement de PhoN_{xt} par la kinase ThiM d'E. coli, des essais préliminaires ont été conduits visant à étudier la capacité de cette nouvelle voie à synthétiser des terpénoïdes non-naturels. Le choix de dérivés cycliques dont la strucure et les propriétés chimiques sont très proches de celles du DMAOH, s'est avéré payant du fait que le cyclobutylidènéthanol est le seul des dérivés testés à avoir permis une conversion totale de la BF, en moins de 24 h. Bien que le dérivé cyclopentyle du DMAOH ne permette pas d'atteindre une conversion totale dans l'intervalle de temps ciblée, ce composé est accepté, dans une moindre mesure que le DMAOH et son dérivé cyclobutyle, par l'ensemble des enzymes de la cascade i.e. ThiM_{Ec}, IPK_{Mv} et FtmPT1_{Af}. Grâce à ces premiers essais de synthèse de terpénoïdes non-naturels, nous avons mis en évidence la promiscuité naturelle de trois enzymes natives, impliquées dans une cascade enzymatique à trois étapes. Ainsi, les cinétiques obtenues à partir de ces essais ont permis de mettre en lumière la capacité de notre cascade à trois enzymes à catalyser les phosphorylations consécutives des dérivés cyclobutyle et cyclopentyle du prénol, en mono- puis diphosphates correspondants. Ces intermédiaires cycliques ont pu être additionés, in fine, sur la BF grâce à la prényl transférase d'A. fumigatus. Dans le cas du dérivé cyclopropyle, la BF n'est pas convertie et la synthèse d'un analogue cyclopropyle de la TB s'avère compromise dans ces conditions. Lorsque la comparaison est faite entre le DMAOH et ses analogues avec un cycle à 4 et à 5 atomes de carbone, le taux de conversion de la BF semble étroitement lié à la taille du cycle. Plus cette dernière est importante et moins la BF est convertie.

Des premiers tests d'activité kinase de Thi M_{Ec} sur les dérivés cyclopropyle, cyclobutyle et cyclopentyle ont été réalisés et ont révélé que Thi M_{Ec} accepte préférentiellement le cyclobutyle puis le cyclopentyle, dans une moindre mesure ; l'activité kinase mesurée sur le dérivé cyclopropyle du DMAOH est la plus faible dans ces conditions. Ces premiers résultats sont en accord avec les cinétiques observées par analyses par HPLC. Suite à ces résultats, des expériences complémentaires permettraient d'identifier les étapes limitantes et ainsi les enzymes clés pour explorer davantage l'espace chimique accessible grâce à la mini-voie des terpènes. En effet, il est indispensable de tester l'activité de chacune des enzymes de la cascade sur les trois composés cycliques. Cela implique de disposer des intermédiaires cycliques mono- et diphosphates dans le cas de la détermination de l'activité kinase de l'IPK_{Mv} et prényl transférase de FtmPT1_{Af}. De plus, la détermination des paramètres cinétiques pour chaque couple enzyme/substrat complèterait ces études préliminaires et conduirait à une meilleure compréhension de cette nouvelle voie de biosynthèse. Enfin, à l'identique de ce qui a été conduit in vivo pour la synthèse de TB impliquant PhoN_{Xt} (Chapitre IC), un premier essai a permis de valider que la mini-voie 2.0 (avec ThiM_{Ec} comme première kinase) est également fonctionnelle pour la synthèse de TB in vivo.

Au moment de la rédaction de ce manuscrit, des tests d'activités biologiques diverses sont engagés sur la TB, caractérisée par une activité cytotoxique²⁷⁷, et son dérivé cyclobutyle. L'objectif est d'étudier l'effet, sur l'activité cytotoxique orginale, de la présence d'un cycle supplémentaire, impliquant une modification structurale minime de la TB. En parallèle, des tests d'activités anti-microbienne, anti-inflammatoire, anti-fongique et anti-virale sont également réalisés. Les propriétés biologiques de la BF sont étudiées de la même façon afin de confirmer l'importance de la prénylation dans la fonctionnalisation d'une molécule. Ces tests, réalisés par le Dr. Marc Maresca (ism2, BiosCiences, Marseille), nous offrent la possibilité de compléter les résultats obtenus pour la synthèse de terpénoïdes non-naturels et valorisent ainsi le travail effectué pour le développement de l'alternative synthétique MVT appliquée à la synthèse de terpénoïdes naturels et non-naturels potentiellement bio-actifs.



B. LA **MVT** POUR LA PRODUCTION DE SESQUITERPENES NATURELS

Notre mini-voie 2.0 a fait ses preuves dans les travaux précédemment décrits en nous permettant de synthétiser la TB, un meroterpénoïde naturel (origine biosynthétique mixte : acide aminé – isoprénoïde) et son dérivé cyclobutyle. De ce fait, ayant apporté à la fois la preuve de validité de notre approche et son utilité pour l'accès à des composés isopréniques, nous avons souhaité étendre la mini-voie à la synthèse de sesquiterpénoïdes. Dans cette dernière partie, la réaction de référence considérée correspond à la mini-voie 2.0 impliquant les kinases Thi M_{Ec} et IPK_{Mv} auxquelles sont ajoutées une farnésyl diphosphate synthase (FPPS, prényl transférase linéaire ou prényl élongase, Chapitre IB.II.a p36) pour la synthèse du (*E*,*E*)-FPP (précurseur des sesquiterpénoïdes) dans un premier temps, puis une sesquiterpène synthase de notre choix pour l'obtention de sesquiterpénoïdes (Figure 103).



Figure 103 : La mini-voie des terpènes 2.0 appliquée à la synthèse du sesquiterpène amorphadiène, précurseur de l'artémisinine, pour exemple.

I. Une nouvelle cascade pour la production de FPP

La production de sesquiterpénoïdes est directement liée à l'obtention du précurseur linéaire (*E,E*)-FPP. Ainsi, nous avons dans un premier temps ajouté uniquement une farnésyl diphosphate synthase (FPPS) à la mini-voie 2.0, afin d'étudier ce nouveau système à trois enzymes. Notre intérêt s'est porté sur la FPPS cytosolique et thermostable de *Geobacillus stearothermophilus* dont l'activité vis-à-vis de l'IPP est la plus élevée^{*} parmi les FPPS décrites[†] (Figure 104).

^{*} D'après la base de données BRENDA, répertoriant à partir de publications et pour chaque enzyme les paramètres cinétiques, le pH optimum d'activité, la nature des inhibiteurs, l'activité pour divers substrats...

[†] Pour davantage de détails concernant la construction génétique ayant conduit à la production de la FPPS chez *E. coli*, se référer à la partie expérimentale (1.1.3, p201).

Cette prényl élongase catalyse la condensation 1'-4 (« tête-à-queue ») Mg^{2+} -dépendante d'une molécule de DMAPP avec deux molécules d'IPP, générant ainsi le (*E*,*E*)-FPP (C₁₅) (comme détaillé en introduction de ce manuscrit, Chapitre IB.II.a).



Figure 104 : Cascade de référence pour la synthèse de FPP à partir des alcools en C₅.

A l'identique de ce qui a été décrit pour l'ensemble des enzymes intervenant dans ces travaux de thèse, la FPPS a été produite chez *E. coli* sous la forme d'une enzyme dotée d'une étiquette hexahistidine. Des tests d'expression ont été réalisés à différentes températures post-induction (16 °C, 20 °C, 25 °C et 30 °C) en milieu LB. Ils ont permis d'établir un profil d'expression révélant qu'une induction sur la nuit (20 h) à 25 °C est la meilleure condition testée pour l'obtention d'une grande quantité d'enzyme active^{*}. L'étiquette en position amino-terminale facilite la purification de l'enzyme par chromatographie d'affinité permettant, par la suite, son utilisation *in vitro*. L'activité prényl transférase est quantifiée *via* le test au vert de Malachite (Section expérimentale 1.2.3). Sur la base de plusieurs purifications et de fait mesures d'activité, la FPPS_{Gs} présente une activité mesurée sur les substrats IPP et DMAPP égale à 0,24 ± 0,023 U/mg.

A l'identique de la méthodologie conduite dans le cas de la synthèse de TB, l'allongement de la mini-voie pour la synthèse de FPP nécessite de disposer d'une technique d'analyse quantitative permettant d'évaluer l'efficacité de la nouvelle cascade en terme de rendement, par quantification du FPP formé.

^{*}L'activité prényl transférase ou prényl élongase de la FPPS est quantifiée par le test au vert de malachite à partir d'IPP et de DMAPP.

a. Méthode d'analyse pour la quantification du FPP produit

Nous avons opté pour une méthode d'analyse indirecte par hydrolyse enzymatique du FPP en farnésol (FOH), aisément détectable par CCMs et par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Dans un premier temps, nous avons conduit la déphosphorylation sur la base du protocole décrit par le groupe de Gibbs³⁵⁶ impliquant une phosphatase alcaline capable de déphosphoryler le FPP en présence de Mg²⁺, à un pH alcalin maintenu par un tampon, à 37 °C. Compte-tenu du fait que le pH optimum d'activité de la phosphatase alkaline est supérieur d'au moins deux unités de pH à nos conditions de bioconversion (pH égal à 7,5 dans un tampon Tris-HCl), il est nécessaire de modifier à la fois la nature du tampon utilisé et le pH de la solution à l'issue de la bioconversion conduite dans des tubes Eppendorf[®]. Dans ces conditions, l'hydrolyse enzymatique du FPP produit est une méthode difficilement reproductible.

De ce fait, nous avons par la suite testé l'hydrolyse du FPP synthétisé chimiquement par la phosphatase acide non spécifique PhoN_{xt}, délaissée au profit de ThiM_{Ec} dans la MVT. En effet, nous avions mis en évidence sa capacité à hydrolyser - à pH égal à 7,5 - l'ensemble des composés phosphorylés intervant alors dans la cascade à trois enzymes : intermédiaires réactionnels (IPP, DMAPP, IP et DMAP), cofacteur et sous-produits associés (ATP, ADP, AMP) et substrat du système de recyclage (PEP) (Chapitre IB.II.b). Cette hydrolyse, complète en 24 h sur du FPP synthétisé chimiquement, présente l'avantage d'être plus économique et de ne nécessiter aucun ajustement supplémentaire hormis l'ajout de la phosphatase (0,2 U) en fin de réaction de bioconversion.

b. Adaptation de la MVT 2.0 à la synthèse de FPP

i. PREMIERES SYNTHESES EXPLORATOIRES

La méthode d'analyse ayant été validée, nous avons engagé trois séries d'essais préliminaires en faisant varier soit :

- 1) la concentration en MgCl₂ dans le milieu (10 mM/20 mM),
- 2) la nature du cation divalent (Mn²⁺/Mg²⁺),
- **3)** la quantité de FPPS_{Gs} introduite dans le milieu réactionnel (0,2/0,3/0,4 U).

La base commune de chaque essai est la suivante : IOH 10 mM, DMAOH 5 mM, système de recyclage 4 mM ATP et 40 mM PEP, 0,2 U de chaque kinase $ThiM_{Ec}$ et IPK_{Mv} . Les synthèses ont été réalisées en tubes Eppendorf[®] et suite aux étapes de déphosphorylation et d'extraction, l'analyse de la composition des différents milieux réactionnels est étudiée par CPG, grâce à l'ajout du géraniol comme étalon interne lors de l'extraction^{*}.

Nous avons ainsi observé que l'augmentation de la concentration en Mg²⁺, toutes choses étant égales par ailleurs, divise la quantité finale de FPP obtenue par deux. En effet, introduit à 10 mM le Mg²⁺ conduit à un rendement en FPP estimé à 19 %. Lorsque la concentration est doublée et amenée à 20 mM, le rendement en FPP est égal à 9 %. Dans le cas de la série étudiant l'effet de la nature du cation divalent, l'introduction de magnésium (MgCl₂) dans le milieu permet d'atteindre un rendement sensiblement supérieur (19 %) à celui obtenu lorsque la source de cation divalent est du chlorure de manganèse (MnCl₂) (12 %). Enfin, parmi les quantités de FPPS_{Gs} testées égales à 0,2/0,3/0,4 U, la quantité médiane a conduit au rendement en FPP le plus élevé, égal à 36 %. Il est intéressant de noter que l'ajout d'une quantité équivalente à 0,4 U donne lieu à un rendement plus faible (23 %).

Ainsi, à partir de ces trois séries, nous avons mis en évidence qu'une concentration égale à 20 mM en Mg²⁺ ou qu'une quantité élevée de FPPS_{Gs} n'améliorent pas le rendement en FPP, bien au contraire. Ceci peut être lié à un phénomène d'inhibition par le substrat (IPP) et/ou le(s) produit(s) (FPP, PPi) comme défini dans le cas de la FPPS d'*Abies grandis*. En effet, Tholl et collaborateurs ont décrit, pour cette prényl élongase, une inhibition de l'activité FPP synthase en présence d'IPP, de FPP et de diphosphate. Ainsi, l'activité maximale est diminuée de plus de 50 % lorsque la concentration en IPP est égale à 100 μ M et à 200 μ M, seuls 3 % d'activité résiduelle sont détectés. Concernant l'inhibition par les produits, une diminution de 50 % de l'activité de la FPPS est mesurée lorsque la concentration en FPP est égale à 60 μ M ou que celle en PPi atteint 660 μ M⁺³⁵⁷.

^{*} Analyses par CPG : volume d'injection 1µL | température détecteur et injecteur : 250 °C | colonne : Optima-delta-3 (Macherey-Nagel) | 55 °C (4 min)-15 °C/min-190 °C (20 min) | ratio phase organique/phase aqueuse ou échantillon : 1/2, solvant MtBE | Etalon interne GOH, 6 mM en solution dans le MtBE d'extraction | Tr FOH : 17,2± 0,06 min et Tr GOH : 11,10 ± 0,01, sur la base des temps de rétention du FOH pour chaque échantillon analysé.

[†] Ces valeurs décrivent la concentration de produits et/ou substrats induisant 50 % d'inhibition au niveau d'une réaction enzymatique. Est ainsi définie la concentration inhibitrice 50 par Tholl et collaborateurs.

Dans le contexte des essais ci-dessus, la concentration en substrat testée est largement supérieure aux concentrations mises en jeu dans les phénomènes d'inhibition soulignés par Tholl et collaborateurs. De plus, les trois enzymes de la cascade (ThiM_{Ec}, IPK_{Mv} et FPPS_{Gs}) sont dépendantes de la présence de cations Mg²⁺ pour leur activité. Il est donc raisonnable d'émettre l'hypothèse qu'une augmentation en Mg²⁺ peut induire, par exemple, une stimulation liée à une production plus importante et/ou accélérée d'IPP, de FPP et de PPi, responsables d'inhibition. Enfin, 0,4 U de FPPS_{Gs} introduites dans le milieu réactionnel peuvent condenser plus rapidement l'IPP et le DMAPP (intermédiaires) pour synthétiser du FPP, dont la concentration excèderait ainsi très vite la concentration inhibitrice 50.

Ainsi, afin d'identifier les facteurs critiques influençant la biosynthèse du FPP en trois étapes, nous avons réalisé un plan d'expériences. Il s'agit ici d'un criblage en vue de tester différents facteurs à deux niveaux, afin d'extraire le maximum d'informations sur cette nouvelle cascade. L'objectif premier de ce type de plan n'est pas de maximiser ou de minimiser la réponse ciblée mais plutôt d'identifier les facteurs ayant une influence sur cette dernière, qu'elle soit positive ou négative. Recourir à ce type de criblage *via* la méthodologie des plans d'expériences permet l'identification des facteurs influents d'une façon rapide et économique et facilitée, en comparaison d'essais non régis par des plans.

ii. Criblage de facteurs influençant la synthese de FPP

Pour ce plan d'expériences, nous avons sélectionné sept facteurs à tester selon deux niveaux chacun. L'objectif de ce criblage est d'identifier efficacement les facteurs importants pour la synthèse de FPP, la réponse analysée est de ce fait le rendement molaire en FPP (noté Y, en %). Le choix des différents facteurs testés est principalement basé sur les séries d'expériences conduites ci-dessus *i.e.* tester une concentration en Mg²⁺ comprise entre 10 et 20 mM, une quantité de FPPS égale à 0,2 U ou 0,3 U. Sont étudiés l'effet de la variation du pH du milieu réactionnel^{*}, de l'ajout de Mg²⁺ à 1 h de réaction, la supplémentation du milieu avec du chlorure d'ammonium (NH₄Cl) permettant de favoriser la solubilité du FPP et la présence de manganèse dans le milieu.

^{*} En lien avec le pH optimal d'activité des FPPS généralement centré autour de 8.

La concentration en substrat, ayant auparavant déjà permis l'amélioration du système développé pour la synthèse de TB, est un des facteurs également ciblé. La Figure 105 schématise ainsi les différents facteurs étudiés et les niveaux sélectionnés pour chacun d'eux.





Une matrice d'Hadamard a été construite générant huit expériences. Le nombre d'expériences est déterminé tel qu'il doive correspondre au chiffre ou nombre entier supérieur le plus proche du nombre de facteurs testés et être un multiple de quatre. Autrement dit, nous avons ici sept facteurs étudiés ; le chiffre entier supérieur le plus proche est 8, également multiple de quatre d'où une matrice comportant huit expériences. La réponse étudiée dans le cas de ce plan d'expériences est le rendement molaire en FPP. Les synthèses ont pour base commune un ratio molaire IOH/DMAOH 2/1^{*}, un système de recyclage d'ATP 4/40 (ATP 4 mM, PEP 40 mM, PK 30-50 U), des quantités de kinases ThiM_{Ec} et IPK_{Mv} fixées à 0,2 U.

^{*} La proportion de DMSO est maintenue constante à 3,4 % lors des différents essais par complémentation avec du DMSO directement dans le milieu réactionnel.

Elles diffèrent les unes des autres selon le plan d'expérimentation construit et présenté ci-dessous, donnant également le rendement en FPP obtenu à 24 h de réaction (Tableau 15). Les synthèses ainsi définies sont conduites en tubes Eppendorf[®], à 37 °C et 800 rpm durant 24 h. Par la suite, une étape de déphosphorylation par action de la phosphatase PhoN_{Xt} et une extraction au MtBE permettent l'obtention d'échantillons pour une analyse quantitative par CPG^{*} du FPP synthétisé (voir section expérimentale 1.2.4).

	X 1	X ₂	X 3	X4	X 5	X6	X7	Y
Exp.	[DMAOH]	[Mg ²⁺]	рН	[Mn ²⁺]	[NH ₄ Cl]	FPPS	Ajout Mg ²⁺	% FPP
	(mM)	(mM)		(mM)	(mM)	(U)	à 1h (mM)	
1	5	15	8	0	20	0,2	0	26,32
2	5	15	7,5	2	0	0,2	10	25, 29
2'	5	15	7,5	2	0	0,2	10	29,76
3	5	10	8	0	0	0,3	10	27,74
4	2,5	15	7,5	0	20	0,3	10	45,21
5	5	10	7,5	2	20	0,3	0	18,82
6	2,5	10	8	2	20	0,2	10	15,75
7	2,5	15	8	2	0	0,3	0	34,21
8	2,5	10	7,5	0	0	0,2	0	45,56
Niveau -1	2,5	10	7,5	0	0	0,2	0	_
Niveau +1	5	15	8	2	20	0,3	10	

Tableau 15 : Plan d'expériences pour le criblage des facteurs influençant le rendement en FPP.

L'analyse statistique de ce plan d'expériences a été réalisée à l'aide du logiciel AZURAD[®], sur la base de la matrice construite et des résultats expérimentaux, et donne lieu aux graphiques réprésentés sur la Figure 106. L'expérience n°2 a été conduite en duplicat permettant la détermination de la limite de signification à partir de cette expérience.

^{*} Analyses par CPG : volume d'injection 1µL | température détecteur et injecteur : 250 °C | colonne : Optima-delta-3 (Macherey-Nagel) | 55 °C (4 min)-15 °C/min-190 °C (20 min) | ratio phase organique/phase aqueuse ou échantillon : 1/2, solvant MtBE | Etalon interne GOH à 6 mM dans le MtBE d'extraction | Tr FOH : 17,19 ± 0,04 min et Tr GOH : 11,17 ± 0,02 min sur la base des temps de rétention du FOH pour chaque échantillon analysé.



Figure 106 : Graphique des effets et des effets totaux résultant de l'analyse statistique du criblage effectué sur les sept facteurs sélectionnés.

Le graphique des effets (Figure 106, gauche) représente les différents facteurs étudiés groupés par niveaux. Le rendement en FPP obtenu pour chaque niveau (concentration, valeur de pH, quantité enzymatique...) est représenté sous la forme d'un bâton, bleu pour le niveau inférieur (niveau -1) et orange pour le niveau supérieur (niveau +1).

Le graphique des effets totaux (Figure 106, droite) indique l'influence de chaque facteur lorsqu'on passe du niveau -1 au niveau +1 testé, sur le rendement en FPP. Les lignes verticales en pointillés représentent la limite de signification calculée à partir de l'expérience 2 et de son duplicat. Puisque les rendements obtenus pour ces deux expériences sont très proches (29,25 % et 29,76 %), la limite de signification est basse révélant également la reproductibilité de cette expérience. Lorsqu'un facteur influence de façon significative le rendement en FPP (b > limite de signification), le bâton représentatif est coloré en rouge. A l'inverse une coloration bleue donne lieu à un facteur non significatif sur le rendement final en FPP. L'orientation des bâtons vers la gauche indique un effet négatif sur la réponse, l'inverse est observé vers la droite.

Ainsi, à partir du graphique des effets (Figure 106, gauche), le rendement molaire en FPP est augmenté dans les conditions suivantes :

- **1)** [DMAOH] = 2,5 mM,
- **2)** $[Mg^{2+}] = 15 \text{ mM},$
- 3) pH du milieu réactionnel égal à 7,5
- 4) en absence de manganèse et de chlorure d'ammonium.

Concernant les deux derniers facteurs étudiés *i.e.* la quantité de FPPS_{Gs} et l'ajout ou non de chlorure de magnésium à 1 h de raction, le rendement molaire en FPP est sensiblement le même. Le graphique des effets totaux (Figure 106, droite) indique que la concentration en DMAOH, en magnésium, en manganèse, le pH et la présence de chlorure d'ammonium influencent significativement le redement en FPP final. Le fait de doubler la concentration en DMAOH a un fort effet négatif sur le rendement. Le même raisonnement est conduit pour chaque facteur significatif, permettant ainsi de sélectionner les conditions suivantes comme favorables à l'obtention d'un rendement maximal en FPP : [DMAOH] = 2,5 mM - [Mg²⁺] = 15 mM - pH = 7,5 - pas de manganèse, ni de chlorure d'ammonium. Concernant les facteurs non significatifs (quantité de FPPS_{Gs} et ajout de magnésium à 1 h de réaction), l'idée est de choisir le niveau de chacun de ces facteurs permettant de simplifier le milieu réactionnel et/ou diminuer le coût de la synthèse. De ce fait, la quantité de FPPS_{Gs} serait fixée à 0,2 U et aucun ajout de magnésium ne serait fait en cours de réaction.

A l'issue de ce cycle d'expérimentations centrées autour de la synthèse de FPP (expériences préliminaires et criblage), nous avons conduit une synthèse à l'échelle préparative visant à synthétiser le FPP en trois étapes catalysées par ThiM_{Ec}, IPK_{Mv} et FPPS_{Gs}. En parallèle, encouragés par le résultat obtenu dans le cas de la prénylation de la BF (Chapitre IA.II.c, p178), nous avons également conduit dans les mêmes conditions, une synthèse préparative à partir du cyclobutylidènéthanol en lieu et place du DMAOH. L'idée étant d'évaluer la capacité de cette cascade à générer un dérivé cyclobutyle du FPP et de ce fait permettre un accès potentiel à d'autres sesquiterpènes non naturels^{*} (Figure 107).

^{*} Pour rappel, nous avons synthétisé le dérivé cyclobutyle de la TB et souhaitions ainsi valider, dans le cas de cette nouvelle cascade, le fait qu'elle permette également l'accès à des sesquiterpènes non naturels et en l'occurrence le dérivé cyclobutyle du FPP.


Figure 107 : Cascades enzymatiques mises en place pour la synthèse de FPP et de son dérivé cyclobutyle.

Ces synthèses ont pour objectif de conduire à une quantité finale en produit (FPP ou dérivé cyclobutyle) la plus élevée possible afin de permettre une caractérisation structrale par RMN et ainsi valider la mini-voie 2.0 comme nouvel accès à des sesquiterpènes naturels et non naturels. C'est pourquoi nous avons repris les conditions expérimentales^{*} ayant permis d'atteindre 36 % de rendement à partir de 5 mM en DMAOH, plutôt que celles identifiées suite au criblage conduisant à 46 % de rendement en FPP mais à partir de 2,5 mM de substrat. De cette façon, nous avons pu obtenir après purification 12,5 mg de FPP, soit un rendement en produit isolé égal à 54 %. Nous avons également validé, dans ces conditions, la synthèse en trois étapes du dérivé cyclobutyle du FPP avec un rendement égal à 44 % correspondant ainsi à un peu moins de 11 mg.

A partir de la version 2.0 de la MVT, nous avons construit une nouvelle cascade in vitro impliquant trois enzymes, les kinases Thi M_{Ec} et IPK_{Mv}, et la prényl trasnférase linéaire FPPS_{Gs}. Cette cascade permet donc la double phosphorylation des alcools en C₅ IOH et DMAOH, puis la condensation (dans un rapport 2/1) de leur dérivé diphosphate en FPP, catalysée par la FPPS_{Gs}. Le FPP est l'élément central pour envisager par la suite la production de sesquiterpénoïdes naturels et non-naturels grâce à la mini-voie des terpènes.

 $^{^*}$ DMAOH 5 mM, IOH 10 mM, DMSO 3,4 %, ATP 4 mM, PEP 40 mM, ThiM_{Ec} et IPK_Mv : 0,2 U chacune, FPPS_Gs 0,3 U.

Ainsi, nous nous sommes focalisés sur la capacité de cette nouvelle cascade enzymatique à générer le précurseur linéaire en C₁₅ des sesquiterpénoïdes et pour cela avons conduit deux types d'expérimentations. La première consiste en trois séries d'essais exploratoires ayant permis de distinguer des conditions favorables à la synthèse de FPP i.e. l'apport de cation divalent sous la forme de chlorure de magnésium à une concentration inférieure à 20 mM, la quantité de FPPS égale à 0,3 U. Les autres paramètres ont été fixés tels que la concentration en DMAOH égale à 5 mM et celle en IOH toujours deux fois plus élevée, la concentration en ATP égale à 4 mM et celle en PEP à 40 mM (système de recyclage d'ATP 4 /40) et 0,2 U de chaque kinase. De cette façon, tous les essais ont permis la synthèse de FPP mais un seul s'est distingué atteignant un rendement molaire égal à 36 %. L'hypothèse d'une inhibition par le substrat IPP et les produits FPP et PPi de la FPPSGs est envisagée mais devrait être solutionnée d'une part par l'incrémentation d'une sesquiterpène synthase limitant l'accumulation transitoire du FPP et de l'IPP en déplaçant fortement l'équilibre dans le sens de la formation d'un sesquiterpénoïde.

Suite à cela, le recours à un criblage médié par un plan d'expériences (Hadamard) a permis d'évaluer l'influence de différents facteurs sur la synthèse de FPP. Ces facteurs ont en partie été sélectionnés sur la base des résultats obtenus via les essais exploratoires à savoir la concentration en Mg²⁺ et la quantité de FPPS. L'effet de la variation du pH du milieu réactionnel et la supplémentation de ce dernier par du Mg²⁺, du chlorure d'ammonium (NH₄Cl) ou du manganèse, a été analysé. Enfin, nous avons également fait varier la concentration en DMAOH (et de fait celle en IOH, pour respecter le ratio molaire 1/2). De cette façon, cinq facteurs sur les sept étudiés se sont avérés influencer significativement la quantité de FPP formée. Seuls la variation de la quantité de FPPS_{Gs} et l'ajout en cours de réaction de magnésium dans le milieu réactionnel ne sont pas significatifs. Ainsi, la combinaison des conditions DMAOH 2,5 mM (donc IOH 5 mM), pH 7,5, Mg²⁺ 15 mM se sont révélées les plus prometteuses pour la suite de ce projet. Par la suite, nous avons engagé deux synthèses à l'échelle préparative, l'une à partir des alcools en C₅ classiques (DMAOH et IOH) et l'autre à partir du cyclobutylidènéthanol et de l'IOH. Ces synthèses ont permis l'obtention d'une dizaine de milligrammes de FPP et de son dérivé cyclobutyle, respectivement, dont la structure et la pureté ont été validé par analyses RMN.

Il serait intéressant pour la conduite de nouvelles synthèses de réaliser un plan d'expériences visant cette fois à l'optimisation du rendement en FPP, suite au criblage présenté dans ce manuscrit. Dans ce cas, il faudrait déterminer des intervalles d'études pour deux à trois facteurs maximum. Il serait par exemple intéressant de se focaliser sur un intervalle de concentration pour le cation Mg²⁺ allant de 10 à 20 mM (à 20 mM les essais exploratoires ont indiqué que la synthèse de FPP était deux fois moindre en comparaison de 10 mM, le criblage a permis de spécifier que 15 mM étaient favorable à l'obtention de davantage de FPP). Le même raisonnment pourrait être conduit sur la concentration en DMAOH mais sur l'intervalle continu [0,5-4 mM] afin de mieux cerner l'influence de cette concentration sur le rendement final en FPP. Cette optimisation pourrait être conduite en moins de dix expériences et pourrait ainsi minimiser les étapes exploratoires et maximiser l'efficacité des prochains essais de synthèse de sesquiterpènes.

En parallèle de nos premiers essais sur la synthèse de diphosphate de farnésyle, une collaboration avec le laboratoire de Biodiversité et biotechnologie fongiques (BBF, INRAE) et plus particulièrement avec Marie-Noelle Rosso (DR INRA), Hayat Hage (Doctorante) et Margot Yvon-Loussouarn (ATER) a été engagée. Cette collaboration a pour fondement la découverte et la caractérisation de nouvelles enzymes fongiques et plus particulièrement, dans le contexte de ces travaux de thèse, de sesquiterpènes fongiques pouvant générer de nouvelles molécules présentant des activités biologiques. Ce projet repose, du côté de l'équipe du laboratoire BBF, sur le séquençage de 24 génomes de champignons, collectés dans des régions variées du globe et issus de la collection du Centre national de ressources microbiennes (Cirm)*. Une analyse complexe par bio-informatique, sur la base d'alignements de séquences, de recherche de motifs conservés par comparaison avec des sesquiterpène synthases fongiques caractérisées, a permis d'identifier en moyenne la présence de huit sesquiterpène synthases putatives par génome séquencé, soit plus de 200 potentielles nouvelles enzymes.

^{*} Le Cirm est un groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) créé en 2004 par l'Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE depuis le 1^{er} Janvier 2020, anciennement INRA) autour des collections de microorganismes (levures, bactéries, champignons filamenteux).

Parmi l'ensemble des génomes séquencés et de fait des gènes putatifs de sesquiterpène synthases identifiés, ce projet s'est focalisé sur le génome d'un champignon particulier de l'ordre des Polyporales *Leiotrametes menziesii*. De notre côté, l'objectif était d'utiliser la MVT 2.0 comme outil de criblage de nouvelles sesquiterpène synthases, tout en permettant l'accès au(x) produit(s) de ces enzymes et ainsi explorer, d'une nouvelle manière, l'espace chimique qu'offrent les terpénoïdes.

II. Identification de nouvelles sesquiterpène synthases fongiques, l'exemple de *L. menziesii*

Les Polyporales sont un groupe diversifié d'Agaricomycètes, eux mêmes appartenant à l'embranchement des Basidiomycètes et retrouvés dans des zones géographiques tempérées, tropicales et subtropicales. Ils consituent un ordre comprenant plus de 1800 espèces décrites³⁵⁸. Les champignons de cet ordre sont saprotrophes et qualifiés de dégradeurs du bois les plus efficaces de la biosphère^{359,360} et de ce fait ont un rôle clé dans le cycle du carbone et la réaffectation de ce dernier dans les sols forestiers³⁶¹. Ces champignons sont classés selon le type de composants qu'ils dégradent dans la paroi cellulaire végétale et de ce fait selon les symptômes de pourriture du bois qu'ils provoquent. Lorsque le bois est décomposé par dégradation de la lignine de la paroi cellulaire végétale, une couleur claire est observée et est associée à la présence de la cellulose (non dégradée). Les champignons à l'origine de ce phénomène sont décrits comme champignons de la pourriture blanche. A l'inverse, les champignons dits de la pourriture brune doivent ce qualificatif à la nature des composés cellulosiques et hemicellulosiques qu'ils dégradent. En effet, laissant la lignine intacte, ces champignons induisent la formation de morceaux de bois de couleur brune^{362,363}. Leiotrametes menziesii appartient à la classe des champignons dits de la pourriture blanche³⁶⁴. La souche utilisée (BRFM1781) est une souche monocaryotique obtenue de basidiospores d'une souche parentale collectée en Martinique^{*}.

^{*} Information issue du site internet <u>https://mycocosm.jgi.doe.gov/Tramen1</u> (consulté le 12/02/2020).

a. Les sesquiterpène synthases de L. menziesii

A partir du séquençage du génome de *L. menziesii*, six gènes ont été sélectionnés pour leur activité sesquiterpénique potentielle. La séquence codante de ces gènes a été clonée (coll. Renaud Vincentelli, Laboratoire Architecture et Fontion des Macromolécules Biologiques, AFMB) pour une production des enzymes correspondantes, dotées d'une étiquette hexahistidine, chez E. coli. Les premières productions ont été effectuées à l'AFMB et nous avons ensuite réalisé les purifications des enzymes, à partir des extraits cellulaires, selon le même protocole que celui suivi dans le cas des purifications des autres enzymes utilisées dans ces travaux de thèse. Suite à l'étape de purification par chromatographie d'affinité et d'échange de tampon, l'activité sesquiterpénique a été mesurée par le test au vert de malachite. Parmi les six enzymes testées, quatre terpène synthases (TS) ont retenu notre attention (TS-1, TS-2, TS-3 et TS-5) et l'une de ces trois enzymes (TS-1) a servi de modèle pour l'implémentation d'une sesquiterpène synthase dans la cascade à trois enzymes développée et décrite précédemment (ThiM_{Ec}-IPK_{Mv}-FPPS_{Gs}). Les deux autres enzymes (TS-4 et TS-6) n'ayant pas démontré d'activité significative sur le FPP issu d'une synthèse chimique, nous nous sommes premièrement focalisés sur celles ayant révélées une capacité à convertir le FPP in vitro.

Les enzymes étudiées sont ainsi les TS-1, TS-2, TS-3 et TS-5. Ces dernières sont testées sur 20 mM de FPP en solution dans le tampon Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, dont le pH a été ajusté à 7,5. Les synthèses ainsi définies sont conduites en tubes Eppendorf[®], à 37 °C et 800 rpm durant 24 h. Après extraction de la totalité du volume réactionnel par 300 μ L de diéthylether la composition de l'échantillon résultant est analysée par CPG^{*}. Ces enzymes produites par *L. menziesii* n'ayant pas été caractérisées, aucune indication relative au(x) éventuel(s) produit(s) formé(s) n'est disponible. Sur la base de l'activité avérée de ces enzymes sur le FPP, nous avons utilisé comme références un hydrocarbure sesquiterpénique (aromadendrène) et un alcool sesquiterpénique linéaire (FOH, farnésol), à notre disposition au laboratoire, pour avoir une idée des temps de rétention correspondant à ces types de sesquiterpénoïdes.

 $^{^*}$ Analyses par CPG : volume d'injection 1µL | température détecteur et injecteur : 250 °C | colonne : Optima-delta-3 Macherey-Nagel | 55 °C (4 min)-7 °C/min-190 °C (20 min) | ratio phase organique/phase aqueuse ou échantillon : 0,6, solvant diéthylether.

L'aromadendrène est, dans ces conditions, détecté à 19, 4 min et le FOH dans une zone comprise entre 23,6 et 24,6 min (détection de trois isomères du FOH). Ces temps références sont ainsi comparés à ceux du ou des composés produit(s) par les TS-1 à 5 à partir du FPP synthétisé chimiquement. Les chromatogrammes correspondants sont indiqués sur la Figure 108.



Figure 108 : Chromatogrammes indiquant les produits obtenus par cyclisation du FPP (synthèse chimique) catalysée par les TS-1, 2, 3 et 5.

Le(s) produit(s) majoritaires sont encadrés et un code couleur permet d'identifier les composés supposés identiques sur la base du temps de rétention.

Ces chromatogrammes révèlent la production d'un produit majoritaire, dans le cas de la conversion du FPP catalysée par les TS-1, TS-3 et TS-5. Sur la base des temps de rétention observés, chacune de ces terpène synthases produit un composé différent. Les TS-1 et 3 génèrent chacune un hydrocarbure sesquiterpénique, dont les temps de rétention sont respectivement égaux à 17,4 et 17,9 min. La TS-5 semble produire un alcool sesquiterpénique identifibale à 23,5 min (Figure 108). Une analyse qualitative par CCM sur silice^{*} confirme la production d'un alcool uniquement dans le cas de la TS-5. La TS-2 se distingue des trois autres enzymes en produisant deux composés majoritaires, correspondant aux deux hydrocarbures sesquiterpéniques déjà observés (Tr =17,4 et 17,9 min) (Figure 108).

^{*} Eluant dichlorométhane/acétate d'éthyle (10/1), révélateur : p-anisaldéhyde.

Des analyses préliminaires par GC-MS (PACEM, MIO^{*}) ont proposé que le sesquiterpène 1 puisse être le thujopsène, le sesquiterpène 2 le germacatriène et l'alcool sesquiterpénique produit par la TS-5 semble correspondre au cubédol ou au cadinol (Figure 109).



Figure 109 : Strucures potentielles des sesquiterpènes générés par les TS-1, 2, 3 et 5, à partir du FPP.

Le thujopsène est par exemple un sesquiterpène retrouvé dans les huiles essentielles du cèdre et de conifères et possède diverses activités biologiques telles qu'antiseptique, anti-inflammatoire mais également antifongique ou insecticide³⁶⁵. Par ces dernières, il pourrait être synthétisé par *L. menziesii* en réponse à une attaque extérieure, comme moyen de défense. Le cadinol, quant à lui, est un sesquiterpénoïde de type cadinane. Ces derniers sont caractérisés par des activités antifongiques notamment envers les champignons dégradeurs du bois³⁶⁶. De plus, il est intriguant que parmi les six enzymes testées, la TS-2 génère les deux hydrocarbures sesquiterpéniques, produits d'une façon distincte par la TS-1 et la TS-3. Il est de ce fait probable que ces trois enzymes soient liées ; la TS-2 produirait les deux hydrocarbures à un niveau basal et selon les besoins du champignon la TS-1 et/ou la TS-3 permettraient la synthèse d'une plus grande quantité de l'un des deux sesquiterpènes.

^{*} PACEM : Plateforme Analytique de Chimie des Environnements Marins de l'Institut Méditerrannéen d'Océanologie (MIO).

Encouragés par ces premiers résultats, nous avons sélectionné la TS-1 du fait qu'elle est la plus active sur le FPP et qu'elle est produite en quantité chez *E. coli*; nous l'avons alors intégrée à notre cascade à trois enzymes. Ainsi, le FPP n'est plus synthétisé chimiquement mais obtenu par double phosphorylation - catalysée par ThiM_{Ec} et IPK_{Mv} des alcools DMAOH et IOH, puis condensation des dérivés diphosphates correspondant par la prényl élongase FPPS_{Gs}. A partir de 5 mM en DMAOH, une toute première synthèse d'un sesquiterpène, impliquant notre mini-voie 2.0 combinée à la FPPS_{Gs} et à la TS-1, a pu être réalisée à l'échelle analytique^{*}. Après extraction du mélange réactionnel, une analyse par CPG[†] a confirmé l'obtention de l'hydrocarbure sesquiterpénique révélé lors des essais à partir du FPP chimique, validant ainsi pour la première fois l'utilité de notre mini-voie pour la synthèse « one-pot » de sesquiterpènes *via* une cascade *in vitro* à 4 enzymes. Dans la même logique adoptée à chaque étape des travaux présentés dans ce manuscrit, une synthèse préparative va être conduite très prochainement afin de caractériser par RMN le produit issu de la cyclisation du FPP, par action de la TS-1 et ce à partir de DMAOH et d'IOH.

CONCLUSION

Cet ultime chapitre a permis de présenter les dernières avancées faites dans le cadre de ces travaux de thèse. Il est indéniable que l'élément clé a été le remplacement de la phosphatase acide PhoN_{xt}, par l'hydroxyéthylthiazole kinase ThiM d'*E. coli*. En effet, cette modification a ainsi donné lieu à une nouvelle version de la MVT, nommée dès lors Minivoie 2.0, qui appliquée à la synthèse de TB, a conduit à une conversion totale de la BF en seulement 1 h de réaction. Cette modification réduit non seulement drastiquement la durée de réaction mais maintient également un taux de conversion optimum, illustrant ainsi la puissance d'une alternative biosynthétique telle que la mini-voie 2.0, pour la synthèse de composés naturels d'intérêt.

^{*} IOH 10 mM, système de recyclage 4/40, Mg2+ 10 mM, ThiM_{EC}, IPK_{Mv}, TS-1 : 0,2 U, FPPS_{Gs} 0,3 U.

[†] Analyses par CPG : volume d'injection 1μ L | température détecteur et injecteur : 250 °C | colonne : Optima-delta-3 MAcherey-Nagel | 55 °C (4 min)-7 °C/min-190 °C (20 min) | ratio phase organique/phase aqueuse ou échantillon : 1/2, solvant pentane.

Outre la synthèse du terpénoïde naturel TB, nous avons pu également obtenir son dérivé cyclobutyle, par introduction d'un nouvel alcool en lieu et place du DMAOH, le cyclobutylidènéthanol. La conversion de la BF dans ces conditions est totale et ce, en moins de 24 h. Ces expériences ont ainsi révélé la capacité de cette nouvelle voie de biosynthèse, à synthétiser des terpénoïdes non-naturels et à faire preuve, au niveau de chaque catalyseur sélectionné, d'une flexibilité suffisante vis-à-vis du nouveau susbtrat. Il est important de souligner que ces résultats ont été obtenus sans aucune optimisation ou amélioration supplémentaire, ni aucune ingénierie au niveau des différents catalyseurs. Cependant, nous avons fait le choix de tester des dérivés cycliques dont la strucure et les propriétés chimiques sont très proches de celles du DMAOH ; ce n'est donc pas suffisant, à ce jour, pour assurer que des modifications plus importantes soient tout aussi bien acceptées par notre système à trois enzymes. En effet, parmi les dérivés cycliques testés, tous n'ont pas permis l'obtention d'un analogue de la TB, révélant que la promiscuité de l'une ou de plusieurs des enzymes de notre cascade est moindre. De plus, il semble y avoir un lien inverse entre la taille du groupement terminal (gem-diméthyle, cycopropyle, cyclobutyle et cyclopentyle) et le taux de conversion de la BF. Cette observation n'est cependant pas vérifiée pour l'alcool cyclopylique pour lequel aucune conversion de la BF, ni production de TB n'a été observée.

Bien que la production de terpènes n'ait, à ce jour, pas été étudiée plus en détails, les premiers résultats que nous avons obtenus se sont avérés prometteurs en confirmant l'utilité de la mini-voie 2.0 comme alternative biosynthétique à la production de terpènes. En effet, nous avons dans un premier temps construit une nouvelle cascade enzymatique destinée à la production de composés sesquiterpéniques. Pour cela, la FPPS_{Gs} est venue compléter la MVT 2.0, permettant ainsi la synthèse enzymatique du précurseur de l'ensemble des sesquiterpénoïdes (FPP), à partir d'IOH et de DMAOH. Cette cascade génère, dans un premier temps, le DMAPP et l'IPP dans un rapport molaire 1/2 par l'action successive des kinases ThiM_{Ec} et IPK_{Mv}. Par la suite, ces diphosphates sont condensés en FPP par la FPPS_{Gs}. Le FPP est de fait l'élément central pour envisager, par la suite, la production de sesquiterpénoïdes naturels et non-naturels grâce à la mini-voie.

Sur la base d'une première série d'expériences, un criblage de facteurs pouvant influencer la synthèse de FPP *in vitro* a été réalisé. De cette façon, cinq facteurs sur les sept étudiés se sont avérés influencer significativement la quantité de FPP formée *i.e.* la concentration intiale en DMAOH, la concentration en magnésium, le pH du milieu réactionnel, l'ajout de manganèse comme source variée de cations divalents ou la supplémentation du milieu réactionnel par du chlorure d'ammonium. Ainsi, la combinaison des conditions DMAOH 2,5 mM (donc IOH 5 mM), pH 7,5, Mg²⁺ 15 mM se sont révélées les plus prometteuses pour la suite de ce projet et ont permis d'atteindre des rendements de l'ordre de 45 %.

Suite à cela, la collaboration initiée avec le laboratoire BBF portant sur l'identification (BBF) et la caractérisation de nouvelles sesquiterpène synthases fongiques (BiosCiences), nous a offert la possibilité d'étoffer ce travail de thèse et de valoriser ainsi la mini-voie des terpènes comme un « outil » pour la biosynthèse de terpénoïdes mais également de criblage pour la découverte de nouvelles sesquiterpène synthases, par exemple. En effet, parmi les six sesquiterpène synthases putatives étudiées de L. menziesii, polypore dégradeur du bois, nous avons initié la caractérisation de la TS-1. Cette caractérisation repose sur l'identification du produit de réaction. Ainsi, à partir des essais conduits sur du FPP synthétisé chimiquement un seul et unique produit majoritaire est obtenu et sur la base du temps de rétention de ce composé lors des analyses CPG, il s'agirait d'un hydrocarbure sesquiterpénique. Des premières analyses menées par CPG-MS suggèrent qu'il s'agit du thujopsène. L'intégration de la TS-1 dans la cascade à trois enzymes a permis de valider la synthèse de ce même produit à partir des alcools en C5 DMAOH et IOH, nous permettant de programmer prochainement la synthèse à l'échelle préparative pour une caractérisation par RMN du produit obtenu. Cette caractérisation permettrait de décripter le mécanisme de cyclisation utilisé par cette enzyme, le rôle du produit qu'elle synthétise et de ce fait obtenir davantage d'informations quant à son utilité pour le champignon.

De cette façon, nous disposons d'une plateforme (la MVT) qui permettrait potentiellement de permuter la sesquiterpène synthase putative testée (dernière enzyme de la cascade), par d'autres terpène synthases et d'analyser par CPG, CPG-MS et RMN le(s) produit(s) formés. Il serait ainsi possible de cribler des sesquiterpène synthases nouvelles efficacement. C'est dans cette perspective que nous souhaitons poursuivre les essais réalisés sur les TS-2, 3 et 5 afin de caractériser les produits qu'elles génèrent mais également sur la totalité des sesquiterpène synthases putatives de *L. menziesii* (18 enzymes) valorisant ainsi un peu plus, le cœur de ce projet de thèse, à savoir la conception de la Mini-voie des terpènes.

Partie expérimentale

Partie expérimentale

1.1 Partie biologie

1.1.1 Éléments de base

Produits

Les enzymes de restriction, la T4 DNA ligase, la Q5 polymérase proviennent du fournisseur New England Biolabs (NEB), la polymérase Platinum® *Taq*-HF de Thermo Fisher Scientific. Les oligonucléotides ainsi que les gènes synthétiques d'intérêt ont été synthétisés par Thermo Fisher Scientific et GeneArt respectivement. Les antibiotiques, l'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), le dithiothréitol (DTT), la benzonase sont fournis par Sigma-Aldrich, Acros Organics et Fisher Scientific. Le kit de minipréparation d'ADN plasmidique, le kit de purification et d'extraction sur gel d'agarose de produits PCR, les Diffinity RapidTip®2, ainsi que le kit de criblage PCR sur colonies proviennent respectivement des fournisseurs suivants : Qiagen, Roche, Sigma-Aldrich. Les solutions et composants nécessaires à l'élaboration de gels acrylamide sont achetés auprès de BIORAD. La résine nickel Ni-NTA Agarose est fournie par Macherey-Nagel.

Milieux de culture

Les deux milieux de cultures utilisés au cours de cette étude sont le Lysogeny Broth (LB) et le Terrific Broth (TB_m). Le premier entre en jeu lors de la réalisation des précultures, des transformations bactériennes ainsi que des cultures cellulaires. La version solide (Lysogeny Broth Agar ou LBA) permet la croissance bactérienne en milieu gélosé (boîte de Petri). Le second est utilisé pour des cultures nécessitant une densité cellulaire plus élevée. La composition de chacun de ces milieux est détaillée dans le Tableau 16.

Milieu	Composition pour 1 L		Fournisseur	
Lysogeny Broth	Trytone	10 g		
(LB)	Extrait de levure	5 g	PD Difeo	
	NaCl	5 g	BD Difeo	
Lysogeny Broth Agar	Composition identique au LB,			
(LBA)	supplémenté d'Agar	15 g		
	Peptone	12 g	Fisher	
Torrific Broth	Extrait de levure	24 g	BD Difco	
	Glycérol	4 mL	Fisher	
(IDm)	KH ₂ PO ₄	2,2 g	Fisher	
	K ₂ HPO ₄	9,4 g	Fisher	

Tableau 16 : Composition des milieux de cultures et fournisseurs correspondants.

Le milieu LB est obtenu par solubilisation de la poudre du fournisseur dans de l'eau ultrapure puis est autoclavé (121°C, 20 min).

Le milieu TB_m est préparé en deux temps, *i*) la solubilisation du glycérol, de la peptone et de l'extrait de levure dans de l'eau ultrapure (QSP^{*} 900 mL), le tout est autoclavé puis supplémenté par *ii*) 100 mL de tampon phosphate de potassium (1 M, pH=7) préparé et autoclavé indépendamment du reste du milieu.

Antibiotiques

Les antibiotiques utilisés dans cette étude sont l'ampicilline (Amp) et la kanamycine (Kan) dont les structures et le mode d'action sont présentés dans la Figure 110. Ils sont utilisés à une concentration de travail de 100 μ g/mL (Amp) et 50 μ g/mL (Kan). Des solutions stock sont préparées (Kan 50 mg/mL, Amp 200 mg/mL et 50 mg/mL) dans de l'eau ultrapure stérile puis filtrées (0,2 μ m). Elles sont ensuite réparties en aliquots de 1 mL – en conditions stériles – puis conservées à -20°C.

^{*} QSP : Quantité suffisante pour



Kanamycine Interagit avec le ribosome (sous-unité 30S) Interfère dans la synthèse protéique

Ampicilline Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries

Figure 110 : Structures des antibiotiques utilisés. A droite, le noyau β-lactame de l'ampicilline est mis en évidence par un fond coloré.

Solutions tampon

Au cours de cette étude, différentes solutions tampons entrent en jeu fonction du type d'expérimentation mené.

Tampons pour la purification des protéines d'intérêt sur colonne Ni-NTA

Les tampons utilisés lors de la purification protéique sont préparés à pH=8 en accord avec la composition donnée par le fournisseur Macherey-Nagel à savoir 50 mM en dihydrogénophosphate de sodium NaH₂PO₄, 300 mM en chlorure de sodium NaCl puis une concentration en imidazole de 0 ou 10 mM (NP ou NPI-10, lyse et équilibration), 20 mM (NPI-20, lavage), ou 50/100/150/200/250 mM (NPI-50/100/150/200/250, élutions).

Tampon pour l'étape de dessalage sur PD-10, d'activité kinase et phosphatase et de bioconversion

Dans le cadre de l'échange de tampon réalisé sur PD-10 (partie 1.1.4), des tests d'activité kinase et phosphatase (partie 1.2.3) ainsi que des bioconversions *in vitro* (partie 1.2.4), la solution tampon utilisée consiste en une solution à 50 mM en Tris-HCl et 5 mM

en chlorure de magnésium (MgCl₂) dont le pH est ensuite ajusté à 7,5. Ce tampon sera par la suite dénommé tampon A.

🖊 Tampon d'activité prényl transférase, terpène synthase

Une autre solution tampon utilisée au cours de ces travaux est liée à la détermination d'une activité prényl transférase et terpène synthase révélée par le test colorimétrique au vert de Malachite présenté dans la partie 1.2.3. Cette solution - dénommée par la suite tampon B - est composée d'un mélange Tris-HCl 50 mM, MES 25 mM, CAPS 25 mM, MgCl₂ 5 mM dont le pH est ajusté à 7,5.

Vecteurs de clonage et d'expression

Pour cette étude, deux types de vecteurs ont été principalement employés : pET-22b(+) et pHTP1 dont les cartes de restriction^{*} sont présentées ci-dessous et leurs principales caractéristiques dans le Tableau 17.



Figure 111 : Carte de restriction du vecteur d'expression pET22b(+).

amp^{*R*}: gène de résistance à l'ampicilline ; *lacl* : gène codant le répresseur Lacl ; T7 promoter et T7 terminator : promoteur/terminateur pour l'ARN polymérase du phage T7 ; 6xHis.Tag : étiquette hexa-histidine. Les flèches grises indiquent où est insérée la séquence codante d'intérêt.

^{*} Les cartes de restriction des vecteurs de clonage et d'expression ont été réalisées à l'aide de l'éditeur d'ADN et de plasmide ApE (A plasmid Editor).



Figure 112 : Carte du vecteur d'expression pHTP1.

kan^R: gène de résistance à la kanamycine ; *lacI* : gène codant le répresseur LacI ; T7 promoter/terminator : promoteur/terminateur pour l'ARN polymérase du phage T7. La flèche grise indique où est insérée la séquence codante d'intérêt.

Vecteur	Utilisation	Résistance	Étiquette histidine	Fournisseur
pET-22b(+)	Clonage	Amp ^R (100 μg/mL)	N-terminale / C-terminale	Labo/Novagen
	Expression			
pHTP1	Expression	Kan^{R} (50 µg/mL)	N-terminale et C-terminale	nZytech

Les vecteurs pET22b(+) ainsi que pHTP1 sont des vecteurs d'expression, les séquences codantes de chacune des protéines d'intérêt sont sous le contrôle du promoteur T7. La production est alors induite par l'ajout d'IPTG dans le milieu de culture. Les protéines sont obtenues sous forme de protéines de fusion possédant à l'une des extrémités (amino- ou carboxy-terminale) une étiquette hexa-histidine facilitant la purification.

Souches bactériennes

Nous avons utilisé dans le cadre de ce travail les souches DH5α et BL21(DE3) d'*E.coli*. Elles sont conservées à -80°C dans un mélange LB/Glycérol 26%. Le tableau suivant répertorie l'origine, le génotype ainsi que l'utilisation selon la souche considérée.

	40	0 1	11 11				
Tablaan	1 8 .	Souchas	C'H	COLL	micoc	on	1011
Iabicau	10.	JUUUUUU	u Li	COLL	IIII3C3	CII	ICU.

Souche	Génotype	Utilisation
DH5α (Laboratoire)	F^- φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 recA1 endA1 hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1	Clonage et conservation des souches recombinantes à -80°C
BL21(DE3) (Novagen)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3)	Expression protéique sous contrôle de l'ARN polymérase du phage T7

1.1.2 Les enzymes d'intérêt

Les enzymes choisies et employées dans cette étude sont listées dans le tableau suivant :

Tableau 19 : Liste des enzymes d'intérêt.

Enzyme	Organisme	ID Uniprot	Activité	
IDV	Methanococcus vannielii	A6UOT1	Kinaso	
	(ATCC 35089/DSM 1224)	AUUUII	Killase	
DhoN _w	Xanthomonas translucens pv. translucens	۸ ۵ ۸1C2TIA7	Phosphatase acide	
F HUNX t	(DSM 18974)	AUAICSTIA/		
ThiM_	Escherichia coli	D76422	Vinaco	
I IIIIVI <u>E</u> C	(K12)	F70425	Killase	
Г Р	Aspergillus fumigatus		Prényl transférase	
runr i 1Af	(ATCC MYA-4609)	Q4WAW7		
			Farnesyl	
FPPS _{Gs}	Geobacillus stearothermophilus	Q08291	diphosphate	
			synthase	
TC_v*	Leiotrametes menziesii		Sesquiterpène	
13-2	(CIRM-BRFM 1781)		synthase putative	

^{*} TS-x est une dénomination générale pour l'ensemble des terpène synthases de *Leiotrametes menziesii* dans laquelle x sera par la suite remplacé par le numéro d'identification de la terpène synthase d'intérêt.

1.1.3 Stratégie(s) de clonage et construction des souches recombinantes

Extraction d'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique est soit extrait à partir d'une souche glycérolée congelée (-80°C) soit à partir d'une colonie isolée sur boîte de Petri. Dans un tube, 5 mL de milieu LB - supplémenté de l'antibiotique adéquat - ampicilline (100 µg/mL) ou kanamycine (50 µg/mL) - sont inoculés avec la souche d'intérêt et incubés sur la nuit, à 37°C sous agitation. L'extraction est réalisée à l'aide du QIAprep[®] Spin Miniprep Kit suivant le protocole^{*} du fournisseur (QIAGEN). A l'issue de l'extraction, un dosage est réalisé par Nanodrop-2000c (Thermo Fisher Scientific) spectrophotomètre permettant de mesurer l'absorbance à 260 nm afin de quantifier l'ADN plasmidique extrait et d'en estimer la pureté.

Électrophorèse sur gel d'agarose 1%

La technique d'électrophorèse sur gel d'agarose permet l'analyse et la séparation en fonction de la taille de fragments d'acides nucléiques soumis à un courant électrique. Dans le cadre de ces travaux, les gels sont préparés à partir d'une solution d'agarose à 1% (m/v) dans du tampon Tris-acétate-EDTA 0,5x (TAE 0,5x : 20 mM Tris, 10 mM acétate, 0,5 mM EDTA), contenant du SYBR Safe DNA Gel Stain (agent fluorescent se fixant aux acides nucléiques, Invitrogen). Les échantillons d'ADN à analyser sont préalablement mélangés au tampon de charge puis chargés sur gel, le marqueur de poids moléculaire SmartLadder (Eurogentec[®], Figure 113) est également déposé. La migration électrophorétique est horizontale et se fait dans du tampon TAE 0,5x, à 135 mA pendant 20 à 30 min. La révélation de la présence d'ADN est réalisée par exposition des gels aux rayonnements UV au sein de l'imageur UVITEC (Alliance 9.7).

 $^{^*}$ Le protocole de référence est fourni par QUIAGEN et appartient à la rubrique : Quick-Start Protocol, « QIAprep® Spin Miniprep Kit» .

	Band size	ng/band
	10000	100
	8000	80
$\equiv 11$	6000	60
	5000	50
/	4000	40
	//3000	30
	2500	25
	\2000	20
	\1500	15
-	1000	100
	800	80
	600	60
_	400	40
	> 200	20

Figure 113 : Marqueur de poids moléculaire SmartLadder (Eurogentec®).

Stratégies de clonage

Les constructions plasmidiques pET-PhoN_{xt}, pET-IPK_{Mv} et pET-ThiM_{Ec} ont été réalisées au Génoscope d'Evry par clonage selon la technique LIC (Ligase Independent Cloning)³⁶⁷. Les gènes correspondant ont été insérés au sein du vecteur d'expression pET22b(+) (Novagen).

Les plasmides pHTP1-TS-x ont été obtenus des laboratoires AFMB (Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques) et BBF (Biodiversité et Biotechnologie Fongique) d'Aix Marseille Université. Pour chacune des terpène synthases putatives de *Leiotrametes menziesii*, les gènes synthétiques ont été optimisés pour une expression dans *E. coli* puis clonés au sein du vecteur pHTP0 et transférés au sein du vecteur pHTP1. La zone de clonage de du vecteur d'expression, indiquant où est inséré le gène d'intérêt, (ciseaux) sont présentées dans la Figure 114 et la Figure 115.

	pHTP0 forward primer	
lac promoter		T7 promoter
TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGGAATTGT	GAGCGGATAACAATTTCACAC	AGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTC TAATACGACTCACTAT
Hind III EcoRI Pst I Sal I Xba I BamH I	Spe I Nde I	0.0
AGGGAAAGCTTGAATTCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCA	CTAGTCATATGGATCACAGCA	GCGGCCCTCAGCAAGGGCTGAGG///CCTCAGCTTCCGCTGAGGTCCG
Sal I Hind III BamH I Sma I Kpn I	EcoR I	lacZ_a reporter
TCGACAAGCTTGCGGCCGCACAATCGGATCCCCGGGTACCGA	GCTCGAATTCACTGGCCGTCG	TTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGC
		<u> </u>
		pHTP0 reverse primer

Figure 114 : Séquence annotée de la zone de clonage du vecteur pHTP0.

AGGATCGAGATCTCGACCCGCGAAAT<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u>GAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGG GCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCCTCAGCAAGGGCTGAGG/%/CCTCAGCTTCCGCTGAGGTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCAC**CCGAC**CACCACCAC CACCAC*TG*AGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCGCCGCA<u>CCGCTGAGCAATAAC</u>TAGCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTT TGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGAT

pHTP1 sequence landmarks:

- T7 promoter: in gray
- First ATG (methionine): in yellow
- His•Tag coding sequences: in purple
- **T7 terminator**: in dark gray
- Sequencing primers (T7 universal and T7 terminator): underlined
- BglII, Ncol & Xhol recognition sites: in bold
- Cloning region: ⁹

Figure 115 : Séquence annotée de la zone de clonage du vecteur pHTP1.

4 Amplification par PCR et clonage

La séquence du gène *ftmPT1 d'Aspergillus fumigatus* codant la prényl transférase a été optimisée pour une expression dans *E. coli* et synthétisée par GeneArt (Thermo Fisher Scientific). La stratégie consiste en un clonage par restriction. La séquence génétique a été amplifiée par PCR (Polymerase Chain Reaction) en ajoutant les sites de restriction *XhoI* et *AseI via* l'utilisation des amorces suivantes :

- XhoI_STOP_FtmPT1_pET22bTER : 5'-gtgCTCGAGGTTCGGAAAGCTCACATCACC-3',
- AseI_ATG_FtmPT1 : 5'-tataATTAATatgCCTCCGGCACCG-3'.

La polymérase Platinum® *Taq*-HF a été utilisée selon les indications du fournisseur Thermo Fisher Scientific (Tableau 20).

Composants	Volume (µL)
Matrice (pMK-PT1 :GenArt)	0,2
dNTP 10 mM	1
Primer Fw 10µM	1
Primer Rev 10 μM	1
10 X Buffer	5
MgSO ₄ 50 mM	2
Platinium Taq Pol HiFi	0,2
H2O qsp 50 μL	40,6

Tableau 20 : Composition du mélange réactionnel pour amplification par PCR du gène ftmPT1.

L'amplification par PCR est faite dans le thermocycleur Mastercycler (Eppendorf®) selon le programme répertorié dans le Tableau 21.

Étape	Température (°C)	Temps
Dénaturation initiale	94	2 min
1-Dénaturation	94	30 sec
2-Hybridation	55	45 sec
3-Élongation	68	2 min
Élongation terminale	68	10 min

Tableau 21 : Conditions pour l'amplification PCR.

L'amplification a été validée par migration électrophorétique sur gel d'agarose 1% et le produit de PCR est purifé à l'aide du QIAquick PCR Purification Kit. Par la suite, le produit de PCR ainsi que le vecteur pET22b(+) ont été digérés par le couple d'enzymes de restriction *AseI/XhoI* et *NdeI/XhoI* respectivement (*nota bene* : les enzymes de restrictions *AseI* et *NdeI* sont des isoschizomères : elles génèrent des extrémités cohésives compatibles) suivant les conditions décrites dans le Tableau 22. Les mélanges de digestion sont incubés 2h à 37°C (bain sec).

Composant	Insert ftmPT1	Vecteur pET22b(+)
ADN	300 ng	300 ng
Ndel ou Asel	1,5 μL	1,5 μL
XhoI	1,5 μL	1,5 μL
Tampon CutSmart 10x	3 μL	3 μL
Eau ultrapure stérile	QSP 30 µL	QSP 30 μL

Tableau 22 : Composition des mélanges réactionnels pour la digestion des gènes synthétiqueset du vecteur.

L'échantillon digéré est quantifié à l'aide d'une mesure d'absorbance à 260 nm (Nanodrop-2000c). La digestion de l'insert et du vecteur a été validée par migration électrophorétique sur gel d'agarose 1% puis l'insert digéré et le vecteur linéarisé ont été purifié à l'aide du kit QIAquick PCR Purification Kit.

La ligation de l'insert et du plasmide a été réalisée grâce à la T4 DNA ligase (NEB) par incubation pendant 30 min à température ambiante selon les conditions décrites dans le Tableau 23. Afin de minimiser le nombre de plasmides n'ayant pas intégré l'insert, une enzyme de restriction dont le site de coupure unique est situé entre les sites de restrictions sélectionnés pour le clonage (au niveau du vecteur d'origine) mais indisponible au niveau du vecteur recombinant a été utilisée. Cette étape permet de maximiser le nombre de clones recombinant a près transformation bactérienne en linéarisant les vecteurs non recombinants. Dans le cadre de ces travaux, l'enzyme *Hind*III a été sélectionnée pour l'ensemble des ligations dans pET22b (+). Le site de clivage pour l'enzyme *Hind*III a été protégé : donc absent sur l'ensemble des séquences génétiques synthétiques. Après l'étape de ligation, 1 μ L d'*Hind*III ont été additionnés au mélange de ligation puis la solution a été incubée 30 min à 37°C.

Composant	pET-PT1 _{Af}
Insert digéré	0,4 µL (80 ng)
pET22b(+) digéré	1,5 µL (100 ng)
Ligase invitrogen	0,1 μL
Tampon ligase 5x	4 μL
Eau ultrapure stérile	QSP 20 µL

Tableau 23 : Composition des mélanges réactionnels de ligation.

Plasmides recombinants d'intérêt

Tableau 24 : Liste des souches recombinantes mises en jeu	u dans ce travail de thèse.
---	-----------------------------

Dlaamida racambinant	Propriétés		
r lasinitie i ecomoniant	Caractéristiques principales	Référence	
pET-PhoN _{Xt}	pET22b LIC <i>phoN_{xt} / C-term, étiquette 6His/Amp^R</i>		
рЕТ-ІРК _М	pET22b LIC <i>ipk_{Mv} / N-term, étiquette 6His / Amp^R</i>	316	
pET-PT1 _{Af}	pET22b ftmPT1 _{Af} / C-term, étiquette 6His / Amp ^R		
pET-ThiM _{Ec}	pET22b LIC thi M_{Ec} / C-term, étiquette 6His / Amp ^R	315	
pET-FPPS _{Gs}	pET22b fpps _{Gs} / N-term, étiquette 6His / Amp ^R	515	
pHTS1-TPSx _{Lm}	pHTP1 tpsx _{Lm} / N-term, étiquette 6His / Kan ^R		

Préparation de cellules compétentes

La compétence des cellules DH5 α ou BL21(DE3) utilisées dans le cadre de cette étude est acquise par traitement chimique au chlorure de calcium (CaCl₂). Une pré-culture de la souche d'intérêt est réalisée dans un tube contenant 5 mL de milieu LB et incubé sur la nuit, sous agitation à 37°C. Elle est utilisée pour inoculer 100 mL de milieu LB (inoculation au 1/100 v/v) puis incubée à 37°C, 200 rpm jusqu'à atteindre une valeur d'absorbance à 600 nm (DO₆₀₀) comprise entre 0,3 et 0,5. Le culot cellulaire est alors récupéré par centrifugation à 4°C, 5000 rpm, 10 min et maintenu au froid. Il est repris dans 50 mL d'une solution de chlorure de calcium 50 mM (CaCl₂). La suspension cellulaire est incubée 1h à 4°C, 20 rpm. Une seconde centrifugation à 4°C, 5000 rpm, 10 min permet de récupérer un culot de cellules compétentes. Ce dernier est repris dans 7 mL d'une solution de CaCl₂ 50 mM, Glycérol 15%. La suspension obtenue est répartie en conditions stériles en aliquots de 200 μ L dans des tubes de 1,5 mL par la suite congelés à l'azote liquide puis conservés à -80°C.

Transformation bactérienne par choc thermique

100 µL de cellules compétentes DH5 α ou BL21(DE3) sont mises à décongelées dans la glace. 20 µL de mélange de ligation ou 200 ng d'ADN plasmidique issu d'une « minipréparation » sont mis au contact des cellules compétentes durant 20 min à 4°C. Un choc thermique est réalisé à 42°C (bain sec) pendant 2 min, immédiatement suivi d'une incubation de 5 min dans la glace. 900 µL de milieu LB sont ajoutés à la suspension cellulaire qui est ensuite incubée 1 h, à 37°C, sous agitation (400 rpm en bain sec). Un étalement sur boîte de Petri LB agar supplémentée de l'antibiotique adéquat (50 µg/mL) ampicilline ou kanamycine permet la sélection des transformants d'intérêt. Ces derniers sont alors ré-isolés sur boîte LB agar supplémentée d'ampicilline à une concentration permettant d'augmenter la pression de sélection (100 µg/ml) ou kanamycine (50 µg/mL).

Un criblage des transformants d'intérêt est réalisé *via* un kit de PCR sur colonie (kit commercial Pure-Taq Ready-To-Go PCR, GE Healthcare.

1.1.4 Production et purification des protéines

Matériel et Méthodes

Dans le cadre de cette étude, les constructions génétiques utilisées ont comme base le vecteur pET22b (+) ou pHTP1 portant une séquence en 5' ou 3' codant une étiquette hexahistidine ainsi que le gène codant l'une des enzymes d'intérêt. Quelle que soit l'enzyme considérée, elle est produite sous forme d'une protéine taguée, possédant une étiquette hexa-histidine par expression du vecteur recombinant précédemment décrit au sein de bactéries de type *E. coli* BL21(DE3). Chaque enzyme est produite séparément et la présence d'une étiquette histidine permet une purification en une étape par chromatographie d'affinité sur résine nickel Ni-NTA Agarose, selon le protocole du fournisseur Macherey-Nagel^{*}. La composition des tampons utilisés lors de cette purification est décrite dans la partie Éléments de base.

Pré-culture

La pré-culture est préparée à partir d'une colonie fraîche isolée sur boîte de Petri LB agar + antibiotique. Des tubes contenant 5 mL de milieu de culture LB supplémentés d'ampicilline (100 μ g/mL) ou kanamycine (50 μ g/mL) et homogénéisés à l'aide d'un vortex sont inoculés avec une colonie. Ils sont placés sous agitation et incubés à 37°C sur la nuit.

Culture cellulaire

📥 En fiole

La pré-culture, après incubation sur la nuit, permet l'ensemencement au 1/100 (v/v) d'une fiole plastique bafflée (dont la contenance est choisie pour être 4 à 5 fois le volume de culture réalisé) contenant préalablement le milieu de culture (LB ou TB_m préalablement préchauffé à 37°C) supplémenté de l'antibiotique de choix. Le milieu est ensuite incubé à 37°C, 180 rpm pendant 2 à 3 h dans un incubateur de type INFORS (Multitron II). La croissance cellulaire est suivie par mesure de la DO₆₀₀. Lorsque cette valeur est comprise entre 0,4 et 0,6 (culture en milieu LB) ou 1 et 2 (en milieu TB_m) l'induction de l'expression protéique est alors initiée par ajout d'IPTG (1 mM). La durée ainsi que la température correspondant à la phase d'induction sont dépendantes de l'enzyme produite (Tableau 25).

^{*} Le protocole suivi dans le cadre de ce travail correspond à la section « Semi-batch purification method » - Protino[®] Ni-NTA User Manual.

Engumo	Paramètres d'induction			
Enzyme	Milieu de culture	Température (°C)	Agitation (rpm)	Temps (heure)
PhoN _{Xt}	LB	16	190	20
IPK _{Mv}	LB	16	190	20
FtmPT1 _{Af}	LB	37	190	20
ThiM _{Ec}	TB_m	25	190	5
FPPS _{Gs}	LB	25	190	20
$TS-x_{Lm}$	TB _m	16	190	20

Tableau 25 : Paramètres de culture et d'induction pour chacune des enzymes d'intérêt étudiées

Les cellules sont centrifugées à 4°C, 6000 g pendant 20 min. A l'issue de cette première centrifugation le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est re-suspendu et lavé dans du tampon NPI-10 froid. Une deuxième centrifugation à 4°C, 10000 g pendant 30 min permet de récupérer le culot cellulaire, ensuite congelé à l'azote liquide puis conservé au congélateur (-20°C).

븆 En fermenteur

Une montée en échelle a été réalisée afin d'augmenter la quantité d'enzyme $ThiM_{Ec}$ produite. Cette production est menée en fermenteur d'une contenance de 5 L (BioBundle, Applikon). Le protocole suivi se déroule selon 3 étapes décrites ci-dessous :

- Pré-culture en tube : inoculation à partir d'une colonie fraîchement isolée sur gélose, 5 mL de LB, Amp 100 μg/ml, incubation 10 h à 37°C, sous agitation.
- Culture en fiole : inoculation au 1/100 (v/v) à partir de la pré-culture précédente,
 50 mL de TB_m, Amp 100 μg/ml, incubation sur la nuit à 25°C, 190 rpm en INFORS.
- Culture en fermenteur (Plateforme Analyse et Valorisation de la Biodiversité, AVB)

 inoculation à une DO₆₀₀ initiale égale à 0,08 à partir de la culture en fiole, 5 L de TB_m, Amp 100 μg/ml, induction à une DO₆₀₀ égale à 2 par ajout d'IPTG (1mM), incubation 5 h à 25°C, débit d'air 2,5 L/min, agitation 400 rpm.

La veille de la culture en fermenteur, les 5 L de milieu TB_m sont préparés comme décrit dans la partie 1.1.1, à la différence que le milieu TB_m (sans le tampon phosphate de potassium) est autoclavé directement au sein du fermenteur. Puis la cuve est connectée au panel permettant de contrôler la température, l'agitation ainsi que l'aération. Le milieu est alors mis à chauffer à 37°C, sous une agitation minimale de 100 rpm et un débit d'air égal à 0,5 L/min sur la nuit. Le tampon supplémenté d'ampicilline est ajouté le jour de la culture en conditions stériles puis une fois le milieu homogène en température et en composition, l'inoculum issu de la culture en fiole sur la nuit est ajouté. Les paramètres de culture sont alors modifiés avec un débit d'air de 2,5 L/min et une agitation de 300 rpm. La génération de mousse durant la production de biomasse est contrôlée par ajout de quelques gouttes de Pluriol PE8100. De la même façon que décrite précédemment concernant la production en fiole, les cellules sont récupérées par centrifugation puis resuspendues et enfin conservées sous forme de culots secs à -20°C.

Quel que soit le type de culture considéré, un suivi de DO₆₀₀ est réalisé afin de quantifier la production de biomasse. Un échantillon (équivalent à 1 U.DO₆₀₀) est prélevé, avant ajout d'IPTG – nommé échantillon non induit (NI) – et à la fin de la culture – nommé échantillon induit (I). Ces échantillons sont ensuite centrifugés à température ambiante, 5 min, à 12500 rpm avant d'être conservés au congélateur sous la forme d'un culot cellulaire sec. Ces échantillons serviront, par la suite, à valider la production de la protéine d'intérêt par analyse électrophorétique SDS-PAGE.

Extrait enzymatique

L'extrait enzymatique est obtenu à partir du traitement du culot cellulaire issu de l'étape de culture précédente. Décongelé dans la glace, il est ensuite re-suspendu dans du tampon NPI-10 de telle sorte à se placer à une concentration de 200 U.DO_{600nm}/mL. Afin de conduire à la lyse cellulaire, des solutions de benzonase (2 µL pour 1300 U.DO_{600nm}) et de lysozyme (1 mg/mL final) sont ajoutées (solutions stock à 25 kU et 100 mg/mL respectivement). La solution est ensuite incubée sous agitation (30 rpm) à 4°C pendant 30 min. L'étape suivante consiste en une lyse par application d'une pression de 1,3 kBar en un seul passage à l'aide du désintégrateur de cellule (Série TS, CellD, Plateforme Analyse et Valorisation de la Biodiversité, AVB). Une étape de centrifugation finale à 4°C, 6000 g pendant 30 min permet de récupérer un surnageant contenant l'enzyme d'intérêt à purifier. Ce dernier est conservé à 4°C. L'ensemble de la purification de l'enzyme d'intérêt est par la suite réalisé à froid.

Purification par chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA agarose

A l'issue de l'étape de lyse cellulaire, le surnageant est chargé sur une colonne contenant une résine Ni-NTA agarose préalablement équilibrée avec du tampon NPI-10. L'ensemble est incubé à 4°C, 20 rpm pendant 1 h. La purification est effectuée à l'aide d'une pompe péristaltique de paillasse et débute par une étape de lavage avec du tampon NPI-20 (2 x 10 volumes de résine). L'élution des protéines est faite par un gradient étape par étape d'imidazole (de 50 à 250 mM, par pas de 50 mM). Les fractions collectées sont ensuite conservées dans la glace puis une mesure d'absorbance à 280 nm permet d'estimer la quantité de protéine d'intérêt de chacune des fractions récoltées (par l'utilisation des paramètres intrinsèques^{*} à chacune des enzymes de cette étude).

Échange de tampon par chromatographie d'exclusion sur colonne de dessalage Sephadex G-25 PD-10

Cette ultime étape de purification permet de minimiser la concentration finale en imidazole tout en réalisant un échange de tampon. Pour cette étude, le tampon sélectionné pour la conservation et l'utilisation des enzymes est du Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM à pH=7,5 (tampon A). Les fractions sélectionnées à l'étape précédente sont alors rassemblées et chargées sur une colonne de dessalage PD-10 préalablement équilibrée avec du tampon A. La protéine d'intérêt est alors éluée sous forme de fractions, par la suite chacune caractérisée par une mesure d'absorbance à 280 nm. Les fractions d'enzyme purifiée ainsi identifiées sont rassemblées et conservé à 4°C en attendant leur utilisation en biocatalyse (moins de 48 h).

^{*} Les paramètres intrinsèques sont définis comme étant la masse moléculaire et le coefficient d'extinction molaire estimés à partir de la séquence en acides aminés de l'enzyme étudiée *via* l'outil ProtParam du site internet ExPASy (<u>https://web.expasy.org/protparam/</u>).

A la suite de chacune des étapes de purification, un échantillon protéique (nommé Ni-NTA et PD-10) est mis de côté pour une analyse du profil de purification de chacune des enzymes par électrophorèse SDS-PAGE.

Validation de la production et de la purification

La production et la purification des enzymes d'intérêt sont validées par électrophorèse SDS-PAGE^{*}. Cette méthode analytique permet de séparer des protéines d'un mélange par migration due à l'application d'un courant électrique. Dans le cadre de ces travaux de thèse, l'électrophorèse est menée en conditions dénaturantes par présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS, détergent anionique) dans la composition du gel de polyacrylamide permettant ainsi une séparation des protéines selon leur taille. Le gel SDS-PAGE est constitué de deux gels dont la composition diffère. La partie haute de ce gel permet la concentration des protéines (gel de concentration, stacking) ensuite séparées au sein du deuxième gel (gel de séparation, resolving). Quel que soit le profil protéique étudié, le gel SDS-PAGE est à 12% en acrylamide avec une épaisseur de 1 mm.

🖊 Préparation des échantillons et migration

Les échantillons de la phase de culture cellulaire (NI et I) et ceux isolés lors de la purification (Ni-NTA et PD-10) sont traités selon le protocole suivant.

Culture cellulaire		Purification	
culot	1 U.DO ₆₀₀	échantillon	10 µL
eau distillée	20 µL		
tampon de charge/DTT*	20 µL	tampon de charge/DTT*	10 µL

Tableau 26 : Préparation des échantillons pour analyse par SDS-PAGE.

*Le tampon de charge 2X est fait au laboratoire : 0,5 M Tris pH 6,8 (1mL), SDS 10 % (2mL), Glycérol 100 % (1 mL), Bleu de bromophénol (10 mg), Eau qsp 5 mL. Une solution de dithiothréitol à 2 M dans de l'eau distillée est préparée. Ces deux solutions sont stockées à -20°C séparément sous forme d'aliquots de 200 μL. Le mélange tampon de charge/DTT 2 M est réalisé extemporanément avec un rapport 4/1.

 $^{^{*}}$ SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

Les échantillons sont homogénéisés, incubés 5 min à 99°C puis centrifugés afin d'éliminer les débris cellulaires. Le gel est monté sur le dispositif vertical de migration puis immergé dans du tampon Tris-glycine-SDS 1x. Les échantillons ainsi que le marqueur de poids moléculaire sont déposés sur gel de la façon suivante :

- Marqueur de poids moléculaire (PageRuler[™] Plus Prestained Protein Ladder, 10 à 250 kDa – Euromedex - #06p-0211, Figure 116) : 5 µL déposés sur gel
- Échantillons protéiques NI et I : 0,25 U.DO₆₀₀ soit 10 μL déposés sur gel
- Échantillons protéiques Ni-NTA et PD-10 : 2 à 50 µg déposés sur gel



Figure 116 : Marqueur de poids moléculaire Euromedex #06p-0211.

La migration est menée à voltage constant à 110 V jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel.

📥 Révélation

A la fin de la migration, le gel est rincé brièvement à l'eau distillée, placé dans le bain de coloration durant 20 min puis décoloré jusqu'à révélation de la présence de protéines. Le Tableau 27 décrit la composition de chacun des bains. Le gel est photographié grâce à l'imageur UVITEC Alliance 9.7.

Coloration		Décoloration	
0,25% brillant blue	2,5 g	10% acide acétique	100 mL
40% éthanol	400 mL	10% éthanol	100 mL
10% acide acétique	100 mL	QSP eau distillée	1000 mL
QSP eau distillée	1000 mL		

Tableau 27 : Composition des solutions utilisées pour la coloration et la décoloration des gelsSDS-PAGE.

A stocker dans une bouteille opaque

1.2 Partie chimie

1.2.1 Produits

Les solvants (grade analytique), les réactifs de synthèse tels que l'alcool diméthyallique (DMAOH), (IOH), tétrabutylammonium phosphate isopenténol (TBAP), Nα-Carbobenzyloxy-L-tryptophane (Z-Trp-OH), L-prolinate de méthyle, chlorhydrate (H-Prohydroxybenzotriazole (HBT), N-éthyl-N'-(3-diméthylaminopropyl)-OMe.HCl), carbodiimide, chlorhydrate (EDC.HCl), diisopropyléthylamine (DIPEA)... proviennent des fournisseurs Sigma-Aldrich et TCI. Les réactifs et enzymes impliqués dans les tests d'activité tels que ATP/ADP/AMP, 4-nitrophénol, 4-nitrophényl phosphate (pNPP), nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), phosphoénolpyruvate (PEP), sel d'oxalate de vert de malachite, pyrophosphatase inorganique (PPase, Saccharomyces cerevisiae), mix pyruvate kinase/lactate déshydrogénase (PK/LDH) proviennent de Fluka, Fisher Scientific, Acros Organics et Sigma-Aldrich.

Pour rappel, le tampon A est une solution à 50 mM en Tris-HCl et 5 mM en MgCl₂ dont le pH est ensuite ajusté à 7,5 et le tampon B a la composition suivante : Tris-HCl 50 mM, MES 25 mM, CAPS 25 mM, MgCl₂ 5 mM, pH=7,5.

1.2.2 Synthèses chimiques

🖊 Synthèse des mono- et di- phosphate d'intérêt

Les monophosphates (DMAP et IP) et leur dérivé diphosphate respectif (DMAPP et IPP) sont synthétisés en accord avec Lira et collaborateurs à partir des alcools commerciaux correspondant le DMAOH et l'IOH.

631 mg d'alcool (7,3 mmol) dilués dans 10 mL d'acétonitrile et 1,7 mL de trichloroacétonitrile sont placés sous agitation, à température ambiante, dans un bicol d'une contenance de 100 mL 5 g (14,7 mmol) de TBAP (agent phosphorylant) solubilisés dans 40 mL d'acétonitrile sont ajoutés lentement à l'aide d'une ampoule à addition au mélange réactionnel. L'agitation est alors maintenue 2 h, à température ambiante puis le mélange réactionnel est mis à évaporer sous pression réduite. A l'issue de l'évaporation, un volume minimum d'un mélange 7/2/1 isopropanol/ammoniaque (32%)/eau est ajouté puis le mélange est purifié sur une colonne de gel de silice (Merck, Silica gel 60, 0,063-0,2 mm) afin de séparer le mono- et le di- phosphate synthétisés (éluant 7/2/1 décrit ci-dessus). Les fractions* contenant le monophosphate ou le diphosphate sont regroupées séparément et traitées selon le protocole suivant :

- Passage sur résine échangeuse de cation de type NH₄+-DOWEX-50, élution par une solution de carbonate d'ammonium à 0,025 M, fractions d'intérêt* regroupées et lyophilisées.
- Passage sur colonne de cellulose, élution par un mélange 4,5/2,5/3 isopropanol/acétonitrile/bicarbonate d'ammonium 0,1 M, fractions d'intérêt* regroupées puis lyophilisées après évaporation des solvants organiques.

*L'identification des fractions à regrouper est faite par chromatographie sur couche mince (CCM, silice, éluant 7/2/1 décrit précédemment, révélateur : p-anisaldéhyde).

Cette synthèse permet l'obtention des composés mono- et di- phosphate (solides blancs) avec des rendements moyens en produit isolé de 30% et 6% respectivement dont la structure et la pureté sont validées par RMN.

DMAP.2NH₄: RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) : δ 5.35 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.70 (br s, 8H), 4.26 (ap t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.70 (br s, 3H), 1.65 (br s, 3H) ; RMN ¹³C (D₂O, 75.47 MHz) : δ 139.2, 119.6 (d, *J* = 7.8 Hz), 61.6 (d, *J* = 4.6 Hz), 24.9, 17.2 ; RMN ³¹P (D₂O, 121.49 MHz) : δ 2.2.

DMAPP.3NH4: RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) : δ 5.38 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.70 (br s, 12H), 4.39 (ap t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.70 (br s, 3H), 1.65 (br s, 3H) ; RMN ¹³C (D₂O, 75 MHz) : δ 140.0, 120.3 (d, *J* = 7.7 Hz), 62.7 (d, *J* = 4.6 Hz), 24.9, 17.3 ; RMN ³¹P (D2O, 121.49 MHz) : δ -8.5, -10.4.

🖊 Synthèse de la brévianamide F

La BF est obtenue selon la synthèse décrite par Torres-Garcia et collaborateurs³⁶⁸.

Dans un ballon d'une contenance de 100 mL, 3 mmol de chacun des réactifs (Z-Trp-OH, H-Pro-OMe.HCl, HBT et EDC.HCl) sont introduites puis solubilisées dans 40 mL d'acétonitrile. 766 μ L de DIPEA sont ajoutés au mélange réactionnel, par la suite laissé sous agitation à température ambiante durant 23 h. Après évaporation de l'acétonitrile, le mélange est repris dans 40 mL d'acétate d'éthyle, la phase organique est lavée par 2x40 mL successivement : d'eau dé-ionisée, d'une solution de carbonate de sodium saturée, d'eau dé-ionisée, d'une solution d'HCl à 0,1 M et d'une solution de NaCl saturée. Après lavages, la phase organique est séchée (sulfate de sodium anhydre), filtrée puis les solvants organiques sont évaporés. Le produit est repris dans 40 mL de méthanol puis mis en présence de 108 mg de palladium sur charbon (10 mol%). Le mélange est alors placé sous agitation sous H₂ (ballon de baudruche) sur la nuit. Après filtration sur célite et évaporation, le produit est purifié sur colonne de gel de silice (éluant 9/1 acétate d'éthyle/méthanol). Une évaporation finale permet l'obtention de la BF avec un rendement moyen en produit isolé compris entre 50 et 85%. Une analyse par RMN permet de valider la structure et la pureté de la BF synthétisée.

BF : RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) : δ 8.33 (br s, 1H), 7.59 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.08–7.26 (m, 3H), 5.75 (br s, 1H), 4.37 (dd, *J* = 2.8, 10.7 Hz, 1H), 4.07 (tr, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.75 (ddd, *J* = 0.8, 3.7, 15.1 Hz, 1H), 3.70–3.52 (m, 2H), 2.98 (dd, *J* = 15.1, 10.7 Hz, 1H), 2.27–2.38 (m, 1H), 2.10–1.82 (m, 3H) ; RMN ¹³C (CDCl₃, 75.47 MHz) : δ 169.3, 165.5, 136.7, 126.7, 123.3, 122.8, 120.0, 118.5, 111.6, 110.0, 59.2, 54.6, 45.4, 28.3, 26.8, 22.6.

Synthèse des alcools cycliques

• Synthèse du cyclopropylidènéthanol

a) Déprotection du (1-ethoxycyclopropoxy)trimethylsilane et synthèse du cyclopropylidène acétate d'éthyle

Dans un ballon de 25 mL sont pesés 2,51 g de (1-ethoxycyclopropoxy)trimethylsilane commercial dans 6,5 mL de méthanol. Le mélange est placé sous agitation, à température ambiante, pendant 22 h, puis le méthanol est évaporé (suivi de la réaction par CCM, solvant pentane/éther diéthylique, 7/3). Le résidu d'évaporation est placé dans un ballon tricol de 100 mL avec 25 mL de toluène et 347 mg d'acide benzoïque. La solution est reflux 4,43 placée à agitation sous puis g de (carbethoxymethylene)triphenylphosphorane dissout dans 25 mL de toluène sont ajoutés, goutte à goutte. La réaction est laissée sous agitation à reflux pendant 2 h (suivi de la réaction par CCM, solvant pentane/éther diéthylique, 7/3). Le mélange réactionnel est ensuite évaporé et le résidu liquide purifié sur colonne de silice (solvant : pentane/éther diéthylique, 8/2) permettant l'obtention de 1,366 g de cyclopropylidène acétate d'éthyle (Rdt: 87,4%).

RMN: ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.94 (br s, 1H), 3.64 (q, 2H), 1.15 (t, 3H), 0.81 (m, 4H); ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 85.1, 61.8, 15.2, 13.8.

b) Synthèse du cyclopropylidènéthanol

Dans un ballon tricol de 100 mL muni d'une ampoule à addition isobare, on ajoute 630 mg de cyclopropylidène acétate d'éthyle dissout dans 10 mL de dichlorométhane. La solution est mise à l'agitation sous atmosphère inerte (N₂) puis refroidie à – 80°C. Sont ensuite ajoutés, sous azote, 6 mL d'une solution 1 M de DiBAl-H dans le dichlorométhane. A la fin de l'addition et après retour à température ambiante (suivi de la réaction par CCM, solvant pentane/éther diéthylique, 8/2), la réaction est laissée sous agitation toute la nuit. Le lendemain, le contenu du ballon tricol est versé dans un flacon Erlenmeyer maintenu dans un bain de glace et sous agitation. Sont alors ajoutés 20 mL de MeOH et 20 mL de sels de Rochelle (tartrate de sodium et de potassium). La suspension est agitée pendant 30 minutes puis filtrée sur Célite[®] et cette dernière est rincée à l'éther diéthylique et à l'eau. L'ensemble des filtrats est mis dans une ampoule à décanter et la phase aqueuse extraite avec 3 fois 100 mL d'éther diéthylique.
Les phases aqueuses sont réunies, lavées avec une solution saturée de NaCl puis mise à sécher sur Na₂SO₄. Après filtration et évaporation, le liquide résiduel est purifié sur colonne de silice (éluant pentane/éther diéthylique, 1/1) permettant l'obtention de 78,9 mg de cyclopropylidènéthanol (Rdt : 18.8%).

RMN: ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 6.13 (br s, 1H), 4.17 (q, 2H), 1.42-1.05 (m, 7H); ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 166.1, 144.9, 111.1, 60.1, 12.4, 4.6, 2.0.

• Synthèse du cyclobutylidènéthanol

La synthèse du cyclobutylidènéthanol utilise la cyclobutanone (938 mg) comme composé de départ. Les réactions engagées sont les mêmes que pour l'obtention du cyclopropylidènéthanol, hormis la déprotection initiale. Le cyclobutylidène acétate d'éthyle est obtenu avec un rendement de 53% (996 mg).

RMN: ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 5.63 (m, 1H), 4.21 (q, 2H), 3.22 (tt, 2H), 2.92 (tt, 2H), 1.15 (t, 3H), 0.81 (ddd, 4H); ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 85.1, 61.8, 15.2, 13.8.

Le cyclobutylidènéthanol est lui obtenu avec un rendement de 22,6% (157 mg) par la mise en œuvre de 996 mg de cyclobutylidène acétate d'éthyle.

RMN : ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 5.30 (m, 1H), 3.96 (dt, 2H), 2.66 (dt, 4H), 1.94 (m, 2H); ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 155.0, 119.2, 59.4, 31.1, 29.3, 17.1.

• Synthèse du cyclopentylidènéthanol

De la même façon, le cyclopentylidène acétate d'éthyle est obtenu avec un rendement égal à 59%, correspondant à une masse de 1,819 g de produit purifié, à partir de 1,7 g de cyclopentanone.

Le cyclopentylidènéthanol est obtenu avec un rendement de 55,6% récupéré soit 251 mg à partir de 920 mg de cyclopentylidène acétate d'éthyle.

4 Synthèse du FPP

2,66 g de tétrabutylammonium diphosphate sont dissouts dans 7,25 mL d'acétonitrile sous agitation dans un ballon de 25 mL. 380 µL de chlorure de farnésyle sont ajoutés à la seringue ; le ballon est alors mis sous azote et agité pendant 2 h à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite évaporé et le résidu solide purifié sur colonne de silice (200 mL de silice sèche) avec comme éluant le mélange isopropanol/ammoniaque (NH₄OH 32%)/eau, 6/3/1. Les fractions sont analysées sur CCM et celles contenant le FPP sont réunies, évaporées et lyophilisées sur la nuit. Le solide blanchâtre obtenu est passé sur colonne échangeuse d'ions DOWEX® 50WX8 sous la forme protonée (25 mL de résine sèche) équilibrée avec une solution 25 mM de carbonate d'ammonium (CO₃(NH₄)₂). Après élution avec cette même solution, les fractions contenant le FPP sous forme de sels d'ammonium sont réunies et lyophilisées. Le solide blanchâtre obtenu est purifié sur colonne de silice phase inverse (RP-18, 20 mL de silice RP-18 sèche) équilibrée avec un mélange 90/10, eau /tétrahydrofurane (THF). L'élution se fait par étapes avec un gradient de THF dans l'eau 10/90, puis 25/75, puis 50/50, puis 75/25 et finalement 100% de THF. Le FPP est élué avec le mélange 50/50. Après évaporation du THF et lyophilisation on obtient 360 mg d'un solide blanc (rendement 57,5%).

RMN : ¹H (D₂O. NH₄OD, 300.13 MHz) δ (ppm) : 5.62 (t, J = 6.90 Hz, 1H), 5.31 (dt, J = 13.00, 6.50 Hz, 2H), 4.63 (m, 2H), 2.24 (m, 8H), 1.89 (s, 3H), 1.84 (s, 3H), 1.78 (s, 3H), 1.76 (s, 3H).

³¹P (D₂O. NH₄OD, 121.49 MHz) : δ –5.75, –9.72.

1.2.3 Mesure d'activité enzymatique

Activité phosphatase

La détermination de cette activité repose sur un test colorimétrique révélant l'hydrolyse du 4-nitrophénylphosphate ou para-nitrophénylphosphate (pNPP) par la phosphatase PhoN_{Xt}, en condition alcaline³⁶⁹. L'hydrolyse génère le 4-nitrophénol donnant lieu dans ces conditions à la forme phénolate. Cette dernière absorbe dans le domaine du visible (composé jaune en solution) dont le maximum d'absorption est à 402 nm (Figure 117). L'activité phosphatase est donc directement liée à la consommation du pNPP dans le milieu après ajout de l'enzyme d'intérêt.



Figure 117 : Test colorimétrique révélant l'activité phosphatase PhoNxt.

Une courbe étalon (Figure 118) a été réalisée à partir d'une solution de 4-nitrophénol en tampon A dont le pH a été ajusté à 7,5. Une gamme de concentration comprise entre 0 et 150 μ M en 4-nitrophénol a été préparée (duplicat) afin d'en déterminer, dans ces conditions, le coefficient d'extinction molaire à 402 nm.



Figure 118 : Courbe étalon du 4-nitrophénol, produit de la réaction d'hydrolyse par PhoNxt.

La courbe étalon ainsi obtenue permet de définir $\mathcal{E}_{4-nitrophénol}$ - le coefficient d'extinction molaire du 4-nitrophénol en solution dans le tampon A – comme étant égal à 0,0129 μ M⁻¹ soit 12900 M⁻¹ à pH égal à 7,5.

L'activité phosphatase consiste ainsi à mesurer l'absorbance à 402 nm d'une solution à 500 mM initial en pNPP (solution stock à 1 mM) à laquelle ont été ajoutés 40 µg d'enzyme purifiée. Le suivi cinétique est réalisé en cuve sur le spectrophotomètre Nanodrop-2000c durant 2 min, avec un intervalle de 5 sec entre chaque point de mesure. La pente ainsi obtenue confrontée au coefficient $\mathcal{E}_{4-nitrophénol}$ conduit à la détermination de la vitesse de production du 4-nitrophénol en condition alcaline et de ce fait à l'activité phosphatase (en µmol/min/mg d'enzyme).

Activité kinase

L'activité kinase est déterminée par mesure de l'absorbance à 340 nm grâce au couplage de la réaction de phosphorylation catalysée par l'IPK_{Mv} ou ThiM_{Ec} à la conversion du phosphoénolpyruvate (PEP) en lactate, par action du système enzymatique pyruvate kinase/lactate déshydrogénase (PK/LDH). Brièvement, la phosphorylation est dépendante d'ATP qui est régénéré *in situ* lors de l'hydrolyse du PEP par la PK. La conversion du pyruvate, ainsi obtenu, en lactate par la LDH induit l'oxydation de NADH (caractérisé par une absorbance maximale à 340 nm) en NAD⁺ n'absorbant pas à cette longueur d'onde. De ce fait, l'activité de l'IPK_{Mv} est directement liée à la consommation de NADH et donc à la décroissance de l'absorbance à 340 nm (Figure 119).



Figure 119 : Principe du test d'activité kinase appliqué à l'IPK_{Mv}.

Dans les conditions du test d'activité, le coefficient d'extinction molaire \mathcal{E}_{NADH} est égal à 6220 M⁻¹. Ces conditions sont décrites dans le Tableau 28.

Composé	Concentration/Masse/Unité enzymatique de travail
KCl	100 mM
ATP	4 mM
IP/ IOH	1 mM
PEP	2 mM
NADH	210 µM
PK/LDH	3-5 U/4,5-7 U
Kinase	20 µg
Tampon A	QSP 1mL

Tableau 28 : Conditions expérimentales du test d'activité kinase.

Le suivi cinétique est réalisé en cuve (Nanodrop-2000c) durant 10 min, avec un intervalle de 5 sec entre chaque point de mesure. La détermination de la vitesse de consommation du NADH et de ce fait l'activité kinase (en μ mol/min/mg d'enzyme) sont déduites de la pente obtenue à l'issue du suivi cinétique à 340 nm et du coefficient $\mathcal{E}_{\text{NADH}}$.

Activité prényl transférase, terpène synthase

Les activités des prényl transférases et terpène synthases - mises en jeu dans ces travaux de thèse - sont déterminées à l'aide du test colorimétrique au vert de malachite couplé à une pyrophosphatase inorganique (PPase, *Saccharomyces cerevisiae*)³⁷⁰. Ce test est basé sur la capacité des enzymes étudiées à générer du diphosphate (noté PPi), hydrolysé par la PPase inorganique en orthophosphate (PO₄³⁻ ou Pi). Les ions phosphates acidifiés (H₃PO₄) se complexent à l'acide molybdique (en excès). Le complexe phosphomolybdique ainsi obtenu forme une paire d'ions avec le vert de malachite (en excès) et cette dernière présente un maximum d'absorbance à 623 nm (vert en solution).

L'application de ce test pour la détermination de l'activité de la prényl transférase FtmPT1 et de l'activité terpène synthase (sesquiterpène synthase) est illustrée sur la Figure 120.



Figure 120 : Application du test au vert de malachite à la détermination de l'activité prényl transférase FtmPT1_{Af} (haut) ou terpène synthase (bas).

Deux courbes étalon ont été réalisées (Figure 121) à partir d'une solution de Pi, produit final de la réaction dont l'association avec le vert de malachite est à l'origine de ce test colorimétrique et d'une solution de PPi en présence de pyrophosphatase, produit direct de la réaction étudiée. Ces deux courbes doivent être superposables puisque l'hydrolyse du PPi donne lieu à deux groupement Pi. Les solutions utilisées pour cet étalonnage consistent en une solution de phosphate et diphosphate séparément en tampon B (dont le pH a été ajusté à 7,5). Les concentrations testées sont comprises entre 0 et 12,5 μ M.



Figure 121 : Courbes étalons du phosphate ou diphosphate dans les conditions expérimentales, en présence de PPase.

Composé	Activité prényl	Activité prényl	Activité terpène
compose	transférase $FtmPT1_{Af}$	transférase FPPS _{GS}	synthase
BF (en DMSO)	100 μM (0,2% DMSO)		
DMAPP	100 μΜ	100 μΜ	
IPP		200 μΜ	
FPP			100 μΜ
PPase	0,2 U	0,2 U	0,2 U
Tampon B	QSP 760 μL	QSP 760 μL	QSP 760 μL
Enzyme	0,01-0,3 μM	0,01-0,3 μM	0,01-0,3 μM
	Incubation 30	0 min à 30°C	
Solution de révélation	240 µL	240 μL	240 µL
Incubation 15 min à te	Incubation 15 min à température ambiante et mesure de l'absorbance à 623 nm (Nanodrop 2000c)		

Tableau 29 : Conditions du test colorimétrique au vert de malachite selon le type d'enzyme étudié.

L'activité de l'enzyme étudiée (en µmol/min/mg) est alors déduite de la mesure d'absorbance à 623 nm corrélée à la concentration en orthophosphate libéré durant les 30 premières minutes de la réaction enzymatique. Pour cela, la réaction est stoppée par ajout de la solution de révélation. Préparée extemporanément, cette dernière est un mélange constitué de :

- 10 mL d'une solution de sel d'oxalate de vert de malachite*,
- 2,5 mL d'une solution de molybdate d'ammonium 7,5%,
- 200 µL d'une solution de Tween 20 11%.

*La solution de sel d'oxalate de vert de malachite consiste à mélanger 300 mL d'acide sulfurique 18 M à 1,5 L d'eau distillée, une fois le mélange revenu à température ambiante 2,2 g de sel d'oxalate de vert de malachite sont ajoutés. Cette solution stock est conservée 1 an à température ambiante, dans une bouteille ambrée.

1.2.4 Bioconversions in vitro

Quelles que soient les expériences décrites au cours de ce manuscrit, les bioconversions sont menées à deux échelles :

- En tube Eppendorf[®] de 1,5 mL: mise au point des conditions optimales permettant d'atteindre le taux de conversion et le rendement le plus élevé. Le suivi cinétique est mené par analyse en CCM et analyse en phase liquide (HPLC en phase inverse, KNAUER PLATINblue, détecteur de type PDA*) ou gazeuse (GC, shimadzu 2014) selon le produit d'intérêt. Les tubes sont placés dans un bain sec dont la température, l'agitation et la durée de réaction sont préalablement réglés.
- En ballon de 100 mL ou 50 mL : montée en échelle réalisée pour l'expérience optimale en Eppendorf[®]. La température et l'agitation sont contrôlés par un bain d'huile chauffé à l'aide d'un agitateur magnétique à plaque chauffante doté d'un thermomètre. De la même façon qu'en Eppendorf[®], le suivi cinétique est génralement réalisé qualitativement (CCM) et quantitativement (HPLC en

^{*} PDA: Photodiode Array Detector

phase inverse ou CPG). En fin de réaction, le produit d'intérêt est purifié afin d'en estimer la qualité (analyse par RMN) et la quantité produite (rendement en produit isolé).

Les méthodes analytiques mises en place pour le suivi cinétique de chaque type de bioconversion seront décrites dans la partie qui leur est associée.

Synthèses in vitro de tryprostatine B impliquant PhoN_{xt}

Les réactifs et cofacteurs impliqués dans ces synthèses sont en solution dans le tampon A dont le pH est ajusté systématiquement à 7,5. Seuls l'alcool DMAOH et la BF sont préparés dans du DMSO à une concentration permettant de ne pas excéder 10% de DMSO dans le mélange réactionnel final. Les intermédiaires tels que le DMAP, le DMAPP et la BF sont synthétisés chimiquement selon les protocoles décrits dans la partie 1.2.2. Les enzymes en solution dans du tampon A sont purifiées fraichement.

Cette cascade multienzymatique a été développée étape par étape, permettant d'incrémenter une par une les enzymes de la cascade et d'optimiser pas à pas la synthèse de TB (Tableau 30, Tableau 31, Tableau 32, Tableau 33). A l'issue de chaque montée en échelle, le mélange réactionnel est extrait par 3x50 mL d'acétate d'éthyle et la phase organique est ensuite lavée à l'eau et séchée sur sulfate de sodium anhydre. Après filtration et évaporation sous pression réduite, la TB est purifiée sur colonne de gel de silice (éluant 9/1 acétate d'éthyle/méthanol). Une analyse par RMN du solide obtenu permet d'en valider la structure et la pureté et d'ainsi établir un rendement en produit isolé.

Le suivi cinétique est mené dans le cadre des expériences visant à l'optimisation mais également pour les synthèses à l'échelle préparative. Il consiste en :

- Un suivi qualitatif : CCM silice, éluant 9/1 acétate d'éthyle/méthanol.
- Un suivi quantitatif: HPLC en phase inverse, système KNAUER PLATINblue équipé d'un détecteur à barrette de diodes (PDA) permettant la détection simultanément à différentes longueurs d'onde (210, 230, 260 et 280 nm). 100 µL de mélange réactionnel sont prélevés puis dilués par 200 µL d'une solution d'indole (étalon interne) à 5 mM dans l'acétonitrile. Le tout est centrifugé à 12500 rpm pendant 3 min avant injection sur une colonne du fournisseur 226

Macherey-Nagel de type Nucleodur C18-Gravity-SB (100 mm x 2 mm, 1,8 mm) chauffée à 50°C. L'éluant consiste en un mélange 6/4 eau/méthanol délivré avec un débit de 0,3 mL/min. Dans ces conditions, les temps de rétention observés pour la BF, l'étalon interne et la TB sont respectivement égaux à 2,3 min, 4,0 min et 16,0 min Une courbe étalon à 280 nm a été réalisée à partir de BF synthétisée chimiquement.

🖊 Synthèse à partir de DMAPP et BF

Tableau 30 : Mise au point de la synthèse de TB en une étape enzymatique catalysée par FtmPT1_{Af}.

1) En tubes Eppendorf®	
Composé	Concentration finale/Masse de travail
BF (DMSO)	10 mM
DMAPP	20 mM
FtmPT1 _{Af}	0/22/55/110/ 220 μg
Tampon A	QSP 1 mL
Incubation à 37°C, 1000 rpm, 24 h	

Tableau 31 : Synthèse de TB en une étape enzymatique catalysée par FtmPT1_{Af}.

2) Montée en échelle en ballon de 100 mL		
Composé	Concentration finale/Masse de travail	
BF (DMSO)	10 mM	
DMAPP	20 mM	
FtmPT1 _{Af}	7,7 mg	
Tampon A	QSP 35 mL	

Les réactifs pesés puis solubilisés respectivement dans du DMSO (solution de BF) et du tampon A (solution de DMAPP) sont introduit dans le ballon et laissés à 37°C, 400 rpm durant 15 min. La synthèse commence (t₀) par l'ajout de l'enzyme purifiée FtmPT1_{Af}. Le mélange réactionnel est ainsi incubé durant 1h, à 37°C et 400 rpm. Le rendement en TB isolée atteint 92% (114 mg).

4 Synthèse à partir de DMAP et BF

Tableau 32 : Mise au point de la synthèse à deux enzymes (IPK_{Mv} et FtmPT1_{Af})

1) En tubes Eppendorf®	
Composé	Concentration finale/Masse/Unité enzymatique de travail
BF (DMSO)	10 mM
DMAP	20 mM
ATP	20 mM
FtmPT1 _{Af}	220 μg
ІРК _{мv}	0/10/20/ 50 /100 μg
Tampon A	QSP 1 mL
	Incubation à 37°C, 1000 rpm, 24 h

La synthèse optimale dans les conditions testées (quantité d'IPK_{Mv} = 50 μ g) en temps /rendement /taux de conversion est sélectionnée pour la synthèse à l'échelle préparative (volume final 35 mL dans un ballon de 100 mL). Le mode opératoire suivi est le même que développé dans le cadre de la synthèse à partir du DMAPP et de la BF, l'ajout d'enzymes déclenchant la réaction achevée en 1 h. Ainsi, la TB est obtenue avec un rendement en produit isolé de 85% (105 mg).

🖊 Synthèse à partir de DMAOH et BF

1) En tubes Eppendorf®	
Composé	Concentration finale/Masse/Unité enzymatique de travail
BF (DMSO)	10 mM
DMAOH (DMSO)	20 mM
АТР	40 mM
FtmPT1 _{Af}	220 μg <i>(0,14 U)</i>
IPK _{Mv}	50 μg <i>(0,2 U)</i>
PhoN _{xt}	17,5 (0,015 U) /42,5 (0,034 U)/85 μg (0,068 U)
Tampon A	QSP 1 mL
	Incubation à 37°C, 800 rpm, 24 h

Tableau 33 : Développement de la cascade à trois enzymes.

Deux ajouts d'ATP (0.015 mmoles) sont réalisés en cours de réaction (t = 2 h et t = 6 h). La synthèse optimale dans les conditions testées (quantité de PhoN_{Xt} = 17,5 μ g) en temps /rendement /taux de conversion est sélectionnée pour la synthèse à l'échelle préparative (volume final 35 mL dans un ballon de 100 mL). 98 mg de TB sont obtenus après extraction et purification à l'issue de 24 h de réaction, correspondant à un rendement en produit isolé de 79%.

Plan factoriel complet 2³

Afin d'améliorer le système à 3 enzymes permettant la synthèse de TB, un plan factoriel complet a été choisi pour déterminer les facteurs et interactions importants. La réponse étudiée est le taux de conversionde la BF atteint en 24 h à partir des substrats DMAOH et BF en présence d'un système de recyclage de l'ATP. Pour cela, un plan factoriel complet de type 2³ a été développé dont la matrice d'expériences est présentée ci-dessous.

Evnórioncoc	X ₁	X ₂	X ₃
Experiences	[DMAOH] (mM)	PhoN _{Xt} (U)	FtmPT1 _{Af} (U)
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
Niveau -1	10	0.033	0.0525
Niveau +1	30	0.099	0.21

Tableau 34 : Matrice d'expériences du plan factoriel 2³ appliqué à la synthèse *in vitro* de la TB.

Les essais sont réalisés en Eppendorf[®] avec un volume réactionnel de 1 mL, le tampon A est utilisé et l'ensemble des solutions impliquées sont préparées à partir de ce tampon sauf précisions contraires. Ce milieu réactionnel a pour base commune un système de recyclage de l'ATP *in situ* composé d'ATP à 4 mM, de PEP à 40 mM et de PK (30 à 50 U soit 50 μL), une concentration en BF (en solution dans le DMSO) fixée à 10 mM et une quantité d'enzyme IPK_{Mv} fixée à 0.26 unité enzymatique (U). Chaque essai se différencie par la proportion de DMAOH (en solution dans le DMSO), de PhoN_{Xt} et de FtmPT1_{Af} fixées par le plan d'expériences. Les enzymes sont ajoutées au dernier moment déclenchant ainsi la réaction en cascade de synthèse de la TB. Les tubes sont incubés à 37°C, 800 rpm durant 24 h et un suivi cinétique par prélèvement pour analyse par HPLC en phase inverse et CCM est mené tel que décrit dans l'introduction de cette partie. L'analyse statistique permettant d'établir l'influence ainsi que les interactions entre les facteurs choisi est réalisée à l'aide du logiciel AZURAD®. De ce plan d'expériences, deux bioconversions supplémentaires à l'échelle préparative ont été engagées dont les conditions sont répertoriées au sein du Tableau 35. Le protocole ainsi que le suivi cinétique sont menés à l'identique de ce qui a été développé précédemment.

	Synthèse bass	e concentration en	Synthèse haute co	ncentration en PhoN _{Xt}
	PhoNxt			
Composé	Concentration	finale/Masse/Unité	Concentration	finale/Masse/Unité
	enzymatique de t	travail	enzymatique de ti	ravail
BF (DMSO)	10 mM		10 mM	
DMAOH	30 mM		30 mM	
(DMSO)				
АТР	40 mM		40 mM	
PEP	40 mM		40 mM	
РК	5,25-8,75 kU		5,25-8,75 kU	
FtmPT1 _{Af}	0,21 U		0,21 U	
ΙΡΚ _{Μν}	0,26 U		0,26 U	
PhoN _{xt}	0,033		0,099	
Tampon A	QSP 35 mL		QSP 35 mL	
	Incubation à 37°C, 400 rpm, 24 h			
Rendement en		8506		600/
TB isolée	0370		0770	

Tableau 35 : Conditions des synthèses préparatives engagées à l'issue du plan d'expériences.

Synthèses *in vitro* de tryprostatine B impliquant Thi M_{Ec} *via* la Mini-voie 2.0

Les méthodes analytiques (HPLC et CCM) décrites précédemment sont utilisées à l'identique dans le cadre de la synthèse de tryprostatine B *via* la Mini-voie des terpènes 2.0.

🖊 Synthèses à partir de DMAOH et BF

1) En tubes Eppendorf®	
Composé	Concentration finale/Masse/Unité enzymatique de travail
BF (DMSO)	10 mM
DMAOH (DMSO)	20 mM
ATP	40 mM
	ou Recyclage 4 mM ATP/ 40 mM PEP/ PK 30 à 50 U
	ou Recyclage 10 mM ATP / 30 mM PEP / PK 30 à 50 U
	ou Recyclage 20 mM / 20 mM / PK 30 à 50 U
FtmPT1 _{Af}	0,2 U
IPK _{Mv}	0,2 U
PhoN _{xt}	0,2 U
Tampon A	QSP 1 mL
	DMSO 10 %
	Incubation à 37°C, 800 rpm, 24 h
Su	ivi par CCM sur silice, éluant acétate d'éthyle/méthanol 9/1

Tableau 36 : Premiers essais de synthèse de TB via la mini-voie 2.0.

Les conditions impliquant 40 mM d'ATP uniquement et le système de recyclage 4/40 sont réalisées une nouvelle fois en tubes Eppendrof[®] et ont permis un suivi cinétique par analyse de prélèvements à 0/0,5/1/2/4 et 6h en HPLC, dans les conditions décrites précédemment.

2) A l'échelle préparative	
Composé	Concentration finale/Masse/Unité enzymatique de travail
BF (DMSO)	10 mM – 50 mg
DMAOH (DMSO)	20 mM
ATP	Recyclage 4 mM ATP/ 40 mM PEP/ PK 30 à 50 U
FtmPT1 _{Af}	0,2 U
IРК _{мv}	0,2 U
PhoN _{xt}	0,2 U
Tampon A	QSP 17 mL
	DMSO 10 %
	Incubation à 37°C, 800 rpm, 24 h
Suiv	i par CCM sur silice, éluant acétate d'éthyle/méthanol 9/1

Tableau 37 : Première synthèse préparative via la mini-voie des terpènes 2.0

Après extraction et purification de la tryprostatine B, 58,4 mg de produit purifié ont été obtenu correspondant à un rendement en produit isolé égal à 92 %.

4 Synthèses à partir de DMAOH, de dérivés cycliques et de BF

1) En tubes Eppendorf®		
Composé	Concentration finale/Masse/Unité enzymatique de travail	
BF (DMSO)	10 mM	
DMAOH		
Cycloprylidènéthanol	20 mM (on solution dona lo DMSO)	
Cyclobutylidènéthanol		
cyclopentylidènéthanol		
ATP	Recyclage 4 mM ATP/ 40 mM PEP/ PK 30 à 50 U	
FtmPT1 _{Af}	0,2 U	
IPK _{Mv}	0,2 U	
PhoN _{xt}	0,2 U	
Tampon A	QSP 1 mL	
	DMSO 10 %	
Incubation à 37°C, 800 rpm, 24 h		
Suivi par CCM sur silice, éluant acétate d'éthyle/méthanol 9/1		

Tableau 38 : Synthèse de TB et d'analogues cycliques à l'échelle analytique par la MVT 2.0.

2) A l'échelle préparative	
Composé	Concentration finale/Masse/Unité enzymatique de
	travail
BF (DMSO)	10 mM – 50 mg
cyclobutylidènéthanol	20 mM
(DMSO)	
ATP	Recyclage 4 mM ATP/ 40 mM PEP/ PK 30 à 50 U
FtmPT1 _{Af}	0,2 U
IPK _{Mv}	0,2 U
PhoN _{xt}	0,2 U
Tampon A	QSP 17 mL
	DMSO 10 %
	Incubation à 37°C, 800 rpm, 24 h
Suivi par	r CCM sur silice, éluant acétate d'éthyle/méthanol 9/1

Tableau 39 : Synthèse préparative du dérivé cyclobutyle de la TB

Le même protocole d'extraction et de purification appliqué et décrit dans le cas de la TB est appliqué à son dérivé cyclobutyle permettant l'obtention de 44,7 mg correspondant à un rendement en produit isolé égal à 72,4 %.

Synthèses in vitro de FPP et de son dérivé cyclobutyle

Les réactifs et cofacteurs impliqués dans ces synthèses sont en solution dans le tampon A dont le pH est ajusté systématiquement à 7,5. Seuls les alcools IOH et DMAOH et cyclobutylidènéthanol sont préparés dans du DMSO à une concentration permettant de ne pas excéder 10% de DMSO dans le mélange réactionnel final. Les intermédiaires tels que le DMAP, le DMAPP, FPP mais également le substrat cyclique sont synthétisés chimiquement selon les protocoles décrits dans la partie 1.2.2. Les enzymes en solution dans du tampon A sont purifiées fraichement.

Pour l'ensemble de ces expériences à l'échelle analytique, les bioconversions sont menées sur 24 h, à 37 °C en bain sec, à une agitation de 800 rpm. A 24 h, les échantillons sont mis à lyophilisés sur la nuit. Le lendemain, les solides obtenus sont repris dans du tampon A et mis en présence de 0,2 U de PhoN_{xt} permettant la déphosphorylation du FPP formé mais également des intémédiaires en C₅. La déphosphorylation est conduite sur 24 h, dans un volume total de 1 mL, à 37°C en bain sec et sous une agitation fixée à 800 rpm. déphosphorylation validée CCM silice La est par sur (élutant 10/1dichlorométhane/acétate d'éthyle). La totalité du mélange réactionnel est extrait par 500 mL d'une solution de géraniol à 6 mM dans le MtBE, soit un rapport volumique entre échantillon et phase organique de 2/1. L'extraction est permise par un passage de 20 secondes sur Vortex puis une étape de centrifugation de 60 secondes à 12500 rpm permet de récupérer la phase organique pour analyse en CPG.

L'analyse est réalisée sur une CPG Schimadzu 2014 :

- Colonne Optima-delta3, Macherey-Nagel
- Passeur d'échantillon : AOC-20S Schimadzu Auto Sampler
- Injecteur : AOC 20i Schimadzu Auto injector
- Température injecteur / détecteur : 250 °C
- Volume injecté 1 μL
- Programme : 55 °C (4 min)-15 °C/min-190 °C (20 min)
- Tr FOH : 17,2 min et Tr GOH : 11,10 min

Cette méthode analytique permet de quantifier le FPP formé, à partir du farnésol observé en CPG. Une gamme étalon a été générée à partir d'une solution de GOH et de FOH afin de pouvoir quantifier le FPP produit.

Synthèses de FPP en fonction de la quantité de FPPSGs, de la nature du cation divalent et de la concentration en magnésium

Α	В	С
Quantité de FPPS _{Gs}	Nature du cation divalent	Concentration en MgCl ₂
DMSO 3,4 %	DMSO 3,4 %	DMSO 3,4 %
DMAOH 5 mM	DMAOH 5 mM	DMAOH 5 mM
IOH 10 mM	IOH 10 mM	IOH 10 mM
PEP 40 mM	PEP 40 mM	PEP 40 mM
ATP 4 mM	ATP 4 mM	ATP 4 mM
PK 30 à 50 U	PK 30 à 50 U	PK 30 à 50 U
MgCl ₂ 10 mM	MgCl ₂ 10 mM ou MnCl ₂ 10 mM	MgCl ₂ 10/20 mM
ThiM _{Ec} 0,2 U	$ThiM_{Ec}$ 0,2 U	ThiM _{Ec} 0,2 U
IPK _{Mv} 0,2 U	IPK _{Mv} 0,2 U	IPK _{Mv} 0,2 U
FPPS _{Gs} 0,2/0,3/0,4 U	FPPS _{Gs} 0,2 U	FPPS _{Gs} 0,2 U
Tampon A qsp 1 mL	Tampon A qsp 1 mL	Tampon A qsp 1 mL

Tableau 40 : Essais en Eppendorf[®]pour la synthèse de FPP *via* la MVT 2.0

Plan d'expériences pour le criblage des facteurs influençant le rendement en FPP

Afin d'étudier quels sont les facteurs permettant de conduire à un rendement maximal de FPP, un criblage *via* une matrice d'Hadamard a été réalisé. Ce plan d'expériences comporte 7 facteurs à 2 niveaux et génère ainsi la matrice d'expériences suivante.

Ехр	X1 [DMAOH] (mM)	X2 [Mg ²⁺] (mM)	X3 pH	X4[Mn ²⁺] (mM)	X5 [NH4Cl] (mM)	X ₆ FPPS (U)	X7 Ajout [Mg ²⁺] (mM)
1	+	+	+	-	+	-	-
2	+	+	-	+	-	-	+
3	+	-	+	-	-	+	+
4	-	+	-	-	+	+	+
5	+	-	-	+	+	+	-
6	-	-	+	+	+	-	+
7	-	+	+	+	-	+	-
8	-	-	-	-	-	-	-
Niveau -1	2,5	10	7,5	0	0	0,2	0
Niveau +1	5	15	8	2	20	0,3	10

Tableau 41 : Matrice d'expériences pour le criblage de différents facteurs influençant le rendement en FPP.

Les essais sont réalisés en Eppendorf[®] avec un volume réactionnel de 1 mL, l'expérience 2 est conduite en duplicat. L'ensemble des solutions impliquées dans ce criblage sont préparées à partir de ce tampon sauf précisions contraires. Le milieu réactionnel a pour base commune un système de recyclage de l'ATP in situ composé d'ATP à 4 mM, de PEP à 40 mM et de PK (30 à 50 U soit 50 µL), une concentration IOH (en solution dans le DMSO) fixée à deux fois celle en DMAOH et une quantité de kinases égale à 0,2 unité enzymatique (U). La concentration en DMSO est maintenue constante et égale à 3,4 % du volume total réactionnel. Les enzymes sont ajoutées au dernier moment déclenchant ainsi la réaction en cascade de synthèse de FPP. La quantification du FPP formé rendue est possible par la succession des étapes de lyophilisation/déphopshorylation/extraction décrites précédemment. L'analyse statistique permettant d'établir l'influence de ces différents facteurs est réalisée à l'aide du logiciel AZURAD[®].

Synthèses à l'échelle préparative de FPP et son dérivé cyclobutyle

	Synthèse de FPP	Synthèse de cyclobutyl-FPP
Composé	Conditions	Conditions
OMSO	3,4 %	3,4 %
DMAOH/		
cyclobutylidènéthanol	5 mM	5 mM
(DMSO)		
IOH (DMSO)	10 mM	10 mM
АТР	4 mM	4 mM
PEP	40 mM	40 mM
РК	330 - 550 U	330-550 U
ThiM _{Ec}	0,2 U	0,2 U
IPK _{Mv}	0,2 U	0,2 U
FPPS _{Gs}	0,3 U	0,3 U
MgCl ₂	10 mM	10 mM
Tampon A	QSP 11 mL	QSP 11 mL
	Incubation à 37°C, 400 r	pm, 24 h

Tableau 42 : Conditions expérimentales pour la synthèse à l'échelle préparative de FPP et de son dérivé cyclique.

Extraction et purification du FPP et de son dérivé cyclique

Les réactions sont arrêtées au bout de 24h. Le solide blanc formé est récupéré par centrifugation et repris dans 0,7 mL de carbonate d'ammonium 25 mM. L'ensemble des suspensions ainsi obtenues est déposé sur une colonne échangeuse d'ions DOWEX® 50WX8 sous la forme H⁺ (25 mL de résine sèche) équilibrée avec une solution 25 mM de carbonate d'ammonium (CO₃(NH₄)₂). Après élution avec le même tampon, les fractions contenant le FPP sous forme de sels d'ammonium sont réunies et lyophilisées. Le solide blanchâtre obtenu est purifié sur colonne de silice phase inverse (RP-18, 20 mL de silice RP-18 sèche) équilibrée avec un mélange 90/10, eau /tétrahydrofurane (THF). L'élution se fait étape par étapes avec un gradient de THF dans l'eau 10/90, puis 25/75, puis 50/50, puis 75/25 et finalement 100% de THF.

Le FPP est élué de la colonne avec le mélange 50/50. Après évaporation du THF et lyophilisation on obtient 24,5 mg d'un solide blanc (rendement 66,7%).

Le dérivé cyclobutyle est récupéré et purifié de la même façon que pour le FPP issu de la synthèse enzymatique. La seule différence repose sur le mélange permettant l'élution du dérivé cyclique, qui est cette fois un mélange dans les porportions suivantes : 75/25 THF dans l'eau. Après évaporation du THF et lyophilisation, 10,7 mg d'un solide blanc (rendement 43,8%) sont obtenus.

Synthèses in vitro de sesquiterpènes fongiques

Les premiers essais avec les TS-1 à 5 de *L. menziesii* ont été réalisés sur du FPP synthétisé chimiquement (voir partie 1.2.2 de cette section expérimentale) à 20 mM, en solution dans le tampon A. 450 μ L de chaque solution d'enzyme purifiée sont ajoutés dans le milieu réactionnel. Un contrôle ne comportant que l'enzyme en solution dans le tampon ou le FPP de synthèse en absence d'enzyme est également réalisé. Le volume total est fixé à 500 μ L et bioconversions sont conduites à 37° C (bain sec), durant 24 h sous une agitation de 800 rpm. A l'issue des 24 h de réaction, le contenu de chaque tube Eppendorf[®] soit 500 μ L est extrait au diéthyl éther (300 μ L) par un passage de 20 secondes sur Vortex puis une étape de centrifugation de 60 secondes à 12500 rpm. La phase organique est ainsi récupérée et analysée.

Le programme pour l'analyse des échantillons ainsi collectés est le suivant : 55 °C (4 min)-7 °C/min-190°C (20 min), toutes choses demeurant égales, par ailleurs, aux conditions décrites précédemment.

Composé	Conditions
DMSO	3,4 %
DMAOH (DMSO)	5 mM
IOH (DMSO)	10 mM
ATP	4 mM
PEP	40 mM
РК	30-50 U
ThiM _{Ec}	0,2 U
IРК _{мv}	0,2 U
FPPS _{Gs}	0,3 U
TS-1	0,2 U
MgCl ₂	10 mM
Tampon A	QSP 1 mL

Tableau 43 : Première synthèse à l'échelle analytique d'un sesquiterpénoïde *via* la MVT 2.0, à laquelle ont été ajoutées la FPPS_{Gs} et la TS-1 de *L. menziesii*.

La bioconversion est conduite dans les mêmes conditions de température, d'agitation et de durée de réaction que précédemment. A l'issue des 24 h de réaction, la totalité du mélange réactionnel est extraite au pentane (ration phase organique/phase auqueuse = ½), le procédé d'extraction reste identique par ailleurs à ce qui a déjà été décrit. La composition de l'échantillon ainsi collecté est analysé par CPG.

1.2.5 Étude de l'activité phosphatase de PhoN_{Xt} par analyse en RMN ³¹P

L'activité phosphatase de PhoN_{Xt} a été testée sur l'ensemble des composés phosphorylés (ATP/ADP/AMP, DMAP/DMAPP, PEP) pouvant être présent au cours de la synthèse *in vitro* mise au point pour l'obtention de TB. Une étude cinétique a été entreprise par RMN ³¹P.

Pour chaque composé phosphorylé dont l'hydrolyse par PhoN_{Xt} est étudiée, le mélange réactionnel est réalisé en tubes Eppendorf[®] de 2 mL et consiste en 20 mM de substrat phosphorylé (en solution dans le tampon A dont le pH est ajusté à 7,5), un volume de tampon A de telle sorte à atteindre un volume réactionnel de 1,5 mL puis 0,2 U de PhoN_{Xt}. Les tubes sont alors placés dans un bain sec pour une incubation sur 24h, à 37°C et sous une agitation fixée à 800 rpm. L'ajout de l'enzyme déclenche la réaction. Les prélèvements sont faits à 0, 1, 2, 4, 6 et 24h puis dilués au demi par du DMSO-d₆ permettant le suivi de l'hydrolyse par RMN ³¹P (*Paramètres d'acquisition des spectres RMN : 121,49 MHz, 27°C, 128 scans, D1 = 2 sec. Échantillon : 300 µL de mélange réactionnel supplémenté par 300 µL de DMSO-d₆).*

Conclusion générale

La capacité de la Nature à générer une immense diversité de composés fait d'elle un excellent chimiste¹. Parmi ces composés, les métabolites spécialisés tels que les polyphénols, les alcaloïdes, les polycétides ou les terpénoïdes, pour ne citer qu'eux, sont, depuis longtemps, au centre de l'attention. Ils sont en effet utiles à l'humanité dans de nombreux domaines comme ceux de la santé, des cosmétiques et de l'agro-alimentaire², du fait de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques. Longtemps extraits directement à partir de sources naturelles et notamment de plantes, ces produits d'intérêt ont, par la suite, été synthétisés chimiquement. Cependant, aucune de ces approches n'est parvenue à répondre à la demande croissante d'une production en quantité, à la fois économique et ancrée dans une démarche écologique³. Dans ce contexte, la recherche de nouvelles alternatives de production et d'accès facilités à des molécules naturelles s'est accentuée. L'une de ces alternatives repose sur le recours à la synthèse in vitro de produits naturels impliquant la purification des catalyseurs pour la conception d'une cascade enzymatique de toutes pièces⁷. Cette approche présente l'avantage de pouvoir maîtriser chaque paramètre de la cascade tels que les proportions de substrat(s), de cofacteur(s) et la nature de ce(s) dernier(s) afin de mieux appréhender le système et d'en identifier les éléments clés. Il est également plus facile de se focaliser sur l'optimisation de la voie artificielle de biosynthèse en elle-même, n'ayant pas à se soucier de la viabilité cellulaire. D'une façon plus générale, la synthèse in vitro peut représenter une alternative de choix à l'ingénierie métabolique pour la production de composés difficilement synthétisés par des microorganismes³⁷¹.

C'est dans cette thématique que ces travaux de thèse se sont inscrits, en proposant une mini-voie artificielle pour la production de métabolites spécialisés particuliers que sont les terpénoïdes. Avec plus de 80 000 membres décrits à ce jour, cette famille de produits naturels – vouée à s'agrandir dans les années à venir – est la plus vaste et la plus diversifiée d'un point de vue structural et fonctionnel^{8,25,26}. Leurs voies de biosynthèse naturelles impliquent 18 enzymes, à partir du glucose, nécessaires à l'obtention de l'IPP et du DMAPP, les deux briques moléculaires de l'ensemble des terpénoïdes⁵³.

La mini-voie de biosynthèse artificielle des terpènes, que nous avons développée, utilise les alcools DMAOH et IOH en lieu et place du glucose. Elle permet, dans le cas d'une application *in vivo*, non seulement de minimiser le nombre d'étapes catalytiques nécessaires à l'obtention du DMAPP et de l'IPP, mais aussi de découpler les sources d'énergie et de carbone. Le choix de ces terpénols n'est pas anodin puisque basé d'une part, sur la similarité structurale qu'ils partagent avec les diphosphates ciblés et, d'autre part, sur leur production à l'échelle industrielle à faible coût et pouvant être biosourcée. De ce fait, cette alternative biosynthétique repose sur deux réactions de phosphorylation successives catalysées par PhoN_{Xt}, une phosphatase acide non spécifique de *X. translucens*, et l'isopentényl phosphate kinase de *M. vannielli* IPK_{Mv}. Afin de démontrer la faisabilité de la MVT, nous avons étendu cette cascade à une troisième enzyme - la prényl transférase d'*A. fumigatus* FtmPT1_{Af}. - permettant la *C*-prénylation de la Brévianamide F (BF) en Tryprostatine B (TB).

Dans un premier temps, le développement séquentiel de cette cascade a souligné que l'étape catalysée par PhoN_{xt} est l'étape limitante, du fait de la double activité de la phosphatase acide, capable d'hydrolyser l'ensemble des composés phosphorylés intervenant dans ce système. Le recours à la méthodologie du plan d'expériences a mis en évidence l'influence de la quantité de substrat DMAOH et de FtmPT1 sur le rendement final en TB. Une optimisation minime portant sur l'adaptation de la quantité d'ATP introduite dans le système, nous a permis de synthétiser une centaine de milligrammes de TB, en moins de 24 h. L'approche *in vitro* a permis de transposer les ajustements réalisés au développement *in vivo* et d'atteindre ainsi une concentration en TB de l'ordre de 800 mg/L dans *E. coli* en 24 h. Par comparaison, les travaux de Maiya et collaborateurs au sein d'*Aspergillus nidulans* ont conduit en moyenne à 220 mg/L de TB à partir de BF synthétisée *in cellulo*, en une semaine³⁴³. En termes de titre en produit d'intérêt, nous proposons donc une mini-voie artificielle efficace et fonctionnelle sans aucune ingénierie, à la fois *in vitro* mais également *in vivo*, faisant de la MVT un outil prometteur pour l'accès à des composés prénylés³⁷¹.

Par la suite, la propension de l'hydroxyéthylthiazole kinase ThiM d'*E. coli* à phosphoryler le DMAOH, a permis l'amélioration considérable de notre mini-voie. La version 2.0 de cette dernière convertit la totalité de la BF en TB et ce, en 1 h de réaction, soit 20 fois plus rapidement qu'en présence de PhoN_{Xt}, illustrant ainsi la puissance d'une alternative biosynthétique telle que la mini-voie 2.0, pour l'obtention de composés naturels d'intérêt. De plus, la flexibilité de cette nouvelle voie de biosynthèse a été étudiée et validée pour la synthèse du dérivé cyclobutyle de la TB, par introduction d'un nouvel alcool, le cyclobutylidènéthanol à la place du DMAOH, offrant ainsi l'accès à un espace chimique probablement plus large.

Concernant la synthèse de composés prénylés tels que la TB, il serait davantage valorisable de produire la BF à partir des deux acides aminés constitutifs *i.e.* la *L*-proline et le *L*-tryptophane *via* l'action de la peptide synthétase non ribosomale (NRPS) également nommée FtmPS. Cette dernière fait partie d'un cluster de gènes impliqué dans la biosynthèse de fumitrémorgines par *A. fumigatus*. Sa fonction en tant que brévianamide F synthétase a été confirmée expérimentalement par le groupe de Turner³⁴⁴. Outre la synthèse de TB que nous avons pris pour référence, il est possible d'étendre le champ d'application de la MVT à la production de nombreux autres composés prénylés, à partir d'autres cyclodipeptides que la BF, compte-tenu de la très grande diversité de prényl transférases existante et également du nombre croissant de nouvelles cyclodipeptides synthases caractérisées³⁷².

Enfin, une partie de ces travaux de thèse a initié d'une façon prometteuse la synthèse de sesquiterpènes par extension de la MVT 2.0. Nous avons ainsi produit le FPP - précurseur de l'ensemble des sesquiterpénoïdes - à partir des alcools en C₅, par introduction de la FPPS de *G. stearothermophilus* et également de son dérivé cyclobutyle. Le criblage de différents facteurs *via* un plan d'expériences a déterminé les conditions les plus favorables à la maximisation du rendement en FPP (45 %) et a permis d'engager une collaboration avec le laboratoire BBF (Biodiversité et Biotechnologie Fongiques) portant sur l'identification (BBF) et la caractérisation de nouvelles sesquiterpènes synthases fongiques (BiosCiences). *L. menziesii,* champignon de l'ordre des Polyporales, a été choisi comme organisme modèle et semble posséder dans son génome, 18 gènes codant des sesquiterpènes synthases putatives.

Nous avons sélectionné 6 d'entre eux et, après expression dans *E. coli* et purification des enzymes obtenues, nous avons mis en évidence une activité sesquiterpène synthase sur les TS-1, 2, 3 et 5 à partir de FPP issu d'une synthèse chimique. Chacune de ces enzymes génère un produit unique de réaction, soit un hydrocarbure, soit un alcool sesquiterpénique, exception faite pour la TS-2 qui génère deux composés majoritaires correspondant à ceux respectivement obtenus par action de la TS-1 et de la TS-3. Cela suggère un lien potentiel entre ces trois enzymes. La TS-1, ayant présenté une activité in vitro élevée et une production importante chez E. coli, a été introduite dans une cascade désormais à 4 enzymes. Par des analyses en CPG, nous avons validé l'obtention du même hydrocarbure sesquiterpénique que celui synthétisé par cette même enzyme à partir de FPP chimique. La prochaine caractérisation de ce produit permettra de valider ou non la structure actuelle proposée par GC-MS comme correspondant au thujopsène. De cette façon, nous disposons désormais d'un outil performant permettant à la fois l'accès à n'importe quel sesquiterpénoïde et le criblage de nouvelles sesquiterpènes synthases potentielles à l'identique de ce que nous avons engagé avec les terpène synthases de L. menziesii.

L'intérêt de la communauté scientifique pour le développement d'alternatives synthétiques offrant un accès facilité au DMAPP et à l'IPP comme nous le proposons avec la MVT 2.0, ne cesse de croître depuis deux ans. En parallèle de nos travaux^{315,316}, cinq autres groupes indépendants ont proposé un accès simplifié aux composés terpéniques^{345,371,373-375}. Ces différents travaux couplés aux nôtres donnent lieu à trois variantes : une première consistant en l'association de la kinase ThiM d'*E. coli* et d'une IPK^{371,373,375}, la seconde impliquant la choline kinase de *S. cerevisiae* et l'IPK d'*E. coli*³⁷⁴, enfin la troisième à l'image de la MVT développée dans notre groupe^{315,316} lie une phosphatase acide non spécifique et une IPK³⁷⁶. La validité et l'utilité de chacune de ces variantes est confirmée par la production respectivement de géraniol, de limonène, de farnésol et de lycopène³⁷³ (*in vivo*), de cannabinoïde³⁷¹ (*in vitro*), de taxadiène et lycopène³⁷⁴ et de lycopène et tryptophane prénylé³⁷⁶ (*in vivo*).

D'une manière plus générale, le développement d'une mini-voie à partir des alcools en C₅, permet de contourner le métabolisme natif en découplant la croissance cellulaire et la biosynthèse des isoprénoïdes. Il est à noter que le nombre réduit d'étapes et donc de catalyseurs, suscite un intérêt grandissant autour de ces alternatives biosynthétiques et permet d'envisager l'utilisation des méthodes d'ingénieries métabolique et enzymatique, auxquelles nous n'avons pas encore eu recours, offrant une marge d'amélioration/d'optimisation considérable de notre procédé. De plus, une grande diversité de produits peut être obtenue via la MVT 2.0 comme nous l'avons mis en évidence avec la synthèse de dérivés cyclobutyles de la TB et du FPP. Cette diversité est basée sur la promiscuité de substrats que présentent par exemple certaines kinases. Ainsi, Lund et collaborateurs ont publié très récemment une étude révélant la capacité de l'IPKTa à produire une vingtaine de monophosphates prénylés non-naturels³⁴⁵. Johnson et collaborateurs ont produit des analogues du farnésyl diphosphate in vitro, grâce à une synthèse « one-pot » impliquant la kinase ThiM d'E. coli et l'IPK de Methanocaldococcus jannaschii à partir de substrats non-naturels dérivés du DMAOH et de l'IOH (hydroxylation ou méthylation, allongement de la chaîne hydrocarbonnée)³⁷⁵.

Enfin, dans le cadre plus particulier de ces travaux de thèse, des expériences complémentaires permettraient d'étoffer les résultats présentés dans ce manuscrit. Il est par exemple pertinent de finaliser la caractérisation de notre MVT 2.0 en réalisant des études visant à obtenir les paramètres cinétiques relatifs à chaque couple enzyme/substrat (cycliques et non cycliques) impliqué dans cette cascade. Il est également prévu de poursuivre les travaux engagés sur la production de sesquiterpénoïdes et de façon plus générale de divers terpénoïdes avec par exemple la sélection d'un mono- et d'un diterpénoïde d'intérêt. Enfin, la collaboration avec le laboratoire BBF va se poursuivre grâce au projet récemment accepté AAP-IM2B – « Proof of concept : New tools to uncover fungal terpene diversity » permettant, entre autres, de finaliser le criblage de l'ensemble des sesquiterpènes synthases putatives de *L. menziesii* et la caractérisation de leur produit de réaction à l'image de ce qui est en cours de réalisation pour la TS-1.

Bibliographie

Bibliographie

(1) Bian, G.; Deng, Z.; Liu, T. Strategies for Terpenoid Overproduction and New Terpenoid Discovery. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *48*, 234–241. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.002.

(2) Li, C.; Zhang, R.; Wang, J.; Wilson, L. M.; Yan, Y. Protein Engineering for Improving and Diversifying Natural Product Biosynthesis. *Trends Biotechnol.* **2020**, *38* (7), 729–744. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.008.

(3) Yang, D.; Park, S. Y.; Park, Y. S.; Eun, H.; Lee, S. Y. Metabolic Engineering of Escherichia Coli for Natural Product Biosynthesis. *Trends Biotechnol.* **2020**, *38* (7), 745–765. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.11.007.

(4) Pham, J. V.; Yilma, M. A.; Feliz, A.; Majid, M. T.; Maffetone, N.; Walker, J. R.; Kim, E.; Cho, H. J.; Reynolds, J. M.; Song, M. C.; Park, S. R.; Yoon, Y. J. A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1404. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01404.

(5) Peñalva, M. A.; Rowlands, R. T.; Turner, G. The Optimization of Penicillin Biosynthesis in Fungi. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16* (11), 483–489. https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01229-3.

(6) Pareek, C. S.; Smoczynski, R.; Tretyn, A. Sequencing Technologies and Genome Sequencing. J. Appl. Genet. **2011**, *52* (4), 413–435. https://doi.org/10.1007/s13353-011-0057-x.

(7) Bowie, J. U.; Sherkhanov, S.; Korman, T. P.; Valliere, M. A.; Opgenorth, P. H.; Liu, H. Synthetic Biochemistry: The Bio-Inspired Cell-Free Approach to Commodity Chemical Production. *Trends Biotechnol.* **2020**, *38* (7), 766–778. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.024.

(8) Christianson, D. W. Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (17), 11570–11648. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00287.

(9) Tippmann, S.; Chen, Y.; Siewers, V.; Nielsen, J. From Flavors and Pharmaceuticals to Advanced Biofuels: Production of Isoprenoids in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biotechnol. J.* **2013**, *8* (12), 1435–1444. https://doi.org/10.1002/biot.201300028.

(10) Sathasivam, R.; Ki, J.-S. A Review of the Biological Activities of Microalgal Carotenoids and Their Potential Use in Healthcare and Cosmetic Industries. *Mar. Drugs* **2018**, *16* (1), 26. https://doi.org/10.3390/md16010026.

(11) Tominaga, K.; Hongo, N.; Karato, M.; Yamashita, E. Cosmetic Benefits of Astaxanthin on Humans Subjects. *Acta Biochim. Pol.* **2012**, *59* (1). https://doi.org/10.18388/abp.2012_2168.

(12) Tetali, S. D. Terpenes and Isoprenoids: A Wealth of Compounds for Global Use. *Planta* **2019**, *249* (1), 1–8. https://doi.org/10.1007/s00425-018-3056-x.

(13) Caputi, L; Aprea, E. Use of Terpenoids as Natural Flavouring Compounds in Food Industry. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* **2011**, *3* (1), 9–16. https://doi.org/10.2174/2212798411103010009.

(14) Carson, C. F.; Hammer, K. A.; Riley, T. V. Melaleuca Alternifolia (Tea Tree) Oil: A Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19* (1), 50–62. https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.50-62.2006.

(15) Bergman, M. E.; Davis, B.; Phillips, M. A. Medically Useful Plant Terpenoids: Biosynthesis, Occurrence, and Mechanism of Action. *Molecules* **2019**, *24* (21), 3961. https://doi.org/10.3390/molecules24213961.

(16) Leavell, M. D.; McPhee, D. J.; Paddon, C. J. Developing Fermentative Terpenoid Production for Commercial Usage. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *37*, 114–119. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.10.007.

(17) Ludwiczuk, A.; Skalicka-Woźniak, K.; Georgiev, M. I. Terpenoids. In *Pharmacognosy;* Elsevier. **2017**, 233–266. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00011-1.

(18) Vasiliadou, E. S.; Li, S.; Caratzoulas, S.; Lobo, R. F. Formaldehyde–Isobutene Prins Condensation over MFI-Type Zeolites. *Catal. Sci. Technol.* **2018**, *8* (22), 5794-5806. https://doi.org/10.1039/C8CY01667D.

(19) Bedenko, S. P.; Kozhevnikov, A. A.; Dement'ev, K. I.; Tret'yakov, V. F.; Maximov, A. L. The Prins Condensation between I-Butene and Formaldehyde over Modified BEA and MFI Zeolites in Liquid Phase. *Catal. Commun.* **2020**, *138*, 105965. https://doi.org/10.1016/j.catcom.2020.105965.

(21) Ruzicka, L. The Isoprene Rule and the Biogenesis of Terpenic Compounds. *Experientia* **1953**, *9* (10), 357–367. https://doi.org/10.1007/BF02167631.

(22) Fattorusso, E.; Taglialatela-Scafati, O. *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology*; Wiley (1st ed.), **2007**. https://doi.org/10.1002/9783527621071.

(23) Moser, S.; Pichler, H. Identifying and Engineering the Ideal Microbial Terpenoid Production Host. *Appl Microbiol Biotechnol* **2019**, *103*, 5501-5516. https://doi.org/10.1007/s00253-019-09892-y.

(24) Chang, H.; Cheng, T.; Wang, A. H. -J. Structure, Catalysis, and Inhibition Mechanism of Prenyltransferase. *IUBMB Life* **2020**, 73 (1), 40-63. https://doi.org/10.1002/iub.2418.

(25) Zeng, T.; Liu, Z.; Liu, H.; He, W.; Tang, X.; Xie, L.; Wu, R. Exploring Chemical and Biological Space of Terpenoids. J. Chem. Inf. Model. **2019**, 59 (9), 3667–3678. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00443.

(26) Vickers, C. E.; Williams, T. C.; Peng, B.; Cherry, J. Recent Advances in Synthetic Biology for Engineering Isoprenoid Production in Yeast. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *40*, 47–56. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.05.017.

(27) Yamada, Y.; Kuzuyama, T.; Komatsu, M.; Shin-ya, K.; Omura, S.; Cane, D. E.; Ikeda, H. Terpene Synthases Are Widely Distributed in Bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112* (3), 857–862. https://doi.org/10.1073/pnas.1422108112.

(28) Reddy, G. K.; Leferink, N. G. H.; Umemura, M.; Ahmed, S. T.; Breitling, R.; Scrutton, N. S.; Takano, E. Exploring Novel Bacterial Terpene Synthases. *PLOS ONE* **2020**, *15* (4), e0232220. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232220.

(29) Citron, C. A.; Gleitzmann, J.; Laurenzano, G.; Pukall, R.; Dickschat, J. S. Terpenoids Are Widespread in Actinomycetes: A Correlation of Secondary Metabolism and Genome Data. *ChemBioChem* **2012**, *13* (2), 202–214. https://doi.org/10.1002/cbic.201100641.

(30) Cane, D. E.; Ikeda, H. Exploration and Mining of the Bacterial Terpenome. Acc. Chem. Res. 2012, 45 (3), 463–472. https://doi.org/10.1021/ar200198d.

(31) Laurent, P.; Braekman, J.-C.; Daloze, D.; Pasteels, J. Biosynthesis of Defensive Compounds from Beetles and Ants. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003* (15), 2733–2743. https://doi.org/10.1002/ejoc.20030008.

(32) Šobotník, J.; Jirošová, A.; Hanus, R. Chemical Warfare in Termites. J. Insect Physiol. **2010**, 56 (9), 1012–1021. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.02.012.

(33) Jiang, M.; Wu, Z.; Guo, H.; Liu, L.; Chen, S. A Review of Terpenes from Marine-Derived Fungi: 2015–2019. *Mar. Drugs* **2020**, *18* (6), 321. https://doi.org/10.3390/md18060321.

(34) Quin, M. B.; Flynn, C. M.; Schmidt-Dannert, C. Traversing the Fungal Terpenome. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31* (10), 1449–1473. https://doi.org/10.1039/c4np00075g.

(35) Schmidt-Dannert, C. Biosynthesis of Terpenoid Natural Products in Fungi. In *Biotechnology of Isoprenoids. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol;* Springer International Publishing: Cham. **2014**, *148*, 19–61. https://doi.org/10.1007/10_2014_283.

(36) Beran, F.; Köllner, T. G.; Gershenzon, J.; Tholl, D. Chemical Convergence between Plants and Insects: Biosynthetic Origins and Functions of Common Secondary Metabolites. *New Phytol.* **2019**, *223* (1), 52–67. https://doi.org/10.1111/nph.15718.

(37) Rodriguez-Concepcion, M. Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics. *PLANT Physiol.* **2002**, *130* (3), 1079–1089. https://doi.org/10.1104/pp.007138.

(38) Maoka, T. Carotenoids as Natural Functional Pigments. J. Nat. Med. **2020**, 74 (1), 1–16. https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x.

(39) Valitova, J. N.; Sulkarnayeva, A. G.; Minibayeva, F. V. Plant Sterols: Diversity, Biosynthesis, and Physiological Functions. *Biochem. Mosc.* **2016**, *81* (8), 819–834. https://doi.org/10.1134/S0006297916080046.

(40) Santos, F. A.; Rao, V. S. N. Antiinflammatory and Antinociceptive Effects of 1,8-Cineole a Terpenoid Oxide Present in Many Plant Essential Oils. *Phytother. Res.* **2000**, *14* (4), 240-244. https://doi.org/10.1002/1099-1573(200006)14:4<240::aid-ptr573>3.0.co;2-x.

(41) Juergens, U. Anti-Inflammatory Properties of the Monoterpene 1.8-Cineole: Current Evidence for Co-Medication in Inflammatory Airway Diseases. *Drug Res.* **2014**, *64* (12), 638–646. https://doi.org/10.1055/s-0034-1372609.

(42) de Cássia da Silveira e Sá, R.; Andrade, L.; de Sousa, D. A Review on Anti-Inflammatory Activity of Monoterpenes. *Molecules* **2013**, *18* (1), 1227–1254. https://doi.org/10.3390/molecules18011227.

(43) Wall, M. E.; Wani, M. C. Paclitaxel: From Discovery to Clinic. In *Taxane Anticancer Agents*; American Chemical Society **1994**, *583*, 18–30. https://doi.org/10.1021/bk-1995-0583.ch002.

(44) Croteau, R.; Ketchum, R. E. B.; Long, R. M.; Kaspera, R.; Wildung, M. R. Taxol Biosynthesis and Molecular Genetics. *Phytochem. Rev.* **2006**, *5* (1), 75–97. https://doi.org/10.1007/s11101-005-3748-2.

(45) White, N. J.; Nosten, F. Artemisinin-Based Combination Treatment of Falciparum Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *77* (6_Suppl), 181–192. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.181.

(46) Smith, G. H.; Roberts, J. M.; Pope, T. W. Terpene Based Biopesticides as Potential Alternatives to Synthetic Insecticides for Control of Aphid Pests on Protected Ornamentals. *Crop Prot.* **2018**, *110*, 125–130. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.04.011.

(47) Peralta-Yahya, P. P.; Ouellet, M.; Chan, R.; Mukhopadhyay, A.; Keasling, J. D.; Lee, T. S. Identification and Microbial Production of a Terpene-Based Advanced Biofuel. *Nat. Commun.* **2011**, *2* (1), 483. https://doi.org/10.1038/ncomms1494.

(48) Phulara, S. C.; Chaturvedi, P.; Gupta, P. Isoprenoid-Based Biofuels: Homologous Expression and Heterologous Expression in Prokaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82* (19), 5730–5740. https://doi.org/10.1128/AEM.01192-16.

(49) McGarvey, D. J.; Croteau, R. Terpenoid Metabolism. *Plant Cell* **1995**, 7 (7), 1015–1026. https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1015.

(50) De Rosa, M.; Gambacorta, A.; Nicolaus, B. Regularity of Isoprenoid Biosynthesis in the Ether Lipids of Archaebacteria. *Phytochemistry* **1980**, *19* (5), 791–793. https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)85112-0.

(51) Goodwin, T. W. Studies in Carotenogenesis. 25. The Incorporation of 14C02, [2-14C]Acetate and [2-14C]Mevalonate into β -Carotene by Illuminated Etiolated Maize Seedlings*. *Biochem. J.* **1958**, *70* (4), 612–617. https://doi.org/10.1042/bj0700612.

(52) Modi, V. V.; Patwa, D. K. Occurrence of Mevalonic Acid in Carrots. *Nature* **1961**, *191* (4794), 1202–1202. https://doi.org/10.1038/1911202a0. (53) Kuzuyama, T.; Seto, H. Two Distinct Pathways for Essential Metabolic Precursors for Isoprenoid Biosynthesis. *Proc. Jpn. Acad.* Ser. B 2012, 88 (3), 41–52. https://doi.org/10.2183/pjab.88.41.

(54) Rohmer, M.; Knani, M.; Simonin, P.; Sutter, B.; Sahm, H. Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria: A Novel Pathway for the Early Steps Leading to Isopentenyl Diphosphate. *Biochem. J.* **1993**, *295* (2), 517–524. https://doi.org/10.1042/bj2950517.

(55) Rohmer, M.; Seemann, M.; Horbach, S.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. Glyceraldehyde 3-Phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-Mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (11), 2564–2566. https://doi.org/10.1021/ja9538344.

(56) Rohmer, M.; Rohmer, M. The Discovery of a Mevalonate-Independent Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria, Algae and Higher Plants[†]. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16* (5), 565–574. https://doi.org/10.1039/a709175c.

(57) Lichtenthaler, H. K. THE 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE PATHWAY OF ISOPRENOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, *50* (1), 47–65. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.47.

(58) Hoshino, Y.; Gaucher, E. A. On the Origin of Isoprenoid Biosynthesis. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35* (9), 2185–2197. https://doi.org/10.1093/molbev/msy120.

(59) Pérez-Gil, J.; Rodríguez-Concepción, M. Metabolic Plasticity for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria. *Biochem. J.* **2013**, *452* (1), 19–25. https://doi.org/10.1042/BJ20121899.

(60) Miziorko, H. M. Enzymes of the Mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *505* (2), 131–143. https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.028.

(61) Lohr, M.; Schwender, J.; Polle, J. E. W. Isoprenoid Biosynthesis in Eukaryotic Phototrophs: A Spotlight on Algae. *Plant Sci.* **2012**, *185–186*, 9–22. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.07.018.

(62) Croteau, R.; Johnson, M. A. Biosynthesis of Terpenoid Wood Extractives. In *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*; Elsevier **1985**, 379–439. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-347880-1.50019-2.

(63) Liu, Y.; Wang, L.; Jung, J. H.; Zhang, S. Sesterterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24* (6), 1401. https://doi.org/10.1039/b617259h.

(64) Sato, T. Unique Biosynthesis of Sesquarterpenes (C ₃₅ Terpenes). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2013**, *77* (6), 1155–1159. https://doi.org/10.1271/bbb.130180.

(65) Swiezewska, E.; Danikiewicz, W. Polyisoprenoids: Structure, Biosynthesis and Function. *Prog. Lipid Res.* **2005**, *44* (4), 235–258. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.05.002.

(66) Simon-Levert, A.; Menniti, C.; Soulère, L.; Genevière, A.-M.; Barthomeuf, C.; Banaigs, B.; Witczak, A. Marine Natural Meroterpenes: Synthesis and Antiproliferative Activity. *Mar. Drugs* **2010**, *8* (2), 347–358. https://doi.org/10.3390/md8020347.

(67) Gao, Y.; Honzatko, R. B.; Peters, R. J. Terpenoid Synthase Structures: A so Far Incomplete View of Complex Catalysis. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29* (10), 1153. https://doi.org/10.1039/c2np20059g.

(68) Boland, W.; Gäbler, A.; Gilbert, M.; Feng, Z. Biosynthesis of C11 and C16 Homoterpenes in Higher Plants; Stereochemistry of the C-C-Bond Cleavage Reaction. *Tetrahedron* **1998**, *54* (49), 14725–14736. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00902-8.

(69) Tholl, D.; Sohrabi, R.; Huh, J.-H.; Lee, S. The Biochemistry of Homoterpenes – Common Constituents of Floral and Herbivore-Induced Plant Volatile Bouquets. *Phytochemistry* **2011**, *72* (13), 1635–1646. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.019.

(70) Kellogg, B. A.; Poulter, C. D. Chain Elongation in the Isoprenoid Biosynthetic Pathway. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1* (4), 570–578. https://doi.org/10.1016/S1367-5931(97)80054-3.

(71) Poulter, C. D.; Rilling, H. C. The Prenyl Transfer Reaction. Enzymic and Mechanistic Studies of the 1'-4 Coupling Reaction in the Terpene Biosynthetic Pathway. *Acc. Chem. Res.* **1978**, *11* (8), 307–313. https://doi.org/10.1021/ar50128a004.

(72) Böttger, A.; Vothknecht, U.; Bolle, C.; Wolf, A. Terpenes and Terpenoids. In *Lessons on Caffeine, Cannabis & Co*; Springer International Publishing: Cham. **2018**, 153–170. https://doi.org/10.1007/978-3-319-99546-5_10.

(73) Wang, Y.; Guan, J.; Di Trani, J. M.; Auclair, K.; Mittermaier, A. K. Inhibition and Activation of Kinases by Reaction Products: A Reporter-Free Assay. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (18), 11803–11811. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02456.

(74) Rudolf, J. D.; Chang, C.-Y. Terpene Synthases in Disguise: Enzymology, Structure, and Opportunities of Non-Canonical Terpene Synthases. *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37* (3), 425–463. https://doi.org/10.1039/C9NP00051H.

(75) McCulley, C. H.; Tantillo, D. J. Predicting Rearrangement-Competent Terpenoid Oxidation Levels. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (13), 6060–6065. https://doi.org/10.1021/jacs.9b12398.

(76) Pateraki, I.; Heskes, A. M.; Hamberger, B. Cytochromes P450 for Terpene Functionalisation and Metabolic Engineering. In *Biotechnology of Isoprenoids*; Springer International Publishing: Cham. **2015**, 148, 107-139. https://doi.org/10.1007/10_2014_301.

(77) Janocha, S.; Schmitz, D.; Bernhardt, R. Terpene Hydroxylation with Microbial Cytochrome P450 Monooxygenases. In *Biotechnology of Isoprenoids*; Springer International Publishing: Cham. **2015**, *148*, 215–250. https://doi.org/10.1007/10_2014_296.

(78) Bemis, G. W.; Murcko, M. A. The Properties of Known Drugs. 1. Molecular Frameworks. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (15), 2887–2893. https://doi.org/10.1021/jm9602928.

(79) Little, H. N.; Bloch, Konrad. Studies on the utilization of acetic acid for the biological synthesis of cholesterol. *J. Biol. Chem.* **1950**, *183* (1), 33–46. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)56441-3.

(80) Rittenberg, D.; Schoenheimer, R. Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. *J. Biol. Chem.* **1937**, *121* (1), 235–253. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)74342-1.

(81) Popják, G. Biosynthesis of Squalene and Cholesterol in Vitro from Acetate-1-C14. *Arch. Biochem. Biophys.* **1954**, *48* (1), 102–106. https://doi.org/10.1016/0003-9861(54)90310-0.

(82) Bloch, K. The Biological Synthesis of Cholesterol. **1964**, 23.

(83) Bloch, K.; Rittenberg, D. An estimation of acetic acid formation in the rat. *J. Biol. Chem.* **1945**, *159* (1), 45–58. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)51300-X.

(84) Katsuki, H.; Bloch, K. Studies on the Biosynthesis of Ergosterol in Yeast. Formation of Methylated Intermediates. J. Biol. Chem. **1967**, 242 (2), 222–227.

(85) Lange, B. M.; Rujan, T.; Martin, W.; Croteau, R. Isoprenoid Biosynthesis: The Evolution of Two Ancient and Distinct Pathways across Genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97* (24), 13172–13177. https://doi.org/10.1073/pnas.240454797.

(86) Nishimura, H.; Azami, Y.; Miyagawa, M.; Hashimoto, C.; Yoshimura, T.; Hemmi, H. Biochemical Evidence Supporting the Presence of the Classical Mevalonate Pathway in the Thermoacidophilic Archaeon Sulfolobus Solfataricus. *J. Biochem. (Tokyo)* **2013**, *153* (5), 415–420. https://doi.org/10.1093/jb/mvt006.

(87) Romanowski, M. J.; Bonanno, J. B.; Burley, S. K. Crystal Structure of TheStreptococcus Pneumoniae Phosphomevalonate Kinase, a Member of the GHMP Kinase Superfamily. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2002**, *47* (4), 568–571. https://doi.org/10.1002/prot.10118.

(88) Voynova, N. E.; Rios, S. E.; Miziorko, H. M. Staphylococcus Aureus Mevalonate Kinase: Isolation and Characterization of an Enzyme of the Isoprenoid Biosynthetic Pathway. *J. Bacteriol.* **2004**, *186* (1), 61–67. https://doi.org/10.1128/JB.186.1.61-67.2004.

(89) Steussy, C. N.; Vartia, A. A.; Burgner, J. W.; Sutherlin, A.; Rodwell, V. W.; Stauffacher, C. V. X-Ray Crystal Structures of HMG-CoA Synthase from *Enterococcus Faecalis* and a Complex with Its Second Substrate/Inhibitor Acetoacetyl-CoA. *Biochemistry* **2005**, *44* (43), 14256–14267. https://doi.org/10.1021/bi051487x.

(90) Lombard, J.; Moreira, D. Origins and Early Evolution of the Mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in the Three Domains of Life. *Mol. Biol. Evol.* **2011**, *28* (1), 87–99. https://doi.org/10.1093/molbev/msq177.

(91) Dewick, P. M. The Biosynthesis of C5–C25 Terpenoid Compounds. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19* (2), 181–222. https://doi.org/10.1039/b002685i.

(92) Heath, R. J.; Rock, C. O. The Claisen Condensation in Biology. Nat. Prod. Rep. 2002, 19 (5), 581–596. https://doi.org/10.1039/b110221b.

(93) Harris, J. I.; Gehring, U. The Active Site Cysteines of Thiolase. *Eur. J. Biochem.* **1970**, *16* (3), 492–498. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1970.tb01108.x.

(94) Palmer, M. A.; Differding, E.; Gamboni, R.; Williams, S. F.; Peoples, O. P.; Walsh, C. T.; Sinskey, A. J.; Masamune, S. Biosynthetic Thiolase from Zoogloea Ramigera. Evidence for a Mechanism Involving Cys-378 as the Active Site Base. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (13), 8369–8375. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)92985-6.

(95) Ferguson, J. J.; Rudney, H. The Biosynthesis of β-Hydroxy-β-Methylglutaryl Coenzyme A in Yeast. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234* (5), 1072–1075. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)98132-9.

(96) Miziorko, H. M.; Lane, M. D. 3-Hydroxy-3-Methylgutaryl-CoA Synthase. Participation of Acetyl-S-Enzyme and Enzyme-S-Hydroxymethylgutaryl-SCoA Intermediates in the Reaction. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252* (4), 1414–1420. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)40672-7.

(97) Vinokur, J. M.; Korman, T. P.; Cao, Z.; Bowie, J. U. Evidence of a Novel Mevalonate Pathway in Archaea. *Biochemistry* **2014**, *53* (25), 4161–4168. https://doi.org/10.1021/bi500566q.

(98) Jabalquinto, A. M.; Alvear, M.; Cardemil, E. Physiological Aspects and Mechanism of Action of Mevalonate 5-Diphosphate Decarboxylase. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1988**, *90* (4), 671–677. https://doi.org/10.1016/0305-0491(88)90321-5.

(99) Agranoff, B. W.; Eggerer, H.; Henning, U.; Lynen, F. Biosynthesis of Terpenes. VII. Isopentenyl Pyrophosphate Isomerase. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 326–332.

(100) Toteva, M. M.; Richard, J. P. Mechanistic Imperatives for the Reaction Catalyzed by Isopentenyl Pyrophosphate Isomerase: Free Energy Profile for Stepwise Isomerization in Water through a Tertiary Carbocation Intermediate. *Bioorganic Chem.* **1997**, *25* (4), 239–245. https://doi.org/10.1006/bioo.1997.1069.

(101) Durbecq, V. Crystal Structure of Isopentenyl Diphosphate:Dimethylallyl Diphosphate Isomerase. *EMBO J.* **2001**, *20* (7), 1530–1537. https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1530.

(102) Street, I. P.; Christensen, D. J.; Poulter, C. D. Hydrogen Exchange during the Enzyme-Catalyzed Isomerization of Isopentenyl Diphosphate and Dimethylallyl Diphosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (23), 8577–8578. https://doi.org/10.1021/ja00179a049.

(103) Ershov, Yu. V. 2-C-Methylerythritol Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis as a Target in Identifying New Antibiotics, Herbicides, and Immunomodulators: A Review. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2007**, *43* (2), 115–138. https://doi.org/10.1134/S0003683807020019.

(104) Dellas, N.; Thomas, S. T.; Manning, G.; Noel, J. P. Discovery of a Metabolic Alternative to the Classical Mevalonate Pathway. *Elife* **2013**, *2*. https://doi.org/10.7554/eLife.00672.

(105) Smit, A. Biosynthesis of Isoprenoids via Mevalonate in Archaea: The Lost Pathway. *Genome Res.* **2000**, *10* (10), 1468–1484. https://doi.org/10.1101/gr.145600.

(106) Grochowski, L. L; Xu, H.; White, R. H. Methanocaldococcus Jannaschii Uses a Modified Mevalonate Pathway for Biosynthesis of Isopentenyl Diphosphate. *J. Bacteriol.* **2006**, *188* (9), 3192–3198. https://doi.org/10.1128/JB.188.9.3192-3198.2006.

(107) VanNice, J. C.; Skaff, D. A.; Keightley, A.; Addo, J. K.; Wyckoff, G. J.; Miziorko, H. M. Identification in Haloferax Volcanii of Phosphomevalonate Decarboxylase and Isopentenyl Phosphate Kinase as Catalysts of the Terminal Enzyme Reactions in an Archaeal Alternate Mevalonate Pathway. *J. Bacteriol.* **2014**, *196* (5), 1055–1063. https://doi.org/10.1128/JB.01230-13.

(108) Vinokur, J. M.; Cummins, M. C.; Korman, T. P.; Bowie, J. U. An Adaptation To Life In Acid Through A Novel Mevalonate Pathway. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 39737. https://doi.org/10.1038/srep39737.

(109) Azami, Y.; Hattori, A.; Nishimura, H.; Kawaide, H.; Yoshimura, T.; Hemmi, H. (*R*)-Mevalonate 3-Phosphate Is an Intermediate of the Mevalonate Pathway in *Thermoplasma Acidophilum*. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (23), 15957–15967. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.562686.

(110) Anderson, D. G.; Norgard, D. W.; Porter, J. W. The Incorporation of Mevalonic Acid-2-C14 and Dimethylacrylic Acid-3-C14 into Carotenes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1960**, *88* (1), 68–77. https://doi.org/10.1016/0003-9861(60)90198-3.

(111) Alcázar-Fabra, M.; Navas, P.; Brea-Calvo, G. Coenzyme Q Biosynthesis and Its Role in the Respiratory Chain Structure. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2016**, *1857* (8), 1073–1078. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2016.03.010.

(112) Raman, T. S.; Sharma, B. V. S.; Jayaraman, J.; Ramasarma, T. Biosynthesis of Coenzyme Q in Microorganisms. *Arch. Biochem. Biophys.* **1965**, *110* (1), 75–84. https://doi.org/10.1016/0003-9861(65)90156-6.

(113) Kannenberg, E. L.; Poralla, K. Hopanoid Biosynthesis and Function in Bacteria. *Naturwissenschaften* **1999**, *86* (4), 168–176. https://doi.org/10.1007/s001140050592.

(114) Frank, A.; Groll, M. The Methylerythritol Phosphate Pathway to Isoprenoids. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (8), 5675–5703. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00537.

(115) Lois, L. M.; Campos, N.; Putra, S. R.; Danielsen, K.; Rohmer, M.; Boronat, A. Cloning and Characterization of a Gene from Escherichia Coli Encoding a Transketolase-like Enzyme That Catalyzes the Synthesis of D-1-Deoxyxylulose 5-Phosphate, a Common Precursor for Isoprenoid, Thiamin, and Pyridoxol Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95* (5), 2105–2110. https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2105.

(116) Rohdich, F.; Hecht, S.; Gartner, K.; Adam, P.; Krieger, C.; Amslinger, S.; Arigoni, D.; Bacher, A.; Eisenreich, W. Studies on the Nonmevalonate Terpene Biosynthetic Pathway: Metabolic Role of IspH (LytB) Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (3), 1158–1163. https://doi.org/10.1073/pnas.032658999.

(117) Rohdich, F.; Zepeck, F.; Adam, P.; Hecht, S.; Kaiser, J.; Laupitz, R.; Grawert, T.; Amslinger, S.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Arigoni, D. The Deoxyxylulose Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis: Studies on the Mechanisms of the Reactions Catalyzed by IspG and IspH Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (4), 1586–1591. https://doi.org/10.1073/pnas.0337742100.

(118) Tritsch, D.; Hemmerlin, A.; Bach, T. J.; Rohmer, M. Plant Isoprenoid Biosynthesis via the MEP Pathway: In Vivo IPP/DMAPP Ratio Produced by (*E*)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-Enyl Diphosphate Reductase in Tobacco BY-2 Cell Cultures. *FEBS Lett.* **2010**, *584* (1), 129–134. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.11.010.

(119) Henry, L. K.; Gutensohn, M.; Thomas, S. T.; Noel, J. P.; Dudareva, N. Orthologs of the Archaeal Isopentenyl Phosphate Kinase Regulate Terpenoid Production in Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (32), 10050–10055. https://doi.org/10.1073/pnas.1504798112.

(120) Vranová, E.; Coman, D.; Gruissem, W. Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **2013**, *64*, 665-700. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120116.

(121) Liang, P.-H.; Ko, T.-P.; Wang, A. H.-J. Structure, Mechanism and Function of Prenyltransferases: Structure, Mechanism and Function of Prenyltransferases. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269* (14), 3339–3354. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03014.x.

(122) Winkelblech, J.; Fan, A.; Li, S.-M. Prenyltransferases as Key Enzymes in Primary and Secondary Metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, 99 (18), 7379–7397. https://doi.org/10.1007/s00253-015-6811-y.

(123) Li, W. Bringing Bioactive Compounds into Membranes: The UbiA Superfamily of Intramembrane Aromatic Prenyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* **2017**, *41* (4), 356-370. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.01.007.

(124) Tello, M.; Kuzuyama, T.; Heide, L.; Noel, J. P.; Richard, S. B. The ABBA Family of Aromatic Prenyltransferases: Broadening Natural Product Diversity. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65* (10), 1459–1463. https://doi.org/10.1007/s00018-008-7579-3.

(125) Ogura, K.; Koyama, T. Enzymatic Aspects of Isoprenoid Chain Elongation. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (4), 1263–1276. https://doi.org/10.1021/cr9600464.

(126) Kurokawa, H.; Koyama, T. Prenyltransferase. In *Comprehensive Natural Products II*; Elsevier **2010**, 557–583. https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00002-2.

(127) Ito, M.; Kobayashi, M.; Koyama, T.; Ogura, K. Stereochemical Analysis of Prenyltransferase Reactions Leading to (Z)- and (E)-Polyprenyl Chains. *Biochemistry* **1987**, *26* (15), 4745–4750. https://doi.org/10.1021/bi00389a022.

(128) Koyama, T.; Ogura, K. Isopentenyl Diphosphate Isomerase and Prenyltransferases. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*; Elsevier. **1999**, 69–96. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091283-7.00037-0.

(129) Liu, Y.; Luo, S.-H.; Schmidt, A.; Wang, G.-D.; Sun, G.-L.; Grant, M.; Kuang, C.; Yang, M.-J.; Jing, S.-X.; Li, C.-H.; Schneider, B.; Gershenzon, J.; Li, S.-H. A Geranylfarnesyl Diphosphate Synthase Provides the Precursor for Sesterterpenoid (C ₂₅) Formation in the Glandular Trichomes of the Mint Species *Leucosceptrum Canum. Plant Cell* **2016**, *28* (3), 804–822. https://doi.org/10.1105/tpc.15.00715.

(130) Tarshis, L. C.; Yan, M.; Poulter, C. D.; Sacchettini, J. C. Crystal Structure of Recombinant Farnesyl Diphosphate Synthase at 2.6-A Resolution. *Biochemistry* **1994**, *33* (36), 10871–10877. https://doi.org/10.1021/bi00202a004.

(131) Tarshis, L. C.; Proteau, P. J.; Kellogg, B. A.; Sacchettini, J. C.; Poulter, C. D. Regulation of Product Chain Length by Isoprenyl Diphosphate Synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93* (26), 15018–15023. https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15018.

(132) Poulter, C. D. Farnesyl Diphosphate Synthase. A Paradigm for Understanding Structure and Function Relationships in E-Polyprenyl Diphosphate Synthases. *Phytochem. Rev.* **2006**, *5* (1), 17–26. https://doi.org/10.1007/s11101-005-4887-1.
(133) Clarke, C. F.; Tanaka, R. D.; Svenson, K.; Wamsley, M.; Fogelman, A. M.; Edwards, P. A. Molecular Cloning and Sequence of a Cholesterol-Repressible Enzyme Related to Prenyltransferase in the Isoprene Biosynthetic Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **1987**, *7* (9), 3138–3146. https://doi.org/10.1128/MCB.7.9.3138.

(134) Kavanagh, K. L.; Guo, K.; Dunford, J. E.; Wu, X.; Knapp, S.; Ebetino, F. H.; Rogers, M. J.; Russell, R. G. G.; Oppermann, U. The Molecular Mechanism of Nitrogen-Containing Bisphosphonates as Antiosteoporosis Drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (20), 7829-7834. https://doi.org/10.1073/pnas.0601643103.

(135) Hosfield, D. J.; Zhang, Y.; Dougan, D. R.; Broun, A.; Tari, L. W.; Swanson, R. V.; Finn, J. Structural Basis for Bisphosphonate-Mediated Inhibition of Isoprenoid Biosynthesis*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (10), 8526–8529. https://doi.org/10.1074/jbc.C300511200.

(136) Popják, G.; Cornforth, J. Substrate Stereochemistry in Squalene Biosynthesis. *Biochem. J.* **1966**, *101* (3), 553–568. https://doi.org/10.1042/bj1010553.

(137) Burke, C.; Croteau, R. Interaction with the Small Subunit of Geranyl Diphosphate Synthase Modifies the Chain Length Specificity of Geranylgeranyl Diphosphate Synthase to Produce Geranyl Diphosphate. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (5), 3141–3149. https://doi.org/10.1074/jbc.M105900200.

(138) Burke, C. C.; Wildung, M. R.; Croteau, R. Geranyl Diphosphate Synthase: Cloning, Expression, and Characterization of This Prenyltransferase as a Heterodimer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (23), 13062–13067. https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13062.

(139) Burke, C.; Klettke, K.; Croteau, R. Heteromeric Geranyl Diphosphate Synthase from Mint: Construction of a Functional Fusion Protein and Inhibition by Bisphosphonate Substrate Analogs. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *422* (1), 52–60. https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.12.003.

(140) Shimizu, N.; Koyama, T.; Ogura, K. Molecular Cloning, Expression, and Purification of Undecaprenyl Diphosphate Synthase. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (31), 19476–19481. https://doi.org/10.1074/jbc.273.31.19476.

(141) Teng, K.-H.; Liang, P.-H. Structures, Mechanisms and Inhibitors of Undecaprenyl Diphosphate Synthase: A Cis-Prenyltransferase for Bacterial Peptidoglycan Biosynthesis. *Bioorganic Chem.* **2012**, *43*, 51–57. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2011.09.004.

(142) Guo, R.-T.; Ko, T.-P.; Chen, A. P.-C.; Kuo, C.-J.; Wang, A. H.-J.; Liang, P.-H. Crystal Structures of Undecaprenyl Pyrophosphate Synthase in Complex with Magnesium, Isopentenyl Pyrophosphate, and Farnesyl Thiopyrophosphate. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (21), 20762–20774. https://doi.org/10.1074/jbc.M502121200.

(143) Takahashi, S.; Koyama, T. Structure and Function Ofcis-Prenyl Chain Elongating Enzymes. *Chem. Rec.* **2006**, *6* (4), 194–205. https://doi.org/10.1002/tcr.20083.

(144) Fujihashi, M.; Zhang, Y.-W.; Higuchi, Y.; Li, X.-Y.; Koyama, T.; Miki, K. Crystal Structure of Cis-Prenyl Chain Elongating Enzyme, Undecaprenyl Diphosphate Synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (8), 4337–4342. https://doi.org/10.1073/pnas.071514398.

(145) Grabińska, K. A.; Park, E. J.; Sessa, W. C. Cis-Prenyltransferase: New Insights into Protein Glycosylation, Rubber Synthesis, and Human Diseases. J. Biol. Chem. **2016**, 291 (35), 18582–18590. https://doi.org/10.1074/jbc.R116.739490.

(146) Schulbach, M. C.; Brennan, P. J.; Crick, D. C. Identification of a Short (C15) ChainZ-Isoprenyl Diphosphate Synthase and a Homologous Long (C50) Chain Isoprenyl Diphosphate Synthase in Mycobacterium Tuberculosis. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (30), 22876–22881. https://doi.org/10.1074/jbc.M003194200.

(147) Akhtar, T. A.; Matsuba, Y.; Schauvinhold, I.; Yu, G.; Lees, H. A.; Klein, S. E.; Pichersky, E. The Tomato *Cis*- Prenyltransferase Gene Family. *Plant J.* **2013**, *73* (4), 640–652. https://doi.org/10.1111/tpj.12063.

(148) Kaur, D.; Brennan, P. J.; Crick, D. C. Decaprenyl Diphosphate Synthesis in Mycobacterium Tuberculosis. *J. Bacteriol.* **2004**, *186* (22), 7564–7570. https://doi.org/10.1128/JB.186.22.7564-7570.2004.

(149) Mori, T. Enzymatic Studies on Aromatic Prenyltransferases. J. Nat. Med. **2020**, 74 (3), 501–512. https://doi.org/10.1007/s11418-020-01393-x.

(150) Alhassan, A.; Abdullahi, M.; Uba, A.; Umar, A. Prenylation of Aromatic Secondary Metabolites: A New Frontier for Development of Novel Drugs. *Trop. J. Pharm. Res.* **2014**, *13* (2), 307. https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i2.22.

(151) Wätjen, W.; Weber, N.; Lou, Y. -j.; Wang, Z. -q.; Chovolou, Y.; Kampkötter, A.; Kahl, R.; Proksch, P. Prenylation Enhances Cytotoxicity of Apigenin and Liquiritigenin in Rat H4IIE Hepatoma and C6 Glioma Cells. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45* (1), 119–124. https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.08.008.

(152) Miranda, C. L.; Stevens, J. F.; Ivanov, V.; McCall, M.; Frei, B.; Deinzer, M. L.; Buhler, D. R. Antioxidant and Prooxidant Actions of Prenylated and Nonprenylated Chalcones and Flavanones in Vitro. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (9), 3876–3884. https://doi.org/10.1021/jf0002995.

(153) Araya-Cloutier, C.; den Besten, H. M. W.; Aisyah, S.; Gruppen, H.; Vincken, J.-P. The Position of Prenylation of Isoflavonoids and Stilbenoids from Legumes (Fabaceae) Modulates the Antimicrobial Activity against Gram Positive Pathogens. *Food Chem.* **2017**, *226*, 193–201. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.026.

(154) Kuzuyama, T.; Noel, J. P.; Richard, S. B. Structural Basis for the Promiscuous Biosynthetic Prenylation of Aromatic Natural Products. *Nature* **2005**, *435* (7044), 983–987. https://doi.org/10.1038/nature03668.

(155) Bonitz, T.; Alva, V.; Saleh, O.; Lupas, A. N.; Heide, L. Evolutionary Relationships of Microbial Aromatic Prenyltransferases. *PLoS ONE* **2011**, *6* (11), e27336. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027336.

(156) Malico, A. A.; Calzini, M. A.; Gayen, A. K.; Williams, G. J. Synthetic Biology, Combinatorial Biosynthesis, and Chemo-enzymatic Synthesis of Isoprenoids. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *47* (9-10), 675-702. https://doi.org/10.1007/s10295-020-02306-3.

(157) Steffensky, M.; Mühlenweg, A.; Wang, Z.-X.; Li, S.-M.; Heide, L. Identification of the Novobiocin Biosynthetic Gene Cluster of Streptomyces Spheroides NCIB 11891. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44* (5), 1214–1222. https://doi.org/10.1128/AAC.44.5.1214-1222.2000.

(158) Steffensky, M.; Li, S.-M.; Vogler, B.; Heide, L. Novobiocin Biosynthesis in *Streptomyces Spheroides*: Identification of a Dimethylallyl Diphosphate:4-Hydroxyphenylpyruvate Dimethylallyl Transferase. *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *161* (1), 69–74. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12930.x.

(159) Pojer, F.; Wemakor, E.; Kammerer, B.; Chen, H.; Walsh, C. T.; Li, S.-M.; Heide, L. CloQ, a Prenyltransferase Involved in Clorobiocin Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (5), 2316–2321. https://doi.org/10.1073/pnas.0337708100.

(160) Murray, L. A. M.; McKinnie, S. M. K.; Moore, B. S.; George, J. H. Meroterpenoid Natural Products from *Streptomyces* Bacteria – the Evolution of Chemoenzymatic Syntheses. *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37* (10), 1334–1366. https://doi.org/10.1039/D0NP00018C.

(161) Metzger, U.; Keller, S.; Stevenson, C. E. M.; Heide, L.; Lawson, D. M. Structure and Mechanism of the Magnesium-Independent Aromatic Prenyltransferase CloQ from the Clorobiocin Biosynthetic Pathway. *J. Mol. Biol.* **2010**, *404* (4), 611–626. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.09.067.

(162) Bayse, C. A.; Merz, K. M. Mechanistic Insights into Mg ²⁺ -Independent Prenylation by CloQ from Classical Molecular Mechanics and Hybrid Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Molecular Dynamics Simulations. *Biochemistry* **2014**, *53* (30), 5034–5041. https://doi.org/10.1021/bi500531p.

(163) Ozaki, T.; Mishima, S.; Nishiyama, M.; Kuzuyama, T. NovQ Is a Prenyltransferase Capable of Catalyzing the Addition of a Dimethylallyl Group to Both Phenylpropanoids and Flavonoids. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2009**, *62* (7), 385–392. https://doi.org/10.1038/ja.2009.48.

(164) Kumano, T.; Richard, S. B.; Noel, J. P.; Nishiyama, M.; Kuzuyama, T. Chemoenzymatic Syntheses of Prenylated Aromatic Small Molecules Using Streptomyces Prenyltransferases with Relaxed Substrate Specificities. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (17), 8117–8126. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.07.052.

(165) Sugiyama, A.; Linley, P. J.; Sasaki, K.; Kumano, T.; Yamamoto, H.; Shitan, N.; Ohara, K.; Takanashi, K.; Harada, E.; Hasegawa, H.; Terakawa, T.; Kuzuyama, T.; Yazaki, K. Metabolic Engineering for the Production of Prenylated Polyphenols in Transgenic Legume Plants Using Bacterial and Plant Prenyltransferases. *Metab. Eng.* **2011**, *13* (6), 629–637. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.07.003.

(166) Haagen, Y.; Unsöld, I.; Westrich, L.; Gust, B.; Richard, S. B.; Noel, J. P.; Heide, L. A Soluble, Magnesium-Independent Prenyltransferase Catalyzes Reverse and Regular *C* -Prenylations and *O* -Prenylations of Aromatic Substrates. *FEBS Lett.* **2007**, *581* (16), 2889–2893. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.031.

(167) Johnson, B. P.; Scull, E. M.; Dimas, D. A.; Bavineni, T.; Bandari, C.; Batchev, A. L.; Gardner, E. D.; Nimmo, S. L.; Singh, S. Acceptor Substrate Determines Donor Specificity of an Aromatic Prenyltransferase: Expanding the Biocatalytic Potential of NphB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104* (10), 4383–4395. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10529-8.

(168) Tanner, M. E. Mechanistic Studies on the Indole Prenyltransferases. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32* (1), 88–101. https://doi.org/10.1039/C4NP00099D.

(169) Tudzynski, P.; Hölter, K.; Correia, T.; Arntz, C.; Grammel, N.; Keller, U. Evidence for an Ergot Alkaloid Gene Cluster in Claviceps Purpurea. *Mol. Gen. Genet. MGG* **1999**, *261* (1), 133–141. https://doi.org/10.1007/s004380050950.

(170) Pockrandt, D.; Ludwig, L.; Fan, A.; König, G. M.; Li, S.-M. New Insights into the Biosynthesis of Prenylated Xanthones: Xptb from *Aspergillus Nidulans* Catalyses an O-Prenylation of Xanthones. *ChemBioChem* **2012**, *13* (18), 2764–2771. https://doi.org/10.1002/cbic.201200545.

(171) Tsai, H. F.; Wang, H.; Gebler, J. C.; Poulter, C. D.; Schardl, C. L. The Claviceps Purpurea Gene Encoding Dimethylallyltryptophan Synthase, the Committed Step for Ergot Alkaloid Biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *216* (1), 119–125. https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2599.

(172) Gebler, J. C.; Poulter, C. D. Purification and Characterization of Dimethylallyl Tryptophan Synthase from Claviceps Purpurea. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *296* (1), 308–313. https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90577-J.

(173) Unsöld, I. A.; Li, S.-M. Overproduction, Purification and Characterization of FgaPT2, a Dimethylallyltryptophan Synthase from Aspergillus Fumigatus. *Microbiology* **2005**, *151* (5), 1499–1505. https://doi.org/10.1099/mic.0.27759-0.

(174) Schultz, A. W.; Lewis, C. A.; Luzung, M. R.; Baran, P. S.; Moore, B. S. Functional Characterization of the Cyclomarin/Cyclomarazine Prenyltransferase CymD Directs the Biosynthesis of Unnatural Cyclic Peptides ¹. J. Nat. Prod. **2010**, 73 (3), 373–377. https://doi.org/10.1021/np9006876.

(175) Grundmann, A.; Li, S.-M. Overproduction, Purification and Characterization of FtmPT1, a Brevianamide F Prenyltransferase from Aspergillus Fumigatus. *Microbiology*, **2005**, *151* (7), 2199–2207. https://doi.org/10.1099/mic.0.27962-0.

(176) Schuller, J. M.; Zocher, G.; Liebhold, M.; Xie, X.; Stahl, M.; Li, S.-M.; Stehle, T. Structure and Catalytic Mechanism of a Cyclic Dipeptide Prenyltransferase with Broad Substrate Promiscuity. *J. Mol. Biol.* **2012**, *422* (1), 87–99. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.05.033.

(177) Yu, X.; Liu, Y.; Xie, X.; Zheng, X.-D.; Li, S.-M. Biochemical Characterization of Indole Prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (2), 1371–1380. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.317982.

(178) Takahashi, S.; Takagi, H.; Toyoda, A.; Uramoto, M.; Nogawa, T.; Ueki, M.; Sakaki, Y.; Osada, H. Biochemical Characterization of a Novel Indole Prenyltransferase from Streptomyces Sp. SN-593. *J. Bacteriol.* **2010**, *192* (11), 2839–2851. https://doi.org/10.1128/JB.01557-09.

(179) Wunsch, C.; Zou, H.-X.; Linne, U.; Li, S.-M. C7-Prenylation of Tryptophanyl and O-Prenylation of Tyrosyl Residues in Dipeptides by an Aspergillus Terreus Prenyltransferase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99* (4), 1719–1730. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5999-6.

(180) Li, S.-M. Genome Mining and Biosynthesis of Fumitremorgin-Type Alkaloids in Ascomycetes. J. Antibiot. (Tokyo) **2011**, 64 (1), 45–49. https://doi.org/10.1038/ja.2010.128.

(181) Haynes, S. W.; Gao, X.; Tang, Y.; Walsh, C. T. Complexity Generation in Fungal Peptidyl Alkaloid Biosynthesis: A Two-Enzyme Pathway to the Hexacyclic MDR Export Pump Inhibitor Ardeemin. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (4), 741–748. https://doi.org/10.1021/cb3006787.

(182) Noike, M.; Liu, C.; Ono, Y.; Hamano, Y.; Toyomasu, T.; Sassa, T.; Kato, N.; Dairi, T. An Enzyme Catalyzing O-Prenylation of the Glucose Moiety of Fusicoccin A, a Diterpene Glucoside Produced by the Fungus Phomopsis Amygdali. *ChemBioChem* **2012**, *13* (4), 566–573. https://doi.org/10.1002/cbic.201100725.

(183) Kremer, A.; Li, S.-M. A Tyrosine 0-Prenyltransferase Catalyses the First Pathway-Specific Step in the Biosynthesis of Sirodesmin PL. *Microbiology* **2010**, *156* (1), 278–286. https://doi.org/10.1099/mic.0.033886-0.

(184) Bandari, C.; Scull, E. M.; Masterson, J. M.; Tran, R. H. Q.; Foster, S. B.; Nicholas, K. M.; Singh, S. Determination of Alkyl-Donor Promiscuity of Tyrosine- *O* -Prenyltransferase SirD from *Leptosphaeria Maculans*. *ChemBioChem* **2017**, *18* (23), 2323–2327. https://doi.org/10.1002/cbic.201700469.

(185) Bandari, C.; Scull, E. M.; Bavineni, T.; Nimmo, S. L.; Gardner, E. D.; Bensen, R. C.; Burgett, A. W.; Singh, S. FgaPT2, a Biocatalytic Tool for Alkyl-Diversification of Indole Natural Products. *MedChemComm* **2019**, *10* (8), 1465–1475. https://doi.org/10.1039/C9MD00177H.

(186) Jost, M.; Zocher, G.; Tarcz, S.; Matuschek, M.; Xie, X.; Li, S.-M.; Stehle, T. Structure–Function Analysis of an Enzymatic Prenyl Transfer Reaction Identifies a Reaction Chamber with Modifiable Specificity. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (50), 17849–17858. https://doi.org/10.1021/ja106817c.

(187) Yu, X.; Zocher, G.; Xie, X.; Liebhold, M.; Schütz, S.; Stehle, T.; Li, S.-M. Catalytic Mechanism of Stereospecific Formation of Cis-Configured Prenylated Pyrroloindoline Diketopiperazines by Indole Prenyltransferases. *Chem. Biol.* **2013**, *20* (12), 1492–1501. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.10.007.

(188) Luk, L. Y. P.; Tanner, M. E. Mechanism of Dimethylallyltryptophan Synthase: Evidence for a Dimethylallyl Cation Intermediate in an Aromatic Prenyltransferase Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (39), 13932–13933. https://doi.org/10.1021/ja906485u.

(189) Nowicka, B.; Kruk, J. Occurrence, Biosynthesis and Function of Isoprenoid Quinones. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2010**, *1797* (9), 1587–1605. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2010.06.007.

(190) Young, I. G.; Leppik, R. A.; Hamilton, J. A.; Gibson, F. Biochemical and Genetic Studies on Ubiquinone Biosynthesis in Escherichia Coli K-12: 4-Hydroxybenzoate Octaprenyltransferase. *J. Bacteriol.* **1972**, *110* (1), 18–25. https://doi.org/10.1128/JB.110.1.18-25.1972.

(191) Suvarna, K.; Stevenson, D.; Meganathan, R.; Hudspeth, M. E. S. Menaquinone (Vitamin K2) Biosynthesis: Localization and Characterization of the MenA Gene FromEscherichia Coli. *J. Bacteriol.* **1998**, *180* (10), 2782–2787. https://doi.org/10.1128/JB.180.10.2782-2787.1998.

(192) Kwon, O.; Meganathan, R. Biosynthesis of Menaquinone (Vitamin K2) and Ubiquinone (Coenzyme Q). *EcoSal Plus* **2009**, *3* (2). https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.3.3.

(193) Bräuer, L.; Brandt, W.; Schulze, D.; Zakharova, S.; Wessjohann, L. A Structural Model of the Membrane-Bound Aromatic Prenyltransferase UbiA FromE. Coli. *ChemBioChem* **2008**, *9* (6), 982–992. https://doi.org/10.1002/cbic.200700575.

(194) Jain, S. Biosynthesis of Archaeal Membrane Ether Lipids. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00641.

(195) Matsuda, Y.; Abe, I. Biosynthesis of Fungal Meroterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33* (1), 26–53. https://doi.org/10.1039/C5NP00090D.

(196) Kim, H. J.; Khalimonchuk, O.; Smith, P. M.; Winge, D. R. Structure, Function, and Assembly of Heme Centers in Mitochondrial Respiratory Complexes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2012**, *1823* (9), 1604–1616. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.008.

(197) Huang, H.; Scherman, M. S.; D'Haeze, W.; Vereecke, D.; Holsters, M.; Crick, D. C.; McNeil, M. R. Identification and Active Expression of the Mycobacterium Tuberculosis Gene Encoding 5-Phospho-α-D-Ribose-1-Diphosphate: Decaprenyl-Phosphate 5-Phosphoribosyltransferase, the First Enzyme Committed to Decaprenylphosphoryl-D-Arabinose Synthesis. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (26), 24539–24543. https://doi.org/10.1074/jbc.M504068200.

(198) Yazaki, K.; Kunihisa, M.; Fujisaki, T.; Sato, F. Geranyl Diphosphate:4-Hydroxybenzoate Geranyltransferase FromLithospermum Erythrorhizon. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (8), 6240–6246. https://doi.org/10.1074/jbc.M106387200.

(199) Yazaki, K.; Sasaki, K.; Tsurumaru, Y. Prenylation of Aromatic Compounds, a Key Diversification of Plant Secondary Metabolites. *Phytochemistry* **2009**, *70* (15–16), 1739–1745. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.08.023.

(200) de Bruijn, W. J. C.; Levisson, M.; Beekwilder, J.; van Berkel, W. J. H.; Vincken, J.-P. Plant Aromatic Prenyltransferases: Tools for Microbial Cell Factories. *Trends Biotechnol.* **2020**, *38* (8), 917–934. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.02.006.

(201) Huang, H.; Levin, E. J.; Liu, S.; Bai, Y.; Lockless, S. W.; Zhou, M. Structure of a Membrane-Embedded Prenyltransferase Homologous to UBIAD. *PLOS Biol.* **2014**, *12* (7), e101911. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001911.

(202) Heide, L. Prenyl Transfer to Aromatic Substrates: Genetics and Enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13* (2), 171–179. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.02.020.

(203) Melzer, M.; Heide, L. Characterization of Polyprenyldiphosphate: 4-Hydroxybenzoate Polyprenyltransferase from Escherichia Coli. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **1994**, *1212* (1), 93–102. https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)90193-7.

(204) Cheng, W.; Li, W. Structural Insights into Ubiquinone Biosynthesis in Membranes. *Science* **2015**, *343* (6173), 878-881. https://doi.org/10.1126/science.1246774. (205) Wessjohann, L; Sontag, B. Prenylation of Benzoic Acid Derivatives Catalyzed by a Transferase FromEscherichia Coli Overproduction: Method Development and Substrate Specificity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35* (15), 1697–1699. https://doi.org/10.1002/anie.199616971.

(206) Gao, J.; Liao, J.; Yang, G.-Y. CAAX-Box Protein, Prenylation Process and Carcinogenesis. Am. J. Transl. Res. 2009, 1 (3), 312-325. PMID : 19956441.

(207) Benetka, W.; Koranda, M.; Eisenhaber, F. Protein Prenylation: An (Almost) Comprehensive Overview on Discovery History, Enzymology, and Significance in Physiology and Disease. *Monatshefte Für Chem. - Chem. Mon.* **2006**, *137* (10), 1241–1281. https://doi.org/10.1007/s00706-006-0534-9.

(208) Wendt, K. U.; Schulz, G. E. Isoprenoid Biosynthesis: Manifold Chemistry Catalyzed by Similar Enzymes. *Structure* **1998**, *6* (2), 127–133. https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00015-X.

(209) Rynkiewicz, M. J.; Cane, D. E.; Christianson, D. W. Structure of Trichodiene Synthase from Fusarium Sporotrichioides Provides Mechanistic Inferences on the Terpene Cyclization Cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (24), 13543–13548. https://doi.org/10.1073/pnas.231313098.

(210) Aaron, J. A.; Christianson, D. W. Trinuclear Metal Clusters in Catalysis by Terpenoid Synthases. *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82* (8), 1585–1597. https://doi.org/10.1351/PAC-CON-09-09-37.

(211) Feil, C.; Sussmuth, R.; Jung, G.; Poralla, K. Site-Directed Mutagenesis of Putative Active-Site Residues in Squalene-Hopene Cyclase. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *242* (1), 51–55. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0051r.x.

(212) Wendt, K. U. Structure and Function of a Squalene Cyclase. *Science* **1997**, *277* (5333), 1811–1815. https://doi.org/10.1126/science.277.5333.1811.

(213) Prisic, S.; Peters, R. J. Synergistic Substrate Inhibition of *Ent*-Copalyl Diphosphate Synthase: A Potential Feed-Forward Inhibition Mechanism Limiting Gibberellin Metabolism. *Plant Physiol.* **2007**, *144* (1), 445–454. https://doi.org/10.1104/pp.106.095208.

(214) Cao, R.; Zhang, Y.; Mann, F. M.; Huang, C.; Mukkamala, D.; Hudock, M. P.; Mead, M. E.; Prisic, S.; Wang, K.; Lin, F.-Y.; Chang, T.-K.; Peters, R. J.; Oldfield, E. Diterpene Cyclases and the Nature of the Isoprene Fold. *Proteins* **2010**, *78* (11), 2417-2432. https://doi.org/10.1002/prot.22751.

(215) Köksal, M.; Jin, Y.; Coates, R. M.; Croteau, R.; Christianson, D. W. Taxadiene Synthase Structure and Evolution of Modular Architecture in Terpene Biosynthesis. *Nature* **2011**, *469* (7328), 116–120. https://doi.org/10.1038/nature09628.

(216) Zhou, Y. J.; Gao, W.; Rong, Q.; Jin, G.; Chu, H.; Liu, W.; Yang, W.; Zhu, Z.; Li, G.; Zhu, G.; Huang, L.; Zhao, Z. K. Modular Pathway Engineering of Diterpenoid Synthases and the Mevalonic Acid Pathway for Miltiradiene Production. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (6), 3234–3241. https://doi.org/10.1021/ja2114486.

(217) Dickschat, J. S. Bacterial Terpene Cyclases. Nat. Prod. Rep. 2016, 33 (1), 87–110. https://doi.org/10.1039/C5NP00102A.

(218) Perveen, S. Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids. In *Terpenes and Terpenoids*; IntechOpen. **2018**. https://doi.org/10.5772/intechopen.79683.

(219) Karuppiah, V.; Ranaghan, K. E.; Leferink, N. G. H.; Johannissen, L. O.; Shanmugam, M.; Gardiner, J. M.; Scrutton, N. S. Structural Basis of Catalysis in the Bacterial Monoterpene Synthases Linalool Synthase and 1,8-Cineole Synthase. *ACS Catal.* **2017**, *7*(9), 6268-6282. https://doi.org/10.1021/acscatal.7b01924.

(220) Nakano, C.; Kim, H.-K.; Ohnishi, Y. Identification and Characterization of the Linalool/Nerolidol Synthase from Streptomyces Clavuligerus. *ChemBioChem* **2011**, *12* (16), 2403–2407. https://doi.org/10.1002/cbic.201100501.

(221) Seol, G. H.; Kim, K. Y. Eucalyptol and Its Role in Chronic Diseases. In *Drug Discovery from Mother Nature*; Springer International Publishing: Cham. **2016**, *929*, 389–398. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41342-6_18.

(222) Neerman, M. Sesquiterpene Lactones: A Diverse Class of Compounds Found in Essential Oils Possessing Antibacterial and Antifungal Properties. *Int. J. Aromather.* **2003**, *13* (2–3), 114–120. https://doi.org/10.1016/S0962-4562(03)00078-X.

(223) Picaud, S.; Olofsson, L.; Brodelius, M.; Brodelius, P. E. Expression, Purification, and Characterization of Recombinant Amorpha-4,11-Diene Synthase from Artemisia Annua L. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *436* (2), 215–226. https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.02.012.

(224) Abdallah, I. I.; Czepnik, M.; van Merkerk, R.; Quax, W. J. Insights into the Three-Dimensional Structure of Amorpha-4,11-Diene Synthase and Probing of Plasticity Residues. *J Nat Prod.* **2016**, *79* (10), 2455-2463. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00236.

(225) Koe, B. K.; Sobin, B. A.; Celmer, W. D. PA 132, a New Antibiotic. I. Isolation and Chemical Properties. *Antibiot. Annu.* **1956**, 672–675. PMID: 13425447.

(226) Cane, D. E.; Oliver, J. S.; Harrison, P. H. M.; Abell, C.; Hubbard, B. R.; Kane, C. T.; Lattman, R. Biosynthesis of Pentalenene and Pentalenolactone. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (11), 4513–4524. https://doi.org/10.1021/ja00167a059.

(227) Lesburg, C. A. Crystal Structure of Pentalenene Synthase: Mechanistic Insights on Terpenoid Cyclization Reactions in Biology. *Science* **1997**, *277* (5333), 1820–1824. https://doi.org/10.1126/science.277.5333.1820.

(228) Gutta, P.; Tantillo, D. J. Theoretical Studies on Farnesyl Cation Cyclization: Pathways to Pentalenene. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (18), 6172–6179. https://doi.org/10.1021/ja058031n.

(229) Tetzlaff, C. N.; You, Z.; Cane, D. E.; Takamatsu, S.; Omura, S.; Ikeda, H. A Gene Cluster for Biosynthesis of the Sesquiterpenoid Antibiotic Pentalenolactone in *Streptomyces Avermitilis*. *Biochemistry* **2006**, *45* (19), 6179–6186. https://doi.org/10.1021/bi060419n.

(230) Dickschat, J. S. Bacterial Diterpene Biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (45), 15964–15976. https://doi.org/10.1002/anie.201905312. (231) Dudley, M. W.; Dueber, M. T.; West, C. A. Biosynthesis of the Macrocyclic Diterpene Casbene in Castor Bean (*Ricinus Communis* L.) Seedlings: Changes in Enzyme Levels Induced by Fungal Infection and Intracellular Localization of the Pathway. *Plant Physiol.* **1986**, *81* (2), 335–342. https://doi.org/10.1104/pp.81.2.335.

(232) Sitton, D.; West, C. A. Casbene: An Anti-Fungal Diterpene Produced in Cell-Free Extracts of Ricinus Communis Seedlings. *Phytochemistry* **1975**, *14* (9), 1921–1925. https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)83098-6.

(233) Zhang, C.-Y.; Wu, Y.-L.; Zhang, P.; Chen, Z.-Z.; Li, H.; Chen, L.-X. Anti-Inflammatory Lathyrane Diterpenoids from *Euphorbia Lathyris. J. Nat. Prod.* **2019**, *82* (4), 756–764. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00600.

(234) Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. Plant Antitumor Agents. VI. Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from Taxus Brevifolia. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* (9), 2325–2327. https://doi.org/10.1021/ja00738a045.

(235) Schiff, P. B.; Horwitz, S. B. Taxol Stabilizes Microtubules in Mouse Fibroblast Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, *77* (3), 1561–1565. https://doi.org/10.1073/pnas.77.3.1561.

(236) Freud, Y.; Ansbacher, T.; Major, D. T. Catalytic Control in the Facile Proton Transfer in Taxadiene Synthase. *ACS Catal.* **2017**, 7 (11), 7653–7657. https://doi.org/10.1021/acscatal.7b02824.

(237) Gerber, N. N. Volatile Substances from Actinomycetes: Their Role in the Odor Pollution of Water. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **1979**, *7* (3), 191–214. https://doi.org/10.3109/10408417909082014.

(238) Harris, G. G.; Lombardi, P. M.; Pemberton, T. A.; Matsui, T.; Weiss, T. M.; Cole, K. E.; Köksal, M.; Murphy, F. V.; Vedula, L. S.; Chou, W. K. W.; Cane, D. E.; Christianson, D. W. Structural Studies of Geosmin Synthase, a Bifunctional Sesquiterpene Synthase with Aα Domain Architecture That Catalyzes a Unique Cyclization–Fragmentation Reaction Sequence. *Biochemistry* **2015**, *54* (48), 7142–7155. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01143.

(239) Jiang, J.; Cane, D. E. Geosmin Biosynthesis. Mechanism of the Fragmentation-Rearrangement in the Conversion of Germacradienol to Geosmin. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (2), 428–429. https://doi.org/10.1021/ja077792i.

(240) Cane, D. E.; He, X.; Kobayashi, S.; Ōmura, S.; Ikeda, H. Geosmin Biosynthesis in Streptomyces Avermitilis. Molecular Cloning, Expression, and Mechanistic Study of the Germacradienol/Geosmin Synthase. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2006**, *59* (8), 471–479. https://doi.org/10.1038/ja.2006.66.

(241) Pazouki, L; Niinemets, Ü. Multi-Substrate Terpene Synthases: Their Occurrence and Physiological Significance. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1019. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01019.

(242) Steele, C. L.; Crock, J.; Bohlmann, J.; Croteau, R. Sesquiterpene Synthases from Grand Fir (Abies Grandis). *J. Biol. Chem.* **1998**, 273 (4), 2078–2089. https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2078.

(243) Miller, D. J.; Yu, F.; Knight, D. W.; Allemann, R. K. 6- and 14-Fluoro Farnesyl Diphosphate: Mechanistic Probes for the Reaction Catalysed by Aristolochene Synthase. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (5), 962. https://doi.org/10.1039/b817194g.

(244) Harms, V.; Kirschning, A.; Dickschat, J. S. Nature-Driven Approaches to Non-Natural Terpene Analogues. *Nat. Prod. Rep.* **2020**, 37 (8), 1080–1097. https://doi.org/10.1039/C9NP00055K.

(245) Ward, V. C. A.; Chatzivasileiou, A. O.; Stephanopoulos, G. Metabolic Engineering of Escherichia Coli for the Production of Isoprenoids. *FEMS Microbiol. Lett.* **2018**, *365* (10). https://doi.org/10.1093/femsle/fny079.

(246) Daletos, G. Novel Strategies and Platforms for Industrial Isoprenoid Engineering. *Trends Biotechnol.* **2020**, *38* (7), 811-822. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.03.009.

(247) Martin, V. J. J.; Pitera, D. J.; Withers, S. T.; Newman, J. D.; Keasling, J. D. Engineering a Mevalonate Pathway in Escherichia Coli for Production of Terpenoids. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21* (7), 796–802. https://doi.org/10.1038/nbt833.

(248) King, J. R.; Woolston, B. M.; Stephanopoulos, G. Designing a New Entry Point into Isoprenoid Metabolism by Exploiting Fructose-6-Phosphate Aldolase Side-Reactivity of Escherichia Coli. *ACS Synth. Biol.* **2017**, *6* (7), 1416-1426. https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00072.

(249) Kirby, J.; Nishimoto, M.; Chow, R. W. N.; Baidoo, E. E. K.; Wang, G.; Martin, J.; Schackwitz, W.; Chan, R.; Fortman, J. L.; Keasling, J. D. Enhancing Terpene Yield from Sugars via Novel Routes to 1-Deoxy-d-Xylulose 5-Phosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81* (1), 130–138. https://doi.org/10.1128/AEM.02920-14.

(250) Kirby, J.; Dietzel, K. L.; Wichmann, G.; Chan, R.; Antipov, E.; Moss, N.; Baidoo, E. E. K.; Jackson, P.; Gaucher, S. P.; Gottlieb, S.; LaBarge, J.; Mahatdejkul, T.; Hawkins, K. M.; Muley, S.; Newman, J. D.; Liu, P.; Keasling, J. D.; Zhao, L. Engineering a Functional 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate (DXP) Pathway in Saccharomyces Cerevisiae. *Metab. Eng.* **2016**, *38*, 494–503. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.10.017.

(251) Tsuruta, H.; Paddon, C. J.; Eng, D.; Lenihan, J. R.; Horning, T.; Anthony, L. C.; Regentin, R.; Keasling, J. D.; Renninger, N. S.; Newman, J. D. High-Level Production of Amorpha-4,11-Diene, a Precursor of the Antimalarial Agent Artemisinin, in Escherichia Coli. *PLoS ONE* **2009**, *4* (2), e4489. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004489.

(252) Shiba, Y.; Paradise, E. M.; Kirby, J.; Ro, D.-K.; Keasling, J. D. Engineering of the Pyruvate Dehydrogenase Bypass in Saccharomyces Cerevisiae for High-Level Production of Isoprenoids. *Metab. Eng.* **2007**, *9* (2), 160–168. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.10.005.

(253) Kang, A.; George, K. W.; Wang, G.; Baidoo, E.; Keasling, J. D.; Lee, T. S. Isopentenyl Diphosphate (IPP)-Bypass Mevalonate Pathways for Isopentenol Production. *Metab. Eng.* **2016**, *34*, 25–35. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.12.002.

(254) Ajikumar, P. K.; Xiao, W.-H.; Tyo, K. E.; Wang, Y.; Simeon, F.; Leonard, E.; Mucha, O.; Phon, T. H.; Pfeifer, B.; Stephanopoulos, G. Isoprenoid Pathway Optimization for Taxol Precursor Overproduction in Escherichia Coli. *Science* **2010**, *330* (6000), 70–74. https://doi.org/10.1126/science.1191652.

(255) Kim, S.-W.; Keasling, J. D. Metabolic Engineering of the Nonmevalonate Isopentenyl Diphosphate Synthesis Pathway in Escherichia Coli Enhances Lycopene Production. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *72* (4), 408-415. https://doi.org/10.1002/1097-0290(20000220)72:4<408::aid-bit1003>3.0.co;2-h.

(256) Farmer, W. R.; Liao, J. C. Precursor Balancing for Metabolic Engineering of Lycopene Production in Escherichia Coli. *Biotechnol. Prog.* **2001**, *17* (1), 57–61. https://doi.org/10.1021/bp000137t.

(257) Ye, L.; Zhang, C.; Bi, C.; Li, Q.; Zhang, X. Combinatory Optimization of Chromosomal Integrated Mevalonate Pathway for β-Carotene Production in Escherichia Coli. *Microb. Cell Factories* **2016**, *15* (1), 202. https://doi.org/10.1186/s12934-016-0607-3.

(258) George, K. W.; Alonso-Gutierrez, J.; Keasling, J. D.; Lee, T. S. Isoprenoid Drugs, Biofuels, and Chemicals—Artemisinin, Farnesene, and Beyond. In *Biotechnology of Isoprenoids*; Springer International Publishing: Cham. **2015**, *148*, 355–389. https://doi.org/10.1007/10_2014_288.

(259) Newman, J. D.; Marshall, J.; Chang, M.; Nowroozi, F.; Paradise, E.; Pitera, D.; Newman, K. L.; Keasling, J. D. High-Level Production of Amorpha-4,11-Diene in a Two-Phase Partitioning Bioreactor of Metabolically EngineeredEscherichia Coli. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *95* (4), 684–691. https://doi.org/10.1002/bit.21017.

(260) Kizer, L.; Pitera, D. J.; Pfleger, B. F.; Keasling, J. D. Application of Functional Genomics to Pathway Optimization for Increased Isoprenoid Production. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74* (10), 3229–3241. https://doi.org/10.1128/AEM.02750-07.

(261) Anthony, J. R.; Anthony, L. C.; Nowroozi, F.; Kwon, G.; Newman, J. D.; Keasling, J. D. Optimization of the Mevalonate-Based Isoprenoid Biosynthetic Pathway in Escherichia Coli for Production of the Anti-Malarial Drug Precursor Amorpha-4,11-Diene. *Metab. Eng.* **2009**, *11* (1), 13–19. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2008.07.007.

(262) Partow, S.; Siewers, V.; Daviet, L.; Schalk, M.; Nielsen, J. Reconstruction and Evaluation of the Synthetic Bacterial MEP Pathway in Saccharomyces Cerevisiae. *PLoS ONE* **2012**, *7* (12), e52498. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052498.

(263) Carlsen, S.; Ajikumar, P. K.; Formenti, L. R.; Zhou, K.; Phon, T. H.; Nielsen, M. L.; Lantz, A. E.; Kielland-Brandt, M. C.; Stephanopoulos, G. Heterologous Expression and Characterization of Bacterial 2-C-Methyl-d-Erythritol-4-Phosphate Pathway in Saccharomyces Cerevisiae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97* (13), 5753–5769. https://doi.org/10.1007/s00253-013-4877-y.

(264) Cardona, F.; Orozco, H.; Friant, S.; Aranda, A.; del Olmo, M. The Saccharomyces Cerevisiae Flavodoxin-like Proteins Ycp4 and Rfs1 Play a Role in Stress Response and in the Regulation of Genes Related to Metabolism. *Arch. Microbiol.* **2011**, *193* (7), 515–525. https://doi.org/10.1007/s00203-011-0696-7.

(265) Rivasseau, C.; Seemann, M.; Boisson, A.-M.; Streb, P.; Gout, E.; Douce, R.; Rohmer, M.; Bligny, R. Accumulation of 2- *C*-Methyld-Erythritol 2,4-Cyclodiphosphate in Illuminated Plant Leaves at Supraoptimal Temperatures Reveals a Bottleneck of the Prokaryotic Methylerythritol 4-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. *Plant Cell Environ.* **2009**, *32* (1), 82–92. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01903.x.

(266) Artsatbanov, V. Yu.; Vostroknutova, G. N.; Shleeva, M. O.; Goncharenko, A. V.; Zinin, A. I.; Ostrovsky, D. N.; Kapreliants, A. S. Influence of Oxidative and Nitrosative Stress on Accumulation of Diphosphate Intermediates of the Non-Mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Corynebacteria and Mycobacteria. *Biochem. Mosc.* **2012**, *77* (4), 362–371. https://doi.org/10.1134/S0006297912040074.

(267) Zhang, H.; Wang, X. Modular Co-Culture Engineering, a New Approach for Metabolic Engineering. *Metab. Eng.* **2016**, *37*, 114–121. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.05.007.

(268) Zhang, H.; Pereira, B.; Li, Z.; Stephanopoulos, G. Engineering *Escherichia Coli* Coculture Systems for the Production of Biochemical Products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112* (27), 8266–8271. https://doi.org/10.1073/pnas.1506781112.

(269) Zhou, K.; Qiao, K.; Edgar, S.; Stephanopoulos, G. Distributing a Metabolic Pathway among a Microbial Consortium Enhances Production of Natural Products. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33* (4), 377–383. https://doi.org/10.1038/nbt.3095.

(270) Willrodt, C.; Hoschek, A.; Bühler, B.; Schmid, A.; Julsing, M. K. Coupling Limonene Formation and Oxyfunctionalization by Mixed-Culture Resting Cell Fermentation: De Novo Synthesis of Perillyl Acetate. *Biotechnol. Bioeng.* **2015**, *112* (9), 1738–1750. https://doi.org/10.1002/bit.25592.

(271) Li, M.; Nian, R.; Xian, M.; Zhang, H. Metabolic Engineering for the Production of Isoprene and Isopentenol by Escherichia Coli. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102* (18), 7725–7738. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9200-5.

(272) Davisson, V. J.; Woodside, A. B.; Neal, T. R.; Stremler, K. E.; Muehlbacher, M.; Poulter, C. D. Phosphorylation of Isoprenoid Alcohols. J. Org. Chem. **1986**, *51* (25), 4768–4779. https://doi.org/10.1021/jo00375a005.

(273) Asano, Y.; Mihara, Y.; Yamada, H. A Novel Selective Nucleoside Phosphorylating Enzyme from Morganella Morganii. *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, *87* (6), 732–738. https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80145-5.

(274) Morton, R. K. The Phosphotransferase Activity of Phosphatases. 3. Comparison of Enzymic Catalysis by Acid Phosphatase with Non-Enzymic Catalysis at Acid PH Values. *Biochem. J.* **1958**, *70* (1), 150–155. https://doi.org/10.1042/bj0700150.

(275) van Herk, T.; Hartog, A. F.; van der Burg, A. M.; Wever, R. Regioselective Phosphorylation of Carbohydrates and Various Alcohols by Bacterial Acid Phosphatases; Probing the Substrate Specificity of the Enzyme From Shigella Flexneri. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347* (7–8), 1155–1162. https://doi.org/10.1002/adsc.200505072.

(276) Chen, M.; Poulter, C. D. Characterization of Thermophilic Archaeal Isopentenyl Phosphate Kinases. *Biochemistry* **2010**, *49* (1), 207–217. https://doi.org/10.1021/bi9017957.

(277) Zhao, S.; Smith, K. S.; Deveau, A. M.; Dieckhaus, C. M.; Johnson, M. A.; Macdonald, T. L.; Cook, J. M. Biological Activity of the Tryprostatins and Their Diastereomers on Human Carcinoma Cell Lines. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (8), 1559–1562. https://doi.org/10.1021/jm0155953.

(278) Phulara, S. C.; Chaturvedi, P.; Chaurasia, D.; Diwan, B.; Gupta, P. Modulation of Culture Medium Confers High-Specificity Production of Isopentenol in Bacillus Subtilis. *J. Biosci. Bioeng.* **2019**, *127* (4), 458–464. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.10.002.

(279) Zheng, Y.; Liu, Q.; Li, L.; Qin, W.; Yang, J.; Zhang, H.; Jiang, X.; Cheng, T.; Liu, W.; Xu, X.; Xian, M. Metabolic Engineering of Escherichia Coli for High-Specificity Production of Isoprenol and Prenol as next Generation of Biofuels. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6* (1), 57. https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-57.

(280) Whited, G. M.; Feher, F. J.; Benko, D. A.; Cervin, M. A.; Chotani, G. K.; McAuliffe, J. C.; LaDuca, R. J.; Ben-Shoshan, E. A.; Sanford, K. J. TECHNOLOGY UPDATE: Development of a Gas-Phase Bioprocess for Isoprene-Monomer Production Using Metabolic Pathway Engineering. *Ind. Biotechnol.* **2010**, *6* (3), 152–163. https://doi.org/10.1089/ind.2010.6.152.

(281) Marliere, P. Production D'alcenes Par Decarboxylation Enzymatique D'acides 3-Hydroxy-Alcanoïques. *WO 2010/001078,* January 7, **2010**.

(282) Bockrath, R. Procédé De Fermentation Perfectionné. WO 2014/086780, June 12, 2014.

(283) Shakeel, K.; Javaid, M.; Muazzam, Y.; Naqvi, S. R.; Taqvi, S. A. A.; Uddin, F.; Mehran, M. T.; Sikander, U.; Niazi, M. B. K. Performance Comparison of Industrially Produced Formaldehyde Using Two Different Catalysts. *Processes* **2020**, *8* (5), 571. https://doi.org/10.3390/pr8050571.

(284) Roode-Gutzmer, Q. I.; Kaiser, D.; Bertau, M. Renewable Methanol Synthesis. *ChemBioEng Rev.* **2019**, *6* (6), 209–236. https://doi.org/10.1002/cben.201900012.

(285) Warnqvist, J.; Olsson Släger, J.; Eliasson, A. Procédé D'élimination Du Soufre Du Méthanol Brut. *WO 2015/053704*, April 16, **2015**.

(286) Ninnemann, E.; Kim, G.; Laich, A.; Almansour, B.; Terracciano, A. C.; Park, S.; Thurmond, K.; Neupane, S.; Wagnon, S.; Pitz, W. J.; Vasu, S. S. Co-Optima Fuels Combustion: A Comprehensive Experimental Investigation of Prenol Isomers. *Fuel* **2019**, *254*, 115630. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.115630.

(287) Yang, L; Wang, C.; Zhou, J.; Kim, S.-W. Combinatorial Engineering of Hybrid Mevalonate Pathways in Escherichia Coli for Protoilludene Production. *Microb. Cell Factories* **2016**, *15* (1). https://doi.org/10.1186/s12934-016-0409-7.

(288) Tanaka, N.; Hasan, Z.; Hartog, A. F.; van Herk, T.; Wever, R. Phosphorylation and Dephosphorylation of Polyhydroxy Compounds by Class A Bacterial Acid Phosphatases. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (16), 2833. https://doi.org/10.1039/b304012g.

(289) Babich, L. Synthesis of Non-Natural Carbohydrates from Glycerol and Aldehydes in a One-Pot Four-Enzyme Cascade Reaction. **2011**, 13 (10), 2895-2900. https://doi.org/10.1039/C1GC15429J.

(290) Thaller, M. C.; Berlutti, F.; Schippa, S.; Selan, L.; Rossolini, G. M. Bacterial Acid Phosphatase Gene Fusions Useful as Targets for Cloning-Dependent Insertional Inactivation. *Biotechnol. Prog.* **1998**, *14* (2), 241–247. https://doi.org/10.1021/bp980009t.

(291) Gandhi, N.; Chandra, S. A Comparative Analysis of Three Classes of Bacterial Non-Specific Acid Phosphatases and Archaeal Phosphoesterases: Evolutionary Perspective. *Acta Inform. Medica* **2012**, *20* (3), 167. https://doi.org/10.5455/aim.2012.20.167-173.

(292) Neal, A. L.; Blackwell, M.; Akkari, E.; Guyomar, C.; Clark, I.; Hirsch, P. R. Phylogenetic Distribution, Biogeography and the Effects of Land Management upon Bacterial Non-Specific Acid Phosphatase Gene Diversity and Abundance. *Plant Soil* **2018**, *427* (1–2), 175–189. https://doi.org/10.1007/s11104-017-3301-2.

(293) Pond, J. L.; Eddy, C. K.; Mackenzie, K. F.; Conway, T.; Borecky, D. J. Cloning, Sequencing, and Characterization of the Principal Acid Phosphatase, the PhoC+ Product, from Zymomonas Mobilist. *J BACTERIOL* **1989**, *171* (2), 767-774. https://doi.org/10.1128/jb.171.2.767-774.1989.

(294) Uerkvitz, W. Periplasmic Nonspecific Acid Phosphatase II from Salmonella Typhimurium LT2. Crystallization, Detergent Reactivation, and Phosphotransferase Activity. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (30), 15823–15830. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)37662-8.

(295) Bloch, K. C.; Nadarajah, R.; Jacobs, R. Chryseobacterium Meningosepticum: An Emerging Pathogen among Immunocompromised Adults. Report of 6 Cases and Literature Review. *Medicine (Baltimore)* **1997**, *76* (1), 30–41. https://doi.org/10.1097/00005792-199701000-00003.

(296) Stukey, J.; Carman, G. M. Identification of a Novel Phosphatase Sequence Motif: Phosphatase Sequence Motif. *Protein Sci.* **1997**, *6* (2), 469–472. https://doi.org/10.1002/pro.5560060226.

(297) Vincent, J. B.; Crowder, M. W.; Averill, B. A. Hydrolysis of Phosphate Monoesters: A Biological Problem with Multiple Chemical Solutions. *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17* (3), 105–110. https://doi.org/10.1016/0968-0004(92)90246-6.

(298) Makde, R. D.; Gupta, G. D.; Mahajan, S. K.; Kumar, V. Structural and Mutational Analyses Reveal the Functional Role of Active-Site Lys-154 and Asp-173 of Salmonella Typhimurium AphA Protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *464* (1), 70–79. https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.03.043.

(299) Calderone, V.; Forleo, C.; Benvenuti, M.; Thaller, M. C.; Rossolini, G. M.; Mangani, S. A Structure-Based Proposal for the Catalytic Mechanism of the Bacterial Acid Phosphatase AphA Belonging to the DDDD Superfamily of Phosphohydrolases. *J. Mol. Biol.* **2006**, *355* (4), 708–721. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.10.068.

(300) Burroughs, A. M.; Allen, K. N.; Dunaway-Mariano, D.; Aravind, L. Evolutionary Genomics of the HAD Superfamily: Understanding the Structural Adaptations and Catalytic Diversity in a Superfamily of Phosphoesterases and Allied Enzymes. *J. Mol. Biol.* **2006**, *361* (5), 1003–1034. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.049.

(301) Allen, K. N.; Dunaway-Mariano, D. Phosphoryl Group Transfer: Evolution of a Catalytic Scaffold. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29* (9), 495–503. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.07.008.

(302) Axelrod, B. A new mode of enzymatic phosphate transfer. *J. Biol. Chem.* **1948**, *172* (1), 1–13. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)35606-0.

(303) Appleyard, J. The Effect of Alcohols on the Hydrolysis of Sodium Phenolphthalein Diphosphate by Prostatic Extracts. *Biochem. J.* **1948**, *42* (4), 596–597. https://doi.org/10.1042/bj0420596.

(304) Tasnádi, G.; Lukesch, M.; Zechner, M.; Jud, W.; Hall, M.; Ditrich, K.; Baldenius, K.; Hartog, A. F.; Wever, R.; Faber, K. Exploiting Acid Phosphatases in the Synthesis of Phosphorylated Monoalcohols and Diols. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *2016* (1), 45–50. https://doi.org/10.1002/ejoc.201501306.

(305) Mabanglo, M. F.; Schubert, H. L.; Chen, M.; Hill, C. P.; Poulter, C. D. X-Ray Structures of Isopentenyl Phosphate Kinase. ACS Chem. Biol. **2010**, 5 (5), 517–527. https://doi.org/10.1021/cb100032g.

(306) Dellas, N.; Noel, J. P. Mutation of Archaeal Isopentenyl Phosphate Kinase Highlights Mechanism and Guides Phosphorylation of Additional Isoprenoid Monophosphates. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5* (6), 589–601. https://doi.org/10.1021/cb1000313.

(307) Marco-Marín, C.; Gil-Ortiz, F.; Pérez-Arellano, I.; Cervera, J.; Fita, I.; Rubio, V. A Novel Two-Domain Architecture Within the Amino Acid Kinase Enzyme Family Revealed by the Crystal Structure of Escherichia Coli Glutamate 5-Kinase. *J. Mol. Biol.* **2007**, *367* (5), 1431–1446. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.01.073.

(308) Marina, A.; Alzari, P. M.; Bravo, J.; Uriarte, M.; Barcelona, B.; Fita, I.; Rubio, V. Carbamate Kinase: New Structural Machinery for Making Carbamoyl Phosphate, the Common Precursor of Pyrimidines and Arginine. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **1999**, *8* (4), 934–940. https://doi.org/10.1110/ps.8.4.934.

(309) Ramón-Maiques, S.; Marina, A.; Gil-Ortiz, F.; Fita, I.; Rubio, V. Structure of Acetylglutamate Kinase, a Key Enzyme for Arginine Biosynthesis and a Prototype for the Amino Acid Kinase Enzyme Family, during Catalysis. *Structure* **2002**, *10* (3), 329–342. https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00721-9.

(310) McClory, J.; Timson, D. J.; Singh, W.; Zhang, J.; Huang, M. Reaction Mechanism of Isopentenyl Phosphate Kinase: A QM/MM Study. J. Phys. Chem. B. **2017**, *121* (49), 11062-11071. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.7b08770.

(311) Vergne-Vaxelaire, C.; Bordier, F.; Fossey, A.; Besnard-Gonnet, M.; Debard, A.; Mariage, A.; Pellouin, V.; Perret, A.; Petit, J.-L.; Stam, M.; Salanoubat, M.; Weissenbach, J.; De Berardinis, V.; Zaparucha, A. Nitrilase Activity Screening on Structurally Diverse Substrates: Providing Biocatalytic Tools for Organic Synthesis. *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355* (9), 1763–1779. https://doi.org/10.1002/adsc.201201098.

(312) Herk, T. van; Hartog, A. F.; Babich, L.; Schoemaker, H. E.; Wever, R. Improvement of an Acid Phosphatase/DHAP-Dependent Aldolase Cascade Reaction by Using Directed Evolution. *ChemBioChem* **2009**, *10* (13), 2230–2235. https://doi.org/10.1002/cbic.200900102.

(313) Barkley, S. J.; Cornish, R. M.; Poulter, C. D. Identification of an Archaeal Type II Isopentenyl Diphosphate Isomerase in Methanothermobacter Thermautotrophicus. *J BACTERIOL* **2004**, *186*, 1811-1817. https://doi.org/10.1128/jb.186.6.1811-1817.2004.

(314) Henikoff, S.; Henikoff, J. G. Amino Acid Substitution Matrices from Protein Blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89* (22), 10915–10919. https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10915.

(315) Couillaud, J.; Rico, J.; Rubini, A.; Hamrouni, T.; Courvoisier-Dezord, E.; Petit, J.-L.; Mariage, A.; Darii, E.; Duquesne, K.; de Berardinis, V.; Iacazio, G. Simplified in Vitro and in Vivo Bioaccess to Prenylated Compounds. *ACS Omega* **2019**, *4* (4), 7838–7849. https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00561.

(316) Rico, J.; Duquesne, K.; Petit, J.-L.; Mariage, A.; Darii, E.; Peruch, F.; de Berardinis, V.; Iacazio, G. Exploring Natural Biodiversity to Expand Access to Microbial Terpene Synthesis. *Microb. Cell Factories* **2019**, *18* (1), 23. https://doi.org/10.1186/s12934-019-1074-4.

(317) Jaenicke, S.; Bunk, B.; Wibberg, D.; Spröer, C.; Hersemann, L.; Blom, J.; Winkler, A.; Schatschneider, S.; Albaum, S. P.; Kölliker, R.; Goesmann, A.; Pühler, A.; Overmann, J.; Vorhölter, F.-J. Complete Genome Sequence of the Barley Pathogen *Xanthomonas Translucens* Pv. Translucens DSM 18974 ^T (ATCC 19319 ^T). *Genome Announc.* **2016**, *4* (6), e01334-16, /ga/4/6/e01334-16.

(318) Thaller, M. C.; Berlutti, F.; Schippa, S.; Lombardi, G.; Rossolini, G. M. Characterization and Sequence of PhoC, the Principal Phosphate-Irrepressible Acid Phosphatase of Morganella Morganii. *Microbiology* **1994**, *140* (6), 1341–1350. https://doi.org/10.1099/00221287-140-6-1341.

(319) Uchiya, K.-I.; Tohsuji, M.; Nikai, T.; Sugihara, H.; Sasakawa, C. Identification and Characterization of PhoN-Sf, a Gene on the Large Plasmid of Shigella FLexneri 2a Encoding a Nonspecific Phosphatase. *J BACTERIOL* **1996**, *178* (8), 4548-4554.

(320) Kasahara, M.; Nakata, A.; Shinagawa, H. Molecular Analysis of the Salmonella Typhimurium PhoN Gene, Which Encodes Nonspecific Acid Phosphatase. J. Bacteriol. **1991**, *173* (21), 6760–6765. https://doi.org/10.1128/JB.173.21.6760-6765.1991.

(321) Ishikawa, K.; Mihara, Y.; Gondoh, K.; Suzuki, E.; Asano, Y. X-Ray Structures of a Novel Acid Phosphatase from Escherichia Blattae and Its Complex with the Transition-State Analog Molybdate. *EMBO J.* **2000**, *19* (11), 2412–2423. https://doi.org/10.1093/emboj/19.11.2412.

(322) Li, S.-M. Prenylated Indole Derivatives from Fungi: Structure Diversity, Biological Activities, Biosynthesis and Chemoenzymatic Synthesis. *Nat Prod Rep* **2010**, *27* (1), 57–78. https://doi.org/10.1039/B909987P.

(323) Ma, Y.-M.; Liang, X.-A.; Kong, Y.; Jia, B. Structural Diversity and Biological Activities of Indole Diketopiperazine Alkaloids from Fungi. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (35), 6659–6671. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01772.

(324) Yu, H.-F.; Qin, X.-J.; Ding, C.-F.; Wei, X.; Yang, J.; Luo, J.-R.; Liu, L.; Khan, A.; Zhang, L.-C.; Xia, C.-F.; Luo, X.-D. Nepenthe-Like Indole Alkaloids with Antimicrobial Activity from *Ervatamia Chinensis*. Org. Lett. **2018**, 20 (13), 4116–4120. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b01675.

(325) Ebead, G. A.; Overy, D. P.; Berrué, F.; Kerr, R. G. Westerdykella Reniformis Sp. Nov., Producing the Antibiotic Metabolites Melinacidin IV and Chetracin B. *IMA FUNGUS* **2012**, *3* (2), 189-201. https://doi.org/10.5598/imafungus.2012.03.02.11.

(326) Tsukamoto, S.; Kato, H.; Samizo, M.; Nojiri, Y.; Onuki, H.; Hirota, H.; Ohta, T. Notoamides F–K, Prenylated Indole Alkaloids Isolated from a Marine-Derived *Aspergillus* Sp. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71* (12), 2064–2067. https://doi.org/10.1021/np800471y.

(327) Song, L.-L.; Mu, Y.-L.; Zhang, H.-C.; Wu, G.-Y.; Sun, J.-Y. A New Indole Alkaloid with Anti-Inflammatory from the Branches of *Nauclea Officinalis. Nat. Prod. Res.* **2020**, *34* (16), 2283–2288. https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1536130.

(328) Hayashi, H.; Takiuchi, K.; Murao, S.; Arai, M. Structure and Insecticidal Activity of New Indole Alkaloids, Okaramines A and B, from *Penicillium Simplicissimum* AK-40. *Agric. Biol. Chem.* **1989**, *53* (2), 461–469. https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869287.

(329) Wollinsky, B.; Ludwig, L.; Hamacher, A.; Yu, X.; Kassack, M. U.; Li, S.-M. Prenylation at the Indole Ring Leads to a Significant Increase of Cytotoxicity of Tryptophan-Containing Cyclic Dipeptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (12), 3866–3869. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.04.119.

(330) Usui, T.; Kondoh, M.; Cui, C.-B.; Mayumi, T.; Osada, H. Tryprostatin A, a Specific and Novel Inhibitor of Microtubule Assembly. *Biochem. J.* **1998**, *333* (Pt 3), 543-548. https://doi.org/10.1042/bj3330543.

(331) Cui, C.-B.; Kakeya, H. Novel MammalianCell Cycle Inhibitors, Tryprostatins A, B and Other Diketopiperazines Produced by Aspergillus Fumigatus. J. Antibiot. (Tokyo). **1996**, 49 (6), 527-533. https://doi.org/10.7164/antibiotics.49.527.

(332) Sanz-Cervera, J. F.; Stocking, E. M.; Usui, T.; Osada, H.; Williams, R. M. Synthesis and Evaluation of Microtubule Assembly Inhibition and Cytotoxicity of Prenylated Derivatives of Cyclo-I-Trp-I-Pro. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8* (10), 2407–2415. https://doi.org/10.1016/S0968-0896(00)00171-1.

(333) Huisman, M.; Rahaman, M.; Asad, S.; Oehm, S.; Novin, S.; Rheingold, A. L.; Hossain, M. M. Total Synthesis of Tryprostatin B: Synthesis and Asymmetric Phase- Transfer-Catalyzed Reaction of Prenylated Gramine Salt. *Org Lett* **2019**, *21* (1), 134-137. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b03593.

(334) Caballero, E.; Avendaño, C.; Menéndez, J. C. Brief Total Synthesis of the Cell Cycle Inhibitor Tryprostatin B and Related Preparation of Its Alanine Analogue. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (18), 6944–6951. https://doi.org/10.1021/jo0347031.

(335) Yamakawa, T.; Ideue, E.; Shimokawa, J.; Fukuyama, T. Total Synthesis of Tryprostatins A and B. *Angew. Chem.* **2010**, *122* (48), 9448–9451. https://doi.org/10.1002/ange.201004963.

(336) Nierman, W. C.; Pain, A.; Anderson, M. J.; Wortman, J. R.; Kim, H. S.; Arroyo, J.; Berriman, M.; Abe, K.; Archer, D. B.; Bermejo, C.; Bennett, J.; Bowyer, P.; Chen, D.; Collins, M.; Coulsen, R.; Davies, R.; Dyer, P. S.; Farman, M.; Fedorova, N.; Fedorova, N.; Feldblyum, T. V.; Fischer, R.; Fosker, N.; Fraser, A.; García, J. L.; García, M. J.; Goble, A.; Goldman, G. H.; Gomi, K.; Griffith-Jones, S.; Gwilliam, R.; Haas, B.; Haas, H.; Harris, D.; Horiuchi, H.; Huang, J.; Humphray, S.; Jiménez, J.; Keller, N.; Khouri, H.; Kitamoto, K.; Kobayashi, T.; Konzack, S.; Kulkarni, R.; Kumagai, T.; Lafton, A.; Latgé, J.-P.; Li, W.; Lord, A.; Lu, C.; Majoros, W. H.; May, G. S.; Miller, B. L.; Mohamoud, Y.; Molina, M.; Monod, M.; Mouyna, I.; Mulligan, S.; Murphy, L.; O'Neil, S.; Paulsen, I.; Peñalva, M. A.; Pertea, M.; Price, C.; Pritchard, B. L.; Quail, M. A.; Rabbinowitsch, E.; Rawlins, N.; Rajandream, M.-A.; Reichard, U.; Renauld, H.; Robson, G. D.; de Córdoba, S. R.; Rodríguez-Peña, J. M.; Ronning, C. M.; Rutter, S.; Salzberg, S. L.; Sanchez, M.; Sánchez-Ferrero, J. C.; Saunders, D.; Seeger, K.; Squares, R.; Squares, S.; Takeuchi, M.; Hall, N.; Barrell, B.; Denning, D. W. Genomic Sequence of the Pathogenic and Allergenic Filamentous Fungus Aspergillus Fumigatus. *Nature* **205**, *438* (7071), 1151–1156. https://doi.org/10.1038/nature04332.

(337) Steffan, N.; Grundmann, A.; Yin, W.-B.; Kremer, A.; Li, S.-M. Indole Prenyltransferases from Fungi: A New Enzyme Group with High Potential for the Production of Prenylated Indole Derivatives. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16* (2), 218–231. https://doi.org/10.2174/092986709787002772.

(338) Huynh, Q. K.; McKinsey, T. A. Protein Kinase D Directly Phosphorylates Histone Deacetylase 5 via a Random Sequential Kinetic Mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, *450* (2), 141–148. https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.02.014.

(339) Gomes, M. D.; Woodley, J. M. Considerations When Measuring Biocatalyst Performance. *Molecules* **2019**, *24* (19), 3573-3584. https://doi.org/10.3390/molecules24193573.

(340) Chenault, H. K.; Simon, E. S.; Whitesides, G. M. Cofactor Regeneration for Enzyme-Catalysed Synthesis. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **1988**, *6* (1), 221–270. https://doi.org/10.1080/02648725.1988.10647849.

(341) Hirschbein, B. L.; Mazenod, F. P.; Whitesides, G. M. Synthesis of Phosphoenolypyruvate and Its Use in ATP Cofactor Regeneration. *J. Org. Chem.* **1982**, *47* (19), 3765–3766. https://doi.org/10.1021/jo00140a036.

(342) van Herk, T.; Hartog, A. F.; Schoemaker, H. E.; Wever, R. Simple Enzymatic in Situ Generation of Dihydroxyacetone Phosphate and Its Use in a Cascade Reaction for the Production of Carbohydrates: Increased Efficiency by Phosphate Cycling. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (16), 6244–6247. https://doi.org/10.1021/j0060644a.

(343) Maiya, S.; Grundmann, A.; Li, S.-M.; Turner, G. Improved Tryprostatin B Production by Heterologous Gene Expression in Aspergillus Nidulans. *Fungal Genet. Biol.* **2009**, *46* (5), 436–440. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.01.003.

(344) Maiya, S.; Grundmann, A.; Li, S.; Turner, G. The Fumitremorgin Gene Cluster of *Aspergillus Fumigatus* : Identification of a Gene Encoding Brevianamide F Synthetase. *ChemBioChem* **2006**, *7* (7), 1062–1069. https://doi.org/10.1002/cbic.200600003.

(345) Lund, S.; Courtney, T.; Williams, G. J. Probing the Substrate Promiscuity of Isopentenyl Phosphate Kinase as a Platform for Hemiterpene Analogue Production. *ChemBioChem* **2019**, *20* (17), 2217–2221. https://doi.org/10.1002/cbic.201900135.

(346) Wang, P.-H.; Khusnutdinova, A. N.; Luo, F.; Xiao, J.; Nemr, K.; Flick, R.; Brown, G.; Mahadevan, R.; Edwards, E. A.; Yakunin, A. F. Biosynthesis and Activity of Prenylated FMN Cofactors. *Cell Chem. Biol.* **2018**, *25* (5), 560-570. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.02.007.

(347) Mizote, T.; Nakayama, H. The ThiM Locus and Its Relation to Phosphorylation of Hydroxyethylthiazole in Escherichia Coli. *J. Bacteriol.* **1989**, *171* (6), 3228–3232. https://doi.org/10.1128/JB.171.6.3228-3232.1989.

(348) Tani, Y.; Kimura, K.; Mihara, H. Purification and Properties of 4-Methyl-5-Hydroxyethylthiazole Kinase from *Escherichia Coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2016**, *80* (3), 514–517. https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1104239.

(349) Chen, Y.; Wang, L.; Shang, F.; Liu, W.; Lan, J.; Chen, J.; Ha, N.-C.; Quan, C.; Nam, K. H.; Xu, Y. Structural Insight of the 5-(Hydroxyethyl)-Methylthiazole Kinase ThiM Involving Vitamin B1 Biosynthetic Pathway from the Klebsiella Pneumoniae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *518* (3), 513–518. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.086.

(350) Bunik, V. I.; Tylicki, A.; Lukashev, N. V. Thiamin Diphosphate-Dependent Enzymes: From Enzymology to Metabolic Regulation, Drug Design and Disease Models. *FEBS J.* **2013**, *280* (24), 6412–6442. https://doi.org/10.1111/febs.12512.

(351) Campobasso, N.; Mathews, I. I.; Begley, T. P.; Ealick, S. E. Crystal Structure of 4-Methyl-5-β-Hydroxyethylthiazole Kinase from *Bacillus Subtilis* at 1.5 Å Resolution ⁺, ⁺. *Biochemistry* **2000**, *39* (27), 7868–7877. https://doi.org/10.1021/bi0000061.

(352) Drebes, J.; Künz, M.; Windshügel, B.; Kikhney, A. G.; Müller, I. B.; Eberle, R. J.; Oberthür, D.; Cang, H.; Svergun, D. I.; Perbandt, M.; Betzel, C.; Wrenger, C. Structure of ThiM from Vitamin B1 Biosynthetic Pathway of Staphylococcus Aureus – Insights into a Novel pro-Drug Approach Addressing MRSA Infections. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 22871. https://doi.org/10.1038/srep22871.

(353) Lange, B. M.; Croteau, R. Isopentenyl Diphosphate Biosynthesis via a Mevalonate-Independent Pathway: Isopentenyl Monophosphate Kinase Catalyzes the Terminal Enzymatic Step. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (24), 13714–13719. https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13714.

(354) Carreras-Puigvert, J.; Zitnik, M.; Jemth, A.-S.; Carter, M.; Unterlass, J. E.; Hallström, B.; Loseva, O.; Karem, Z.; Calderón-Montaño, J. M.; Lindskog, C.; Edqvist, P.-H.; Matuszewski, D. J.; Ait Blal, H.; Berntsson, R. P. A.; Häggblad, M.; Martens, U.; Studham, M.; Lundgren, B.; Wählby, C.; Sonnhammer, E. L. L.; Lundberg, E.; Stenmark, P.; Zupan, B.; Helleday, T. A Comprehensive Structural, Biochemical and Biological Profiling of the Human NUDIX Hydrolase Family. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 1541. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01642-w.

(355) Chen, M.; Poulter, C. D. Characterization of Thermophilic Archaeal Isopentenyl Phosphate Kinases. *Biochemistry* **2010**, *49* (1), 207–217. https://doi.org/10.1021/bi9017957.

(356) Mu; Omer, C. A.; Gibbs, R. A. On the Stereochemical Course of Human Protein-Farnesyl Transferase. J. Am. Chem. Soc. **1996**, *118* (8), 1817–1823. https://doi.org/10.1021/ja953005i.

(357) Tholl, D.; Croteau, R.; Gershenzon, J. Partial Purification and Characterization of the Short-Chain Prenyltransferases, Geranyl Diphosphate Synthase and Farnesyl Diphosphate Synthase, from Abies Grandis (Grand Fir). *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *386* (2), 233–242. https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2212.

(358) Zhao, C.-L.; Cui, B.-K.; Song, J.; Dai, Y.-C. Fragiliporiaceae, a New Family of Polyporales (Basidiomycota). *Fungal Divers.* **2015**, 70 (1), 115–126. https://doi.org/10.1007/s13225-014-0299-0.

(359) Zhou, L.-W.; Hao, Z.-Q.; Wang, Z.; Wang, B.; Dai, Y.-C. Comparison of Ecological Patterns of Polypores in Three Forest Zones in China. *Mycology* **2011**, *2* (4), 260–275. https://doi.org/10.1080/21501203.2011.602726.

Floudas, D.; Binder, M.; Riley, R.; Barry, K.; Blanchette, R. A.; Henrissat, B.; Martínez, A. T.; Otillar, R.; Spatafora, J. W.; Yaday, (360)J. S.; Aerts, A.; Benoit, I.; Boyd, A.; Carlson, A.; Copeland, A.; Coutinho, P. M.; de Vries, R. P.; Ferreira, P.; Findley, K.; Foster, B.; Gaskell, J.; Glotzer, D.; Górecki, P.; Heitman, J.; Hesse, C.; Hori, C.; Igarashi, K.; Jurgens, J. A.; Kallen, N.; Kersten, P.; Kohler, A.; Kües, U.; Kumar, T. K. A.; Kuo, A.; LaButti, K.; Larrondo, L. F.; Lindquist, E.; Ling, A.; Lombard, V.; Lucas, S.; Lundell, T.; Martin, R.; McLaughlin, D. J.; Morgenstern, I.; Morin, E.; Murat, C.; Nagy, L. G.; Nolan, M.; Ohm, R. A.; Patyshakuliyeva, A.; Rokas, A.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Sabat, G.; Salamov, A.; Samejima, M.; Schmutz, J.; Slot, J. C.; St. John, F.; Stenlid, J.; Sun, H.; Sun, S.; Syed, K.; Tsang, A.; Wiebenga, A.; Young, D.; Pisabarro, A.; Eastwood, D. C.; Martin, F.; Cullen, D.; Grigoriev, I. V.; Hibbett, D. S. The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Reconstructed from Fungal 2012 336 (6089).Decomposition 31 Genomes. Science 1715-1719. https://doi.org/10.1126/science.1221748.

(361) Chen, J.; Heikkinen, J.; Hobbie, E. A.; Rinne-Garmston, K. T.; Penttilä, R.; Mäkipää, R. Strategies of Carbon and Nitrogen Acquisition by Saprotrophic and Ectomycorrhizal Fungi in Finnish Boreal Picea Abies-Dominated Forests. *Fungal Biol.* **2019**, *123* (6), 456–464. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.03.005.

(362) Blanchette, R. A. Screening Wood Decayed by White Rot Fungi for Preferential Lignin Degradationt. *Appl. Env. Microbiol.* **1984**, *48* (3), 647-653. https://doi.org/10.1128/AEM.48.3.647-653.1984.

(363) Martínez, A. T.; Speranza, M.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Ferreira, P.; Camarero, S.; Guillén, F.; Martínez, M. J.; Gutiérrez, A.; del Río, J. C. Biodegradation of Lignocellulosics: Microbial, Chemical, and Enzymatic Aspects of the Fungal Attack of Lignin. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* **2005**, *8* (3), 195–204. PMID: 16200498.

(364) Welti, S.; Moreau, P.-A.; Favel, A.; Courtecuisse, R.; Haon, M.; Navarro, D.; Taussac, S.; Lesage-Meessen, L. Molecular Phylogeny of Trametes and Related Genera, and Description of a New Genus Leiotrametes. *Fungal Divers.* **2012**, *55* (1), 47–64. https://doi.org/10.1007/s13225-011-0149-2.

(365) Jeong, H.-U.; Kwon, S.-S.; Kong, T. Y.; Kim, J. H.; Lee, H. S. Inhibitory effects of cedrol, β -cedrene, and thujopsene on cytochrome P450 enzyme activities in human livr microsomes. *J. Toxicol. Environ. Health A.* **2014**, 77 (22-24), 1522-1532. https://doi.org/10.1080/15287394.2014.955906.

(366) Wu, C.-L.; Chien, S.-C.; Kuo, Y.-H. Structure-Activity Relationships of Cadinane-Type Sesquiterpene Derivatives against Wood-Decay Fungi. *Holzforschung* **2005**, *59* (6), 620-627. https://doi.org/10.1515/HF.2005.100.

(367) Aslanidis, C.; de Jong, P. J. Ligation-Independent Cloning of PCR Products (LIC-POR). *Nucleic Acids Research* **1990**, *18* (20), 6069-6074. https://doi.org/10.1093/nar/18.20.6069.

(368) Torres-García, C.; Díaz, M.; Blasi, D.; Farràs, I.; Fernández, I.; Ariza, X.; Farràs, J.; Lloyd-Williams, P.; Royo, M.; Nicolás, E. Side Chain Anchoring of Tryptophan to Solid Supports Using a Dihydropyranyl Handle: Synthesis of Brevianamide F. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2012**, *18* (1), 7–19. https://doi.org/10.1007/s10989-011-9274-8.

(369) Heng-Chun, L. Phosphoprotein Phosphatases. In *Current Topics in Cellular Regulation*; Elsevier **1982**, *21*, 129–174. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-152821-8.50010-4.

(370) Vardakou, M.; Salmon, M.; Faraldos, J. A.; O'Maille, P. E. Comparative Analysis and Validation of the Malachite Green Assay for the High Throughput Biochemical Characterization of Terpene Synthases. *MethodsX* **2014**, *1*, 187–196. https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.08.007.

(371) Valliere, M. A. A Bio-Inspired Cell-Free System for Cannabinoid Production from Inexpensive Inputs. *Nat. Chem. Biol.* **2020**, *16* (12), 1427-1433. https://doi.org/10.1038/s41589-020-0631-9.

(372) Gondry, M.; Jacques, I. B.; Thai, R.; Babin, M.; Canu, N.; Seguin, J.; Belin, P.; Pernodet, J.-L.; Moutiez, M. A Comprehensive Overview of the Cyclodipeptide Synthase Family Enriched with the Characterization of 32 New Enzymes. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 46. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00046.

(373) Clomburg, J. M.; Qian, S.; Tan, Z.; Cheong, S.; Gonzalez, R. The Isoprenoid Alcohol Pathway, a Synthetic Route for Isoprenoid Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (26), 12810–12815. https://doi.org/10.1073/pnas.1821004116.

(374) Chatzivasileiou, A. O.; Ward, V.; Edgar, S. M.; Stephanopoulos, G. Two-Step Pathway for Isoprenoid Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (2), 506–511. https://doi.org/10.1073/pnas.1812935116.

(375) Johnson, L. A.; Dunbabin, A.; Benton, J. C. R.; Mart, R. J.; Allemann, R. K. Modular Chemoenzymatic Synthesis of Terpenes and Their Analogues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (22), 8486–8490. https://doi.org/10.1002/anie.202001744.

(376) Lund, S.; Hall, R.; Williams, G. J. An Artificial Pathway for Isoprenoid Biosynthesis Decoupled from Native Hemiterpene Metabolism. *ACS Synth. Biol.* **2019**, *8* (2), 232–238. https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00383.

Annexes



(A) Annexe N°1

Voies de biosynthèse des terpènes

(KEGG Pathway, https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map00900)



(B) Annexe N°2

METHODOLOGIE POUR LE CRIBLAGE D'IPKs ET DE NSAPs COMPATIBLES Figure réalisée par Véronique de Bérardinis



(C) Annexe N°3

Tryprostatine B : RMN ¹H et ¹³C Issue d'une synthèse enzymatique via la MVT

RMN ¹H (CDCl₃, 300.13 MHz) : δ 8.22 (br s, 1H), 7.45 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 7.52 Hz, 1H), 7.09 (m, 2H), 5.66 (br s, 1H), 5.28 (tt, J = 7.2, 1.0 Hz, 1H), 4.33 (dd, J = 11.1, 3.03 Hz, 1H), 4.01 (t, J = 7.43 Hz, 1H), 3.71–3.40 (m, 5H), 2.94 (dd, J = 15.0, 11.1 Hz, 1H), 2.35–2.23 (m, 1H), 2.04–1.79 (m, 3H), 1.75 (s, 3H), 1.72 (s, 3H). (voir spectre sur page suivante)

RMN ¹³C (CDCl₃, 75.47 MHz) : δ 169.34, 165.85, 136.55, 135.55, 135.23, 128.47, 121.79, 119.89, 119.84, 117.74, 110.82, 104.60, 59.25, 54.69, 45.4, 28.34, 25.7, 25.17, 22.59, 17.96.



(D) Annexe N°4

Dérivé cyclobutyle de la Tryprostatine B : RMN ¹H et ¹³C Issu d'une synthèse enzymatique via la MVT

RMN ¹H (CDCl₃, 300.13 MHz) : δ 8.17 (br s, 1H), 7.47 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.11 (m, 2H), 5.67 (br s, 1H), 5.22 (m, 1H), 4.36 (dd, J = 11.1, 2.7 Hz, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.72–3.54 (m, 3H), 3.33 (m, 2H), 2.95 (m, 1H), 2.71 (m, 4H), 2.37–2.28 (m, 1H), 2.08–1.86 (m, 5H).

(voir spectre sur page suivante)

RMN ¹³C (CDCl₃, 75.47 MHz) : δ 169.38, 165.86, 144.08, 136.26, 135.51, 134.61, 127.99, 121.86, 119.87, 117.76, 115.70, 110.82, 104.74, 59.25, 59.29, 54.62, 45.43, 30.99, 29.39, 28.36, 25.61, 25.06, 22.65, 16.95.



(E) Annexe N°5

FPP : RMN ¹H et ³¹P

Issu d'une synthèse enzymatique via la MVT

RMN ¹H (D₂O. NH₄OD, 300.13 MHz) : δ 5.62 (t, J = 6.60 Hz, 1H), 5.32 (dt, J = 19.76, 6.44 Hz, 2H), 4.63 (m, 2H), 2.19 (m, 8H), 1.89 (s, 3H), 1.82 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.75 (s, 3H).

(Les déplacements chimiques ont été corrigés *a posteriori*, du fait d'un mauvais calibrage de l'appareil lors de la mesure, expliquant ainsi la différence entre les déplacements chimiques indiqués sur le spectre suivant et ceux donnés ci-dessus).

RMN ³¹P (D₂O. NH₄OD, 121.49 MHz) : δ –5.55, –9.72.





Résumé

À ce jour, les terpénoïdes constituent la classe de produits naturels la plus abondante et diversifiée avec plus de 80000 composés décrits et dont les propriétés structurales, biologiques (antibiotique, anticancéreux, antipaludique...) et physico-chimiques (arôme, parfum, colorant...) retiennent l'attention de la communauté scientifique. Cependant, leur accès est limité par une faible disponibilité par extraction à partir de sources naturelles ; une synthèse chimique souvent coûteuse et laborieuse ; et des voies de biosynthèses longues. En combinant des approches bioinformatiques, statistiques, biochimiques et de biologie moléculaire, nous avons développé la « Mini-voie des terpènes », à seulement deux étapes enzymatiques, comme alternative synthétique et biosourçable pour l'accès aux DMAPP et IPP, précurseurs universels des terpènes. Cette nouvelle voie artificielle a permis la synthèse de différents terpénoïdes naturels et également non-naturels tels que des dérivés cyclobutyliques, en l'absence d'ingénierie métabolique et enzymatique. Ainsi, la mini-voie offre un accès facilité à l'ensemble des terpénoïdes et constitue un nouvel outil biosynthétique attractif pour l'exploration de la diversité de l'espace chimique des terpènes.

Mini-voie des terpènes - cascade enzymatique - biosynthèse *in vitro* - kinases de prénols -prényl transférases - sesquiterpène synthases

Abstract

To date, terpenoids form the most abundant and diversified class of natural products with more than 80,000 compounds whose structural, biological (antibiotic, anticancer, antimalarial, *etc.*) and physicochemical (flavor, fragrance, dye, *etc.*) properties hold the attention of the scientific community. However, their access is limited because of the low available quantity by extraction from natural sources; an often expensive and laborious chemical synthesis; and long biosynthetic pathways. By combining bioinformatic, statistical, biochemical and molecular biology approaches, we have developed the « Terpene mini-path », with only two enzymatic steps, as a synthetic and potentially bio-sourced alternative to access DMAPP and IPP, universal precursors of terpenes. This new artificial pathway allowed the synthesis of various natural and unnatural terpenoids, such as cyclobutylic derivatives, in the absence of any metabolic and enzymatic engineering. The mini-path provides thus an easy access to all terpenoids and represents an attractive new biosynthetic tool to explore the diversity of the terpene chemical space.

Terpene mini-path – enzymatic cascade – *in vitro* biosynthesis - prenol kinases -prenyltransferase - sesquiterpene synthases