ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE DE CHIMIE DE MONTPELLIER

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE DE CHIMIE DE MONTPELLIER

Discipline : Biochimie et Biotechnologie

École doctorale : Sciences Chimiques

INGÉNIERIE MOLÉCULAIRE DE CYTOCHROMES P450 POUR L'HYDROXYLATION DES ALCANES

Soutenance prévue le 26 octobre 2012

Mélanie BORDEAUX

JURY

Mr Eric DUBREUCQ	Professeur, SupAgro Montpellier	Rapporteur
Mr Charles TELLIER	Professeur, Université de Nantes	Rapporteur
Mr Didier BUISSON	Chargé de Recherches, CNRS, Toulouse	Examinateur
Mr Philippe URBAN	Chargé de Recherches, CNRS, Paris	Examinateur
Mr Jullien DRONE	Maître de conférences, ENSCM, Montpellier	Co-encadrant
Mme Anne GALARNEAU	Directrice de Recherche CNRS, Montpellier	Directrice de thèse
Mr Denis WAHLER	Responsable R&D, PROTEUS, Nîmes	Membre invité

TABLE DES MATIERES

ABBRÉVIATIONS ..... **III**

INTRODUCTION GÉNÉRALE **1**

CHAPITRE 1. ETAT DE L'ART : CATALYSE D'OXYDATION DES ALCANES LINEAIRES EN CONDITIONS DOUCES. **7**

1.1 ACTIVATION DES ALCANES 9
1.2 CATALYSE ENZYMATIQUE 11
1.3 INGENIERIE DES CYTOCHROMES P450 28
1.4 OXYDATION CHIMIQUE 42
1.5 OBJECTIFS DE LA THESE 49

CHAPITRE 2. EXPRESSION ET CARACTERISATION DE CYTOCHROMES P450 AUTONOMES **51**

2.1 STRATEGIE DE FUSION 53
2.2 CHOIX DU VECTEUR ET DE LA SOUCHE 54
2.3 OPTIMISATION DES CONDITIONS D'EXPRESSION DE A13RED 54
2.4 PURIFICATION 62
2.5 GENERALISATION DU CONCEPT DE FUSION AUX CYTOCHROMES A1 ET A6 DE LA FAMILLE CYP153 65
2.6 CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE A13RED 70
2.7 MODELISATION DE LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE 75
2.8 CONCLUSION 78

CHAPITRE 3. OXYDATION DES ALCANES LINEAIRES PAR BIOCATALYSE **81**

3.1 ALCANES LIQUIDES 83
3.2 TESTS D'ACTIVITE SUR LES ALCANES GAZEUX 92
3.3 CONCLUSION 96

CHAPITRE 4. MUTAGENESE DIRIGEE DU SITE ACTIF **97**

4.1 SELECTION DES RESIDUS ET PROPOSITION DE MUTATIONS 99
4.2 CREATION DE LA BANQUE DE MUTANTS 103
4.3 CRIBLAGE A : OXYDATION TERMINALE DES ALCANES LIQUIDES 103
4.4 CRIBLAGE B : OXYDATION TERMINALE DES ALCANES LIQUIDES ET GAZEUX 110
4.5 CONCLUSION 114

CHAPITRE 5. INFLUENCE DES CONDITIONS REACTIONNELLES SUR L'ACTIVITE DE A13RED **117**

5.1 STABILISATION DE A13RED 119
5.2 DISPONIBILITE DU SUBSTRAT 122
5.3 RECYCLAGE DU COFACTEUR 124
5.4 BIOCATALYSE HETEROGENE 126

5.5 Conclusion 129

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 131

PARTIE EXPERIMENTALE 137

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 179

ANNEXES 195

ANNEXE 1. A13red : sequence nucleotidique 197

ANNEXE 2. A13red : sequence proteique 197

ANNEXE 3. A6red : sequence nucleotidique 198

ANNEXE 4. A6red : sequence proteique 199

ANNEXE 5. A1red : sequence nucleotidique 200

ANNEXE 6. A1red : sequence proteique 201

ANNEXE 7. Alignement global des sequences proteiques de CYP153A1, A6 et A13a 202

ANNEXE 8. Alignement global des sequences proteiques de CYP153A13 et CYP2B4 203

ANNEXE 9. Alignement de 36 cytochromes de la famille CYP153 204

ABBRÉVIATIONS

2 YT : Milieu Yeast Tryptone

A1 : Cytochrome P450 CYP153A1 issu d'*Acinetobacter calcoacitius*

A13a : Cytochrome P450 CYP153A13a issu d'*Alcanivorax borkumensis*

A13red : Protéine de fusion entre le cytochrome CYP153A13a et la partie réductase du cytochrome P450 RhF

A6 : Cytochrome P450 CYP153A6 issu de *Mycobacterium* sp. HXN-1500

ALA : Acide 5-aminolévulinique

AlkB : Alcane hydroxylase AlkB

AlPO : Matériau microporeux de type Aluminium-Phosphate

AO : Alcool oxydase

APO : Alcane peroxydase

BL21*(DE3) : *E. coli* souche BL21 Star^{TM}(DE3)

BMO : Butane monooxygénase

BSA : Albumine de Sérum Bovin

C41(DE3) : *E. coli* souche C41(DE3)

CDW : Cell Dry Weight (Masse sèche de cellule)

DO : Densité optique

E. coli : *Escherichia coli*

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FB : Milieu synthétique FB

FMN : Flavine Mononucléotide

GC/FID : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme

GC/MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

LB : Milieu de culture Luria Bertani

MBTH : 3-methyl-2-benzothiazolonhydrazone

MMO : Méthane monooxygénase

NAD(P) : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate)

P450 : Cytochrome P450

P450 BM-3 : Cytochrome P450 CYP102A1 issu de *Bacillus megaterium*

P450cam : Cytochrome P450 CYP101 issu de *Pseudomonas putida*

pMMO : Particulate méthane monooxygénase

PMO : Propane monooxygénase

sMMO : Soluble méthane monooxygénase

TB : Milieu de culture Terrific Broth

TOF : Turnover Frequency : fréquence de turnover

TON : Turnover Number : nombre de turnover

TTN : Total Turnover Number : nombre total de turnover

Y-ADH : Alcool déshydrogénase de levure

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les alcanes sont des matières premières disponibles en grande quantité dans l'environnement et de faible coût, ce qui fait d'eux des composés dont la valorisation représente un réel intérêt. L'hydroxylation terminale des alcanes est intéressante car elle autorise par la suite de nombreux types de fonctionnalisations et permet d'obtenir une vaste gamme de dérivés. De plus, l'hydroxylation des alcanes gazeux les fait passer à l'état liquide, plus facilement transportable. Devant la valeur ajoutée des produits d'oxydation des alcanes et le défi scientifique que représente l'activation de la liaison C-H de ces molécules inertes,[1] on comprend alors que les procédés d'oxydation des alcanes en alcools ont largement été étudiés. Bon nombre de catalyseurs mis au point utilisent des oxydants forts, demandent un apport considérable d'énergie (hautes températures, fortes pression), et par conséquent ne s'inscrivent pas dans le principe de développement durable.[2–7] Certains catalyseurs chimiques fonctionnent toutefois en conditions douces, et sont pour la plupart inspirés du monde vivant (approche biomimétique). Ils restent cependant peu satisfaisants d'un point de vue de l'activité et/ou de la sélectivité.[8,9]

La catalyse enzymatique utilisant les monooxygénases présente trois principaux intérêts pour des applications en synthèse chimique : leur homologue chimique n'existe pas ou n'a pas la régiosélectivité ou la stéréospécificité requises ; elles utilisent l'oxygène moléculaire comme oxydant, de faible coût et non toxique comparé aux oxydants habituellement utilisés en synthèse chimique ; enfin, leur centre actif est constitué de métaux comme le fer et le cuivre, ce qui réduit le coût de production comparé à certains catalyseurs chimiques qui contiennent des métaux plus chers comme le vanadium.

Le choix de l'enzyme est crucial. Elle doit évidemment avoir une spécificité de substrat le plus proche possible de la réaction désirée, et être à la fois soluble et facilement exprimée en organisme hétérologue tel *E. coli,* permettant sa surexpression. Les cytochromes P450 catalysent l'oxygénation d'un grand nombre de composés aussi bien naturels que procarcinogènes, mutagènes et xénobiotiques. A la différence des P450 eucaryotes, les P450 procaryotes sont généralement solubles.

Les cytochromes P450 de la famille des CYP153 sont connus depuis les années 1970[10] mais l'étude de leurs caractéristiques biochimiques n'a débuté qu'au début des années 2000 avec la mise en évidence de l'hydroxylation des *n*-alcanes par CYP153A1 d'*Acinetobacter* sp. EB104.[11] D'autres cytochromes de la même famille ont par la suite été étudiés pour leurs propriétés catalytiques.[12] De manière générale, un atome d'oxygène (provenant de l'oxygène moléculaire) est introduit sur un carbone non activé, alors que le deuxième atome d'oxygène

est réduit en eau. Cette réaction d'oxydo-réduction nécessite l'apport de deux électrons, qui sont donnés par un cofacteur, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Ces électrons sont transportés du NADPH au cytochrome par l'intermédiaire de partenaires donneurs. Dans le cas de la famille CYP153, ces partenaires sont au nombre de deux : une ferrédoxine et une ferrédoxine réductase.

Tous les membres de cette famille montrent une forte affinité pour les alcanes à chaîne moyenne (de C_5 à C_{12}, selon le cytochrome), mais leur activité reste toutefois relativement basse (fréquence de turnover inférieur à 0,01 mole d'octanol formé par mole d'enzyme par minute pour l'oxydation de l'octane par CYP153A13).[12] Leur faible vitesse catalytique est principalement due à la lenteur du transport des électrons entre les partenaires donneurs et le cytochrome. A l'opposé, le cytochrome P450 BM-3 de *Bacillus megaterium* présente une activité d'oxydation exceptionnelle : l'acide arachidonique est oxydé avec une fréquence de turnover de 17 000 moles de produit par mole d'enzyme et par minute.[13] Cette activité peut être expliquée par la fusion naturelle du cytochrome avec son partenaire donneur d'électrons au sein d'une même chaîne polypeptidique. Ceci réduit la perte d'électrons lors de leur transport, et augmente la vitesse de transfert entre les partenaires.[14] Un autre exemple de cytochrome naturellement fusionné est P450RhF issu de *Rhodococcus* sp. NCIMB 9784, capable d'oxyder le 7-éthoxycoumarin.[15–17]

Nous nous sommes inspirés de ces cytochromes pour créer un biocatalyseur original, qui rassemble un CYP153 et la partie réductase du cytochrome P450RhF sous une forme artificiellement fusionnée. En plus de permettre théoriquement un transfert d'électrons plus rapide, la fusion de l'enzyme avec son domaine réductase possède un fort potentiel biotechnologique, en contournant le besoin d'exprimer et de purifier indépendamment les composants protéiques du système P450, avec la mise en œuvre d'une entité protéique au lieu de trois.

Le cytochrome CYP153A13a d'*Alcanivorax borkumensis* a particulièrement retenu notre attention : il est capable d'oxyder de manière régio- et chimiosélectives les alcanes à chaîne moyenne, avec comme substrat préférentiel l'octane. De plus, le CYP153A13a est soluble et il a déjà été exprimé chez *E. coli*. Toutefois, seule sa caractérisation *in vivo* est disponible.[18] Les partenaires rédox de ce cytochrome n'ont à ce jour pas été identifiés, et les travaux préliminaires *in vivo* de bioconversion de l'octane par l'enzyme CYP153A13a fusionnée avec la partie réductase de P450RhF, présentent des résultats encourageants du point de vue de la solubilité du biocatalyseur et de l'activité d'hydroxylation terminale.[19,20]

Le schéma présenté en Figure 1 résume les différentes étapes que nous avons parcourues pour le développement d'un procédé biocatalytique ayant pour but l'oxydation des alcanes. Le chapitre 1 (bibliographie) présente les différents catalyseurs disponibles pour l'oxydation des alcanes linéaires en conditions douces. Cet état de l'art nous a permis de nous orienter vers le choix d'un système enzymatique : les cytochromes P450 de la famille des CYP153. Durant ma thèse, un membre de cette famille (CYP153A13a d'*Alcanivorax borkumensis*) a été isolé et cloné dans un vecteur, puis exprimé dans *E. coli* sous une forme fusionnée avec le domaine réductase du cytochrome P450RhF. Cette enzyme est appelée A13red. La stratégie de clonage, l'expression, la purification et la caractérisation de A13red sont présentées dans le chapitre 2. Un procédé catalytique de type batch permettant l'hydroxylation terminale des *n*-alcanes a été étudié. Le chapitre 3 regroupe la mise en œuvre et les résultats des tests catalytiques, *in vivo* et *in vitro*, sur les alcanes liquides (C_5 à C_{12}), ainsi que sur les alcanes gazeux. L'enzyme native n'étant pas active sur les alcanes à chaîne plus courte, nous avons complété ces travaux par la mutagénèse dirigée de son site actif, afin de réduire son volume et de faciliter l'ancrage de plus petites molécules d'alcane, dans le but ultime d'oxyder le méthane. Ces travaux sont présentés au chapitre 4. Enfin, lors des tests catalytiques, nous avons identifié certains facteurs qui limitaient l'activité de A13red. Afin de nous en affranchir, nous avons optimisé les conditions réactionnelles, qui sont présentées dans le chapitre 5. La partie expérimentale est située à la fin du manuscrit, repérable grâce à sa bordure de page grise. L'état de l'art a fait l'objet de la publication d'une revue, et les chapitres 2 et 3 d'une communication dans le journal Angewandte Chemie, annexées à ce manuscrit. Les chapitres 2, 3 et 5 ont été présentés par communications orales lors de congrès internationaux (Biotrans, 2011 et Biocat, 2012).

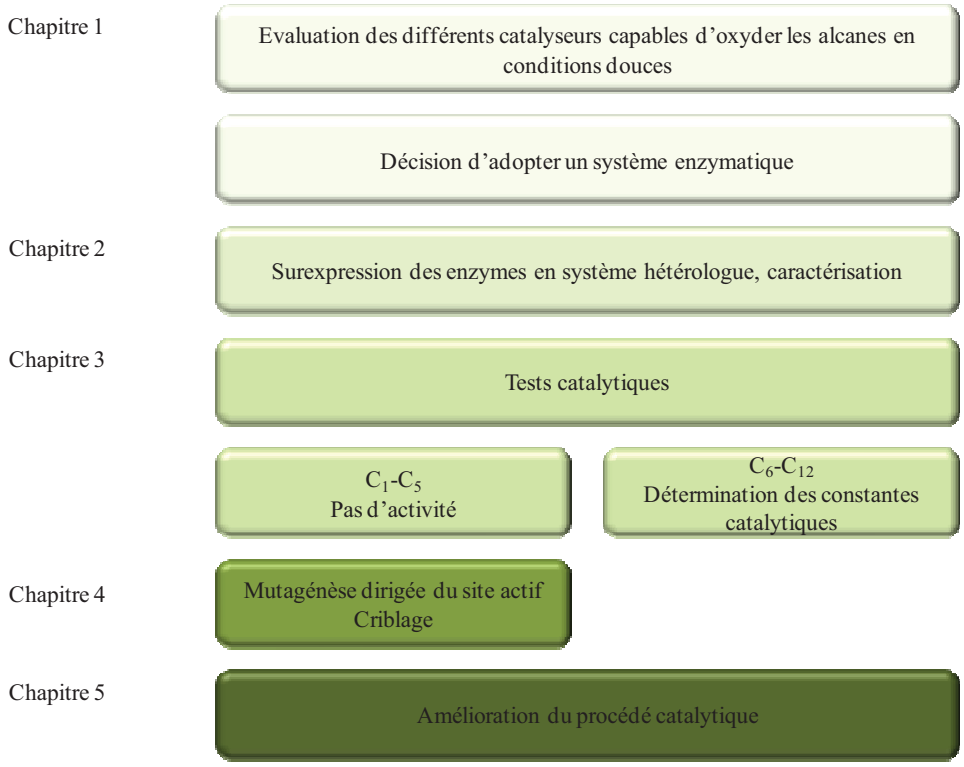


Figure 1 : Déroulement de la thèse et présentation des chapitres.

CHAPITRE 1. ETAT DE L'ART : CATALYSE D'OXYDATION DES ALCANES LINEAIRES EN CONDITIONS DOUCES

1.1 Activation des alcanes

1.1.1 Réactivité

Les alcanes sont des hydrocarbures saturés, aussi appelés paraffines (du latin *parum affinis*, qui a peu d'affinité), très abondants dans la nature. Leurs principales sources sont les gisements de pétrole et de gaz naturel, et ils proviennent du lent processus de fossilisation de la matière organique végétale. Les fermentations animales intestinales, les fermentations végétales dans les boues des marais, les rizières sont aussi des réserves, plus modestes, de méthane. Les alcanes sont avant tout utilisés comme une source d'énergie lors de leur combustion, mais ils sont aussi employés en tant que matières premières pour la fabrication de produits de plus haute valeur ajoutée, tels que les détergents, les matières plastiques, ou encore les textiles synthétiques.

Les alcanes linéaires ne possèdent pas de groupe fonctionnel, et donc aucune région d'attaque sélective, ni de site de réaction préférentiel. Ils peuvent réagir seulement après la rupture des liaisons C-C et C-H, étant respectivement non et très peu polarisées. Il en résulte donc que leur rupture est extrêmement difficile. De plus, elles sont très peu polarisables en raison de la faible mobilité des électrons. En conséquence, les alcanes présentent une très grande stabilité chimique et sont très peu réactifs.

En absence de contraintes spécifiques, la régiosélectivité d'oxydation des *n*-alcanes est gouvernée par les énergies de dissociation des liaisons C-H relatives aux différents carbones.[1] Ainsi, les carbones secondaires et tertiaires sont plus facilement activés que les carbones primaires (Tableau 1).

	Méthane	Carbone primaire	Carbone secondaire	Carbone tertiaire
Energies de dissociation de liaison (kcal/mol)	104	98	95	91

Tableau 1 Energies de dissociation de liaison C-H des carbones primaires, secondaires et tertiaires des alcanes linéaires (d'après Kerr *et al*, 1966).[1]

La régiosélectivité est donc difficilement contrôlable, et demeure un réel défi dans le domaine de la chimie. De plus, les alcools produits sont eux-mêmes plus réactifs que les alcanes, il en résulte une fréquente suroxydation. Le contrôle de la chimiosélectivité représente donc un deuxième défi à relever.

1.1.2 Catalyseur idéal

Les catalyseurs développés jusqu'à présent tentent de s'approcher du catalyseur idéal, qui regrouperait à la fois les qualités de régiosélectivité, de chimiosélectivité, une forte activité, et devrait fonctionner en conditions douces de réaction (basse température, pression atmosphérique et milieu non toxique). De plus, un faible coût de ce catalyseur et sa recyclabilité représenteraient des avantages non négligeables. Les catalyseurs décrits dans la littérature sont soit de nature enzymatique, issus de microorganismes capables d'utiliser les alcanes comme source de carbone (monooxygénases à fer non hémique, alcanes hydroxylases, cytochromes P450 ou encore peroxygénases), soit de nature synthétique, dont la structure est le plus souvent inspirée des enzymes. Ce chapitre fait état des différents catalyseurs d'oxydation des alcanes linéaires (de longueur de chaîne carbonée inférieur à C_{16}) capables de fonctionner en conditions douces (Tableau 2).[7] Les propriétés des différents catalyseurs présentés dans ce tableau seront détaillées dans la suite du chapitre.

	Catalyseur	Oxydant	Substrat	Produit (sélectivité)	TTN / TOF[a]	Réf.
1	sMMO	O_2	méthane	méthanol (100%)	nd[b] / 222	21
2	pMMO	O_2	méthane	méthanol (100%)	18[c] / 0,3	22
3	AlkB	O_2	octane	1-octanol (100%)	nd / 207	23
4	CYP153A13a	O_2	octane	1-octanol (100%)	nd / < 0,1	12
5	CYP153A6	O_2	octane	1-octanol (> 95%)	nd / 60	12
6	CYP4B1	O_2	heptane	1-heptanol (96%)	nd / 33	24
7	CYP52A3	O_2	hexadécane	1-hexadécanol (98%)	nd / 27	25
8	APO1_AaP	H_2O_2	butane	1-butanol (100%)	1200[c] / nd	26
9	APO1_AaP	H_2O_2	hexane	1-hexanol (53%)	1900[c] / nd	26
10	$P450_{PMO}$ R2	O_2	propane	2-propanol (90%)	45800 / 370	27
11	$P450_{PMO}$ R2	O_2	éthane	éthanol (100%)	2450 / nd	28
12	P450cam mutant[d]	O_2	propane	2-propanol (96%)	nd / 505	29
13	P450cam mutant[d]	O_2	éthane	éthanol (100%)	nd / 78	29
14	P450 BM-3 natif[e]	O_2	méthane	méthanol (100%)	2500 / nd	30
15	P450 BM-3 natif[e]	O_2	propane	2-propanol (100%)	1020 / nd	30
16	Vanadium POM[f]	H_2O_2	hexane	ω-1 (66%), ω-2 (26%)[g]	22 / nd	31
17	Cu-ZSM-5	O_2	méthane	méthanol (> 98%)	0,024[c] / nd	8
18	MnAlPO-18	O_2	hexane	ω (66%), ω-1 (32%)[h]	149 / nd	9
19	Mn(TDCPP)Cl	H_2O_2	heptane	ω-1 (64%), ω-2 (28%)[i]	202[c] / nd	32
20	$(FePc^tBu_4)_2N$	H_2O_2	méthane	acide formique (64%)	29 / nd	33

Tableau 2 : Catalyseurs d'oxydation des alcanes linéaires en conditions douces. Entrées 1-15 : catalyseurs enzymatiques ; 15-20 : catalyseurs chimiques. [a] TTN : nombre total de turnover jusqu'à l'inactivation du catalyseur (mol produit / mol catalyseur), TOF : fréquence de turnover (mol de produit / mol de catalyseur / min) [b] nd : donnée non disponible. [c] calculé à partir des données disponibles dans la référence indiquée. [d] mutant de P450cam (F87W, Y96F, T101L, V247L, L244M, L294M, T185M, L358P, G248A). [e] en présence des additifs $CF_3(CF_2)_8CO_2H$ et $CF_3(CF_2)_9CO_2H$ pour le méthane et le propane, respectivement. [f] POM = polyoxométalate dopé au vanadium $[(n\text{-}C_4H_9)_4N]_4[\gamma\text{-}HPV_2W_{10}O_{40}]$. [g] ω-1 : 2-hexanol, ω-2 : 3-hexanol. [h] ω : somme du 1-hexanol, 1-hexanol et de l'acide hexanoïque ; ω-1 : somme des 2-hexanol et 2-hexanone.[i] ω-1 : somme des 2-heptanol et 2-heptanone ; ω-2 : somme des 3-heptanol et 3-heptanone.

1.2 Catalyse enzymatique

1.2.1 Microorganismes hydrocarbonoclastes

Les microorganismes hydrocarbonoclastes ont la capacité d'utiliser les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie. Ils sont capables de dégrader des alcanes dont les chaînes se composent de 1 à 50 atomes de carbones.[34] Ils sont présents en forte concentration dans les

sols pollués, et se développent sur les nappes de pétrole en milieu marin. La bactérie marine *Alcanivorax borkumensis* devient ainsi l'espèce majoritaire dans les eaux polluées par les hydrocarbures.[35] Le récent séquençage de son génome a permis de décoder les mécanismes enzymatiques mis en jeu dans la dégradation des hydrocarbures, ainsi que les produits de son métabolisme.[36] Ainsi, ses caractéristiques génétiques lui permettent à la fois de produire des agents tensioactifs facilitant l'émulsification des alcanes, leur pénétration à travers la membrane bactérienne, et leur utilisation comme source primaire d'énergie à travers la β-oxydation (Figure 2).

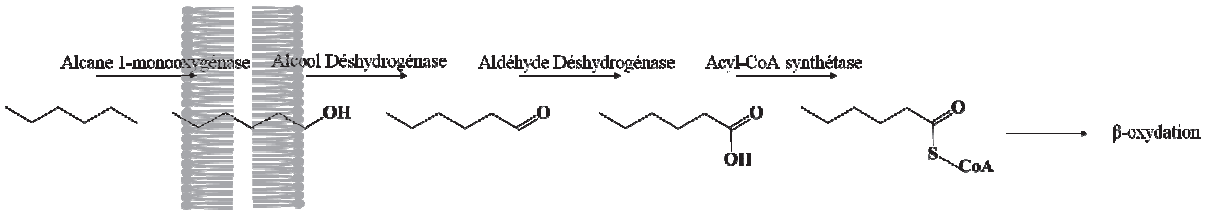


Figure 2 : Métabolisme de dégradation des alcanes par oxydation terminale chez A*lcanivorax borkumensis*.[36]

De nombreux autres microorganismes sont capables de transformer les hydrocarbures saturés. Le groupe des méthanotrophes utilise notamment le méthane comme unique source de carbone. D'autres microorganismes, appartenant autant à la classe des bactéries à Gram positif (*Rhodobacter, Corynebacterium*), qu'à celle des Gram négatifs (*Pseudomonas*), possèdent la faculté d'utiliser les alcanes gazeux de C_2 à C_4 comme source de carbone. Pour finir, de multiples bactéries et levures utilisent les alcanes à chaîne plus longue comme uniques sources de carbone.

La première étape dans le métabolisme des alcanes est leur oxydation en alcool, réaction catalysée par une classe d'enzymes appelées monooxygénases (Figure 3). Ces enzymes introduisent un atome d'oxygène dans un substrat à partir de l'oxygène moléculaire. Le deuxième atome est quant à lui réduit en eau. Ces enzymes nécessitent un cofacteur, le nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) (NAD(P)H), qui fournit deux équivalents réducteurs nécessaires à l'activation de l'oxygène moléculaire.

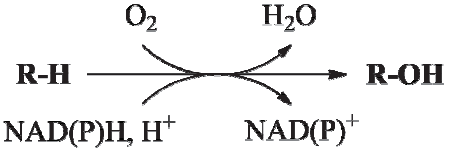


Figure 3 : Réaction catalysée par une monooxygénase (classification EC 1.14).

Plusieurs systèmes enzymatiques peuvent effectuer cette oxydation. Ils diffèrent en fonction des organismes et de leur spécificité de substrat. Un même microorganisme peut posséder plusieurs systèmes enzymatiques pour couvrir une large gamme de substrats. Les méthane monooxygénases, les peroxygénases, les alcanes hydroxylases et les cytochromes P450 sont les enzymes connues capables d'oxyder les alcanes en leurs alcools correspondants, de manière sélective. Le Tableau 3 classe ces différents systèmes enzymatiques en fonction de la longueur de la chaîne carbonée du substrat qu'ils sont capables d'hydroxyler. Ils seront détaillés dans les paragraphes suivants.

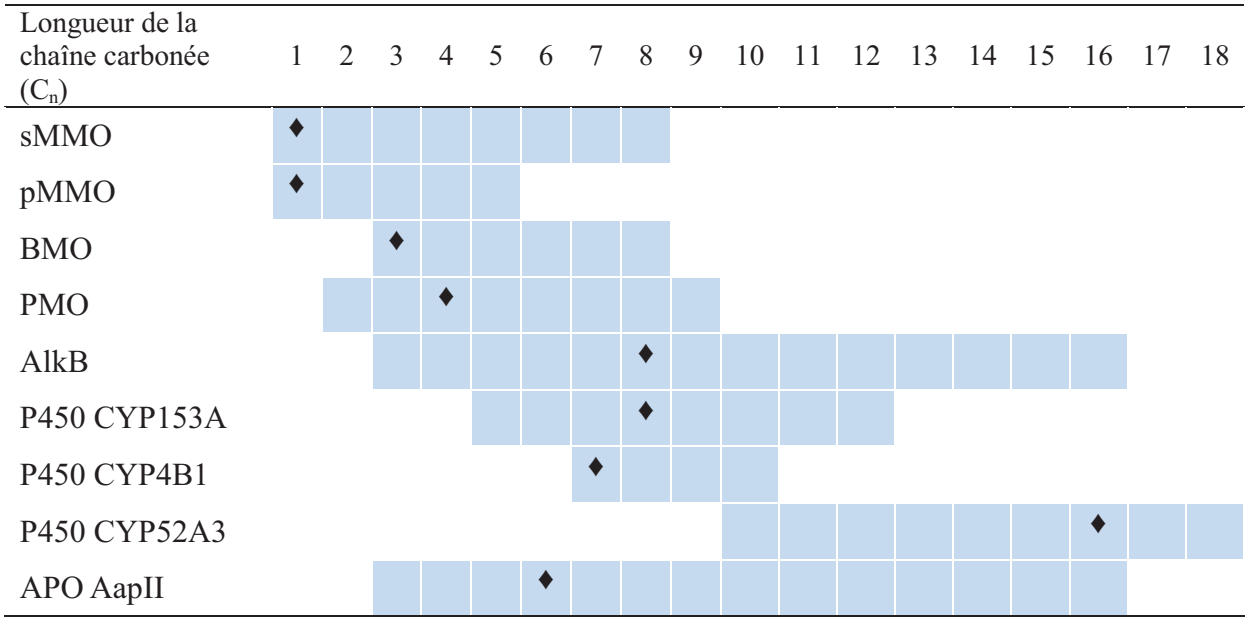


Tableau 3 : Systèmes enzymatiques d'oxydation des alcanes. Les carrés bleus indiquent la gamme de substrats oxydés par l'enzyme. Le substrat pour lequel l'activité de l'enzyme est maximale est indiqué par un losange. sMMO : méthane monooxygénase soluble, pMMO : méthane monooxygénase membranaire, BMO : butane monooxygénase, PMO : propane monooxygénase, AlkB : alcane hydroxylase, P450 : Cytochrome P450, APO : alcane peroxydase.

1.2.2 Monooxygénases tri-composantes à fer non hémique

1.2.2.1 Méthane Monooxygénases

Les microorganismes méthanotrophes ont la capacité d'utiliser le méthane comme unique source de carbone. La première étape dans le métabolisme du méthane, l'oxydation en méthanol, est catalysé par la méthane monooxygénase (MMO). Elle catalyse l'oxydation de la liaison C-H à température ambiante. Le méthanol est par la suite oxydé par une autre enzyme en formaldéhyde, lui-même assimilé directement par la bactérie ou suroxydé en acide formique et en dioxyde de carbone, pour produire l'énergie nécessaire à la cellule.

Il existe deux formes de MMO : la forme membranaire (pMMO : « particulate » MMO) est produite par l'ensemble des méthanotrophes, alors que la forme soluble (sMMO) n'est exprimée que par une partie de ces organismes, lorsque la concentration en cuivre du milieu est faible.[37] Les sMMO sont plus stables et plus faciles à purifier, du fait de leur solubilité. Elles possèdent une large spécificité de substrat, incluant les alcanes (C_1 à C_8), les alcènes, les aromatiques, les composés alicycliques et hétérocycliques. Les pMMO, quant à elles, oxydent seulement un petit groupe d'alcanes (C_1 à C_5) et d'alcènes à chaînes courtes, mais sont difficiles à extraire et à purifier.[38,39]

Les sMMO les plus étudiées sont celles de *Methylosinus trichosporium* OB3b et *Methylococcus capsulatus* (Bath). Elles sont formées de trois composantes protéiques comprenant une hydroxylase à site ferrique non hémique, composée de deux protomères $(\alpha\beta\gamma)_2$ (MMOH) de 245 kDa, une NADH oxydoréductase à flavine adénine dinucléotide (FAD) contenant un cluster fer-soufre (MMOR) de 40 kDa,[40] et une petite sous-unité de régulation, indispensable au fonctionnement de l'enzyme (MMOB) de 16 kDa[41–43] (Figure 4).

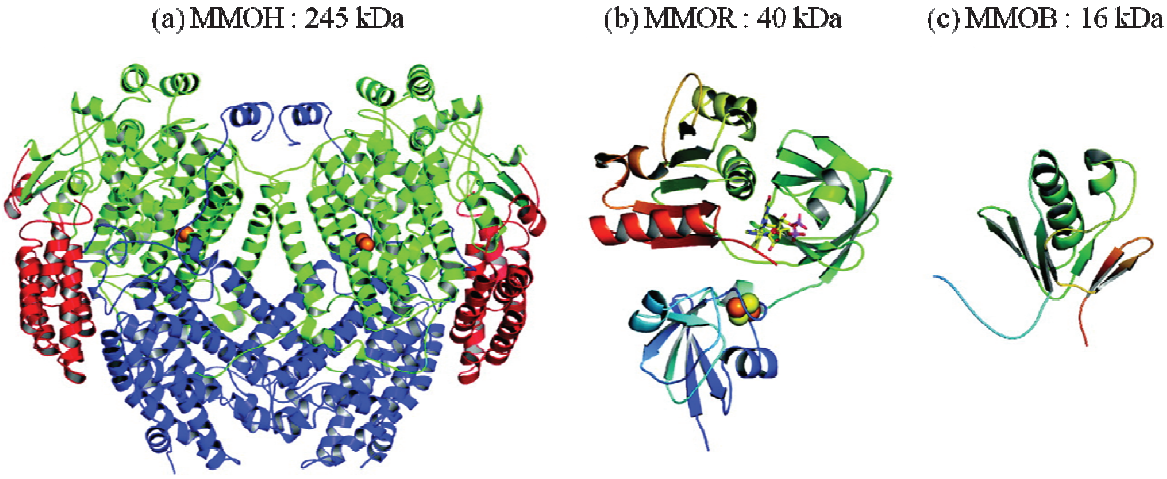


Figure 4 : Structures cristallographiques des trois composantes protéiques de la méthane monooxygénase sMMO (a) Partie hydroxylase MMOH montrant les sous unités α (vert), β (bleu) et γ (rouge). Les atomes de fer sont représentés par des sphères oranges.[44] (b) Composante réductase MMOR à FAD montrant le domaine de liaison au NADH. Le cluster [2Fe-2S] est représenté par des sphères orange et jaune. (c) Sous-unité de régulation MMOB.[45] Issu de Lippard *et al*., 2005.[46]

Chacune des trois protéines joue un rôle particulier au cours du cycle catalytique. Le centre catalytique se situe au cœur de la composante MMOH (Figure 5a). Il est constitué de deux atomes de fer, coordonnés à la chaîne peptidique par les résidus E114, E144, H147 d'une part et E144, H246, E243 et E209 d'autre part.

En présence de la protéine régulatrice MMOB, l'oxygène se lie à la forme réduite de la partie hydroxylase de MMO ($MMOH_{red}$) et est ainsi activé. Le complexe passe ensuite par les intermédiaires superoxo et peroxo, avant d'atteindre la forme à très fort potentiel d'oxydation

$MMOH_Q$. Cette forme catalyse la réaction d'hydroxylation du substrat, et repasse enfin sous la forme oxydée ($MMOH_{ox}$). La flavoprotéine Fer-Soufre MMOR utilise alors deux électrons provenant de l'oxydation du NADH pour reconvertir $MMOH_{ox}$ en sa forme réduite de départ (Figure 5b).[47] Une quatrième protéine (MMOD) récemment découverte semble aussi jouer un rôle dans l'assemblage du centre di-ferrique de la partie hydroxylase, mais son rôle reste encore incertain.[48]

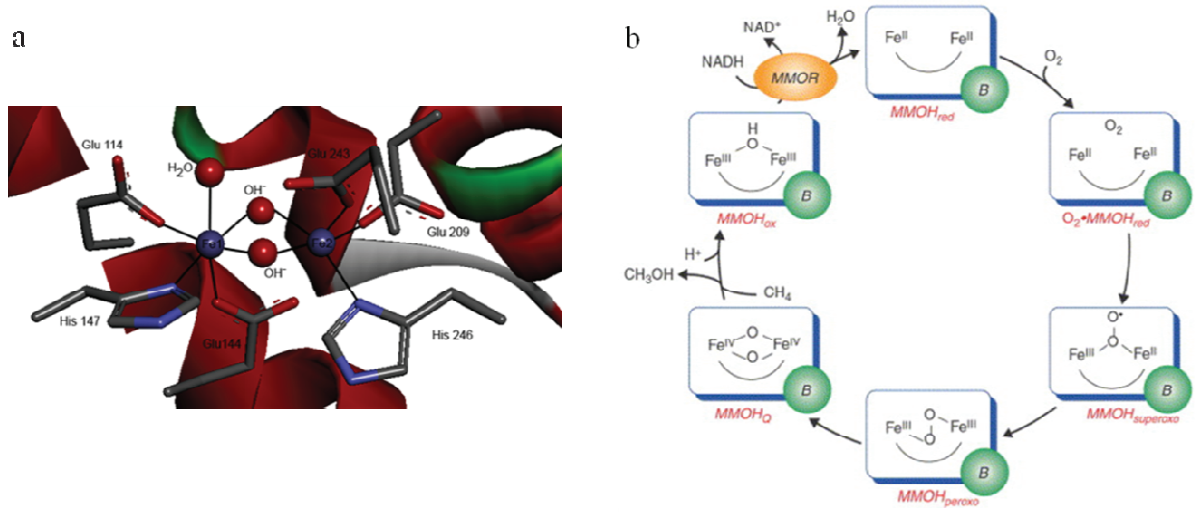


Figure 5 : Structure du site actif de sMMO et son cycle catalytique. (a) Représentation du centre actif de sMMO issu de *Methylococcus capsulus* (Bath) (forme oxydée $MMOH_Q$). Les deux atomes de fer sont représentés en violet, tandis que les atomes d'oxygène sont en rouge (code PDB 1MTY). (b) Cycle catalytique de la méthane monooxygénase, issu de Kopp *et al.*, 2002.[47]

1.2.2.2 Autres monooxygénases tri-composantes à fer non hémique

D'autres systèmes enzymatiques de structure similaire à celle des MMO sont aussi capables d'oxyder les alcanes : la propane monooxygénase (PMO) de *Gordonia* sp. TY-5 oxyde les alcanes de C_3 à C_8 en position 2 uniquement, avec une activité plus forte sur le propane, l'heptane et l'octane,[49] tandis que la butane monooxygénase (BMO) de *Pseudomonas butanovora* est capable d'oxyder un plus large spectre d'alcanes, allant de C_2 à C_9.[47] Cette dernière a une préférence pour le butane, qu'elle oxyde majoritairement en position terminale (83 %).[48]

1.2.2.3 Comparaison des activités des monooxygénases à fer non hémique

Les spécificités de substrat, les régiosélectivités et les activités des monooxygénases à fer non hémique varient selon la souche bactérienne dont elles proviennent. Par exemple, sMMO et PMO oxydent le butane en position 2 uniquement, alors que BMO forme majoritairement le 1-butanol. De plus, malgré l'apparente similarité structurale de ces enzymes, seule la MMO est capable d'oxyder le méthane, en fournissant suffisamment d'énergie pour rompre la

liaison C-H, et en permettant l'orientation du substrat de telle manière que sa réaction avec l'oxygène soit facilitée.[50] Les différences d'activité entre les deux formes sMMO (fréquence de turnover TOF = 222 moles de produit formé par mole d'enzyme par minute) et pMMO (TOF = 0,3 mole de produit formé par mole d'enzyme par minute) s'expliquent par la faible stabilité de la forme pMMO (Tableau 2, entrées 1 et 2).

1.2.3 Alcane hydroxylases membranaires

1.2.3.1 Caractéristiques structurales

L'équipe de Coon a caractérisé le système alcane hydroxylase de la bactérie *Pseudomonas oleovorans*,[52] renommée par la suite *P. putida.*[53–55] Les alcanes contenant entre trois et 16 atomes de carbone sont oxydés par cette alcane hydroxylase transmembranaire.[23,56] Ce complexe enzymatique, présent dans des souches bactériennes telles que *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, ou *Rhodococcus*, est composé de trois protéines : une hydroxylase à fer non hémique nommée AlkB, une rubrédoxine contenant deux atomes de fer, et une rubrédoxine réductase à FAD (Figure 6).[54] Ces deux dernières protéines agissent en tant que transporteurs d'électrons entre le NADH et l'hydroxylase. De la même manière que pour le système MMO, le centre ferrique de la partie hydroxylase active l'oxygène pour conduire à l'oxydation du substrat.

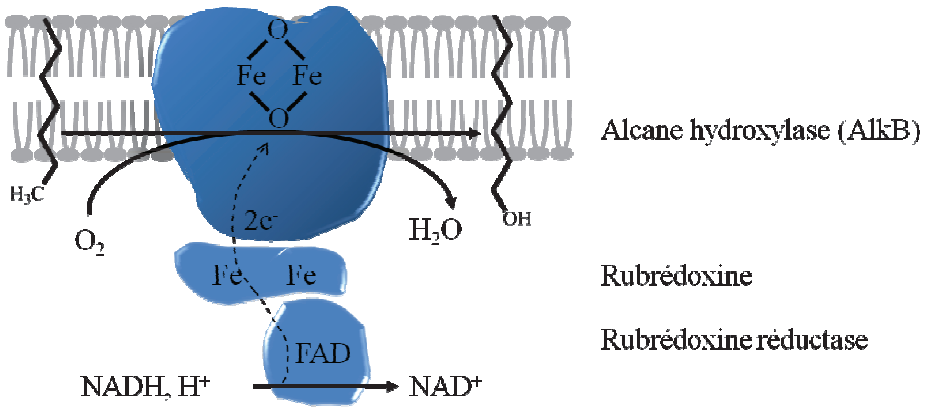


Figure 6 : Représentation schématique des trois protéines qui composent le système alcane hydroxylase (AlkB, Rubrédoxine et Rubrédoxine réductase).

Bien que la structure tridimensionnelle de la protéine ne soit pas connue, il semble que la protéine AlkB soit composée de six hélices transmembranaires.[57] Celles-ci forment une poche hydrophobe par laquelle le substrat accède au site catalytique. Ce dernier contient deux atomes de fer liés à des résidus histidines localisés dans quatre séquences très conservées. Un

acide aminé positionné dans la deuxième hélice transmembranaire semble déterminer la gamme de substrats pouvant être oxydés par l'enzyme.[57]

1.2.3.2 Spécificité de substrat

Plus d'une centaine de gènes *alkB* de type alcane 1-monooxygénase sont répertoriés dans les bases de données. Leurs variations génétiques reflètent les différences de spécificité de substrat. Le système le plus étudié est celui de *Pseudomonas putida* GPo1 qui oxyde les alcanes de C_3 à C_{12},[55,56] mais d'autres alcanes hydroxylases provenant de diverses souches possèdent la capacité d'oxyder des alcanes à chaînes plus longues.[58] Par exemple, la présence de trois à cinq homologues divergents de *alkB* dans plusieurs souches de *Rhodococcus* accroît la gamme d'alcanes dégradés (C_6 à C_{16}).[59]

1.2.3.3 Oxyfonctionnalisation des alcanes linéaires

L'activité d'oxydation de l'enzyme AlkB est relativement élevée comparée aux autres monooxygénases (Tableau 2, entrée 3 ; TOF = 207 min^{-1} sur l'octane), avec une régiosélectivité totale pour le carbone terminal. Toutefois, le fait que cette enzyme soit liée à la membrane limite ses applications *in vitro*. De plus, la complexité du système (trois protéines distinctes) complique sa purification. Son expression hétérologue demande à être améliorée puisqu'à ce jour la production chez *E. coli* est certes augmentée, mais les protéines AlkB synthétisées sont moins stables et moins actives que lors de leur production par *P. oleovorans*.[60]

1.2.4 Cytochromes P450

Les monooxygénases à P450 sont très étudiées du fait de leur présence ubiquitaire dans les organismes. On les retrouve au sein des organismes les plus simples (bactéries, levures, champignons) jusqu'aux plus complexes (hommes, animaux).

Les P450 composent une grande famille d'enzymes à noyau hémique.[61,62] Ils jouent un rôle important dans la détoxification et l'activation de multiples composés chimiques. Un des plus étudiés est le cytochrome humain CYP3A4, en raison de son implication dans la dégradation des composés xénobiotiques.[63] Les cytochromes P450 sont capables de catalyser une large variété de réactions régio- et stéréospécifiques sur une vaste gamme de substrats. Leur étude représente donc un grand intérêt, autant d'un point de vue industriel pour la fabrication de produits de chimie fine (catalyse, industrie pharmaceutique) ou la dégradation de polluants

qui se décomposent difficilement, que d'un point de vue fondamental, dans le but de mieux comprendre leur capacité à activer des molécules stables, tels que les alcanes, à température ambiante et pression atmosphérique.

1.2.4.1 Nomenclature et classification

Une nomenclature des P450 a été établie.[64] Il existe plusieurs familles de P450, nommées CYP. En fonction du règne animal, les numérotations des familles de P450 changent. Chez les bactéries, la nomenclature les a nommées de CYP101 à CYP281. Pour pouvoir être classés dans une même famille, les CYP doivent posséder au minimum 40 % d'identité de séquence.[65]

La classification la plus récente a été décrite par Hannemann en 2007.[66] Elle se base sur le fait que les CYP catalysent principalement des réactions de monooxygénation, et qu'un apport d'électrons est nécessaire. Ces électrons sont fournit par le NAD(P)H et transportés au site catalytique par l'intermédiaire d'un ou plusieurs partenaire(s) rédox. Ainsi, il est possible de différencier quatre classes de P450 selon la topologie des partenaires rédox impliqués dans la chaîne de transport d'électrons (Figure 7) :

- Classe I : Le partenaire rédox est composé de deux protéines : ferrédoxine réductase, et ferrédoxine (protéine Fer-Soufre). Ce système est retrouvé dans les bactéries (ex : P450cam).
- Classe II : La structure est la même que pour la classe I, mais enchâssée dans la membrane. Ils sont situés dans la membrane interne des mitochondries. Seule la partie ferrédoxine est soluble.
- Classe III : Le partenaire rédox est composé d'une protéine fusionnée (diflavine réductase) contenant un domaine FAD et un domaine flavine mononucléotide (FMN), enchâssée dans la membrane du réticulum endoplasmique des cellules de mammifères.
- Classe IV : Ces cytochromes comprennent un domaine hémique, fusionné avec un domaine diflavine réductase. Ils sont autonomes et ne nécessitent donc pas de protéines partenaires pour le transport d'électrons. Autrement dit, la chaîne de transport est fusionnée avec le gène P450 sous une seule chaîne polypeptidique (ex : P450BM-3, P450RhF).

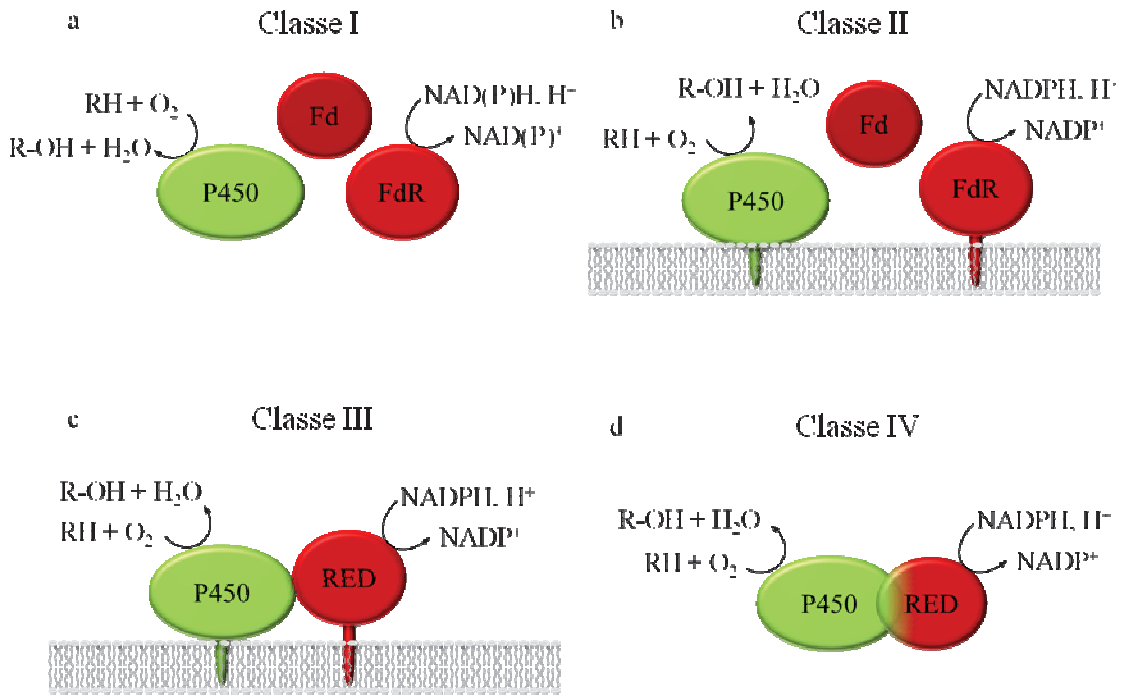


Figure 7 : Représentation schématique des quatre classes structurales des cytochromes P450. Fd : Ferrédoxine, FdR : Ferrédoxine réductase, RED : Cytochrome P450 réductase. (a) Système bactérien de classe I ; (b) Système mitochondrial de classe II ; (c) Système bi-composantes insoluble de classe III ; (d) Système autosuffisant de classe IV. Adapté de Bernhardt *et al*., 2006.[67]

1.2.4.2 Propriétés spectroscopiques

L'identification des P450 remonte à 1958, lors de la découverte par Garfinkel et Klingenberg d'un pigment jaune orangé dans des fractions microsomales hépatiques de rongeurs, en présence de monoxyde de carbone. Ce pigment fut tout d'abord caractérisé comme étant une hémoprotéine puis fut désigné « P450 » par Omura et Sato en 1964,[61] en raison de ses propriétés d'absorption à 450 nm lors de sa réduction et de sa complexation au monoxyde de carbone (Figure 8). Le « P » de P450 fait référence quant à lui au mot « pigment ».

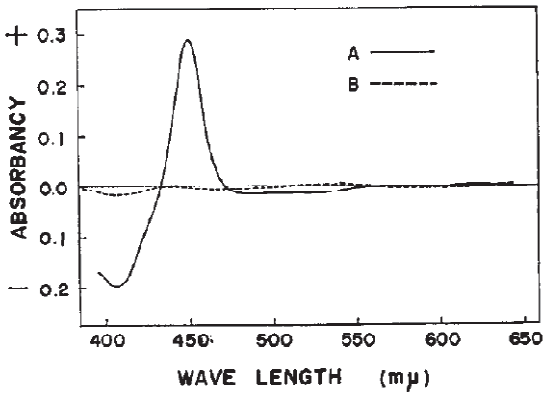


Figure 8 : Premier spectre présentant le pic d'absorbance à 450 nm de microsomes hépatiques. A) Après réduction et complexation au monoxyde carbone ; B) Microsomes non traités (d'après Omura et Sato, 1964).[61]

Ces propriétés spectroscopiques proviennent plus précisément de l'hème du P450, composé d'une protoporphyrine IX de fer incorporée au sein de la protéine (Figure 9a) et constituant son centre catalytique (Figure 9b). Les échanges électroniques entre le fer et la porphyrine permettent de réguler l'équilibre de l'état de spin du fer, qui joue un rôle majeur lors de l'activation de l'oxygène pour la catalyse d'oxydation.[68]

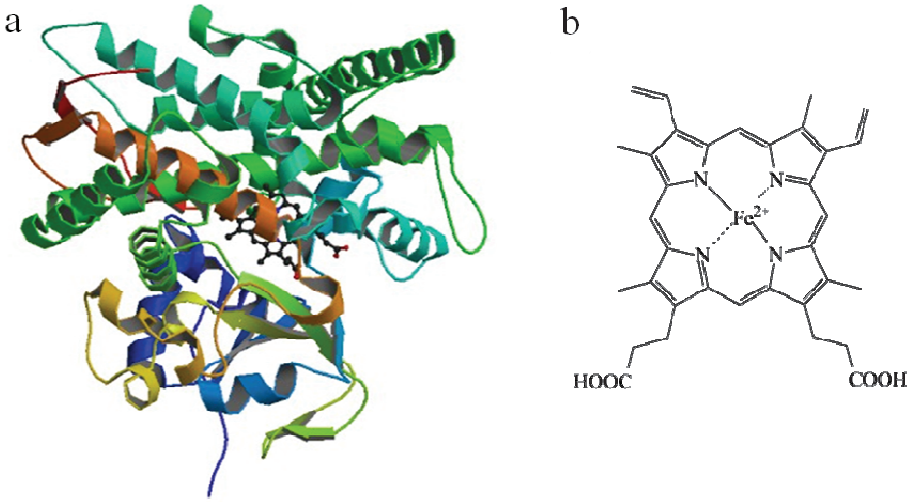


Figure 9 : Représentation d'un P450 et de son centre catalytique. (a) Représentation tridimensionnelle du domaine hydroxylase de P450 BM-3 d'après la structure cristallographique (code PDB 2HPD, Ravichandran *et al.*, 1993).[69] (b) Protoporphyrine IX à fer constituant l'hème des cytochromes P450.

Ainsi, les cytochromes P450 sont constitués d'une partie protéique, l'apoprotéine, et d'un groupement prosthétique, l'hème, dont le fer central est lié d'une part aux quatre azotes pyrroliques de la porphyrine, et d'autre part de façon non covalente à l'apoprotéine par une cystéine (face proximale) (Figure 10). Le fer peut être hexacoordonné, et recevoir comme sixième ligand H_2O ou O_2 (face distale). Le site actif des P450 est de nature hydrophobe, ce qui leur permet d'accueillir des substrats de même nature.

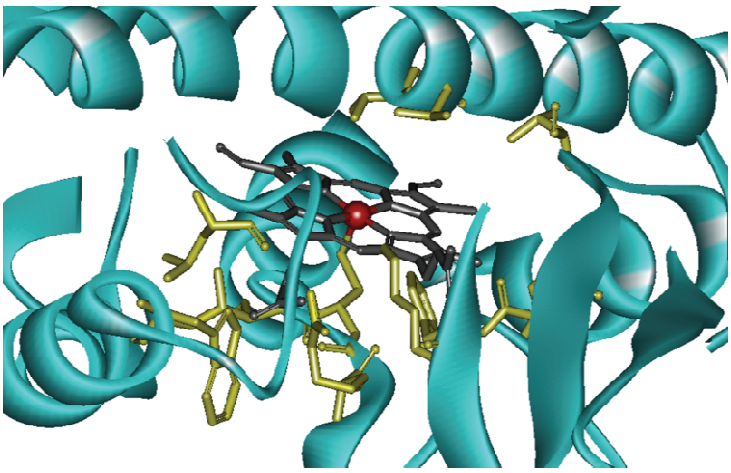


Figure 10 : Structure tridimensionnelle du site actif d'un cytochrome P450 (P450 BM-3, code PDB 2HPD) (Ravichandran *et al.*, 1993).[69]

1.2.4.3 Mécanisme d'activation du dioxygène moléculaire et d'oxygénation du substrat

Le cycle général d'oxydation est révélé depuis le début des années 80.[70] Par la suite, des études plus poussées ont permis de percer le mécanisme d'activation du dioxygène.[71,72]
De façon très générale, un atome d'oxygène (provenant de l'oxygène moléculaire) est introduit sur un carbone non activé, alors que le deuxième atome d'oxygène est réduit en eau.

Cette réaction peut être décrite par un cycle réactionnel qui englobe les états rédox successifs de la protéine (Figure 11). Dans son état natif, le cytochrome est sous forme ferrique (Fe^{3+}) bas spin, hexacoordonné : quatre liaisons sont engagées avec les azotes de la porphyrine, une liaison est formée avec l'atome de soufre de la cystéine proximale, tandis qu'une molécule d'eau occupe la sixième position (**A**). La molécule de substrat entre dans la poche enzymatique et déplace la molécule d'eau (**B**), ce qui provoque un changement de spin du fer vers l'état haut spin. Le centre métallique est alors en dehors du plan de la porphyrine. Le potentiel rédox de Fe^{3+} augmente et permet la réduction du centre métallique par le premier électron vers un composé ferreux Fe^{2+} (**C**).

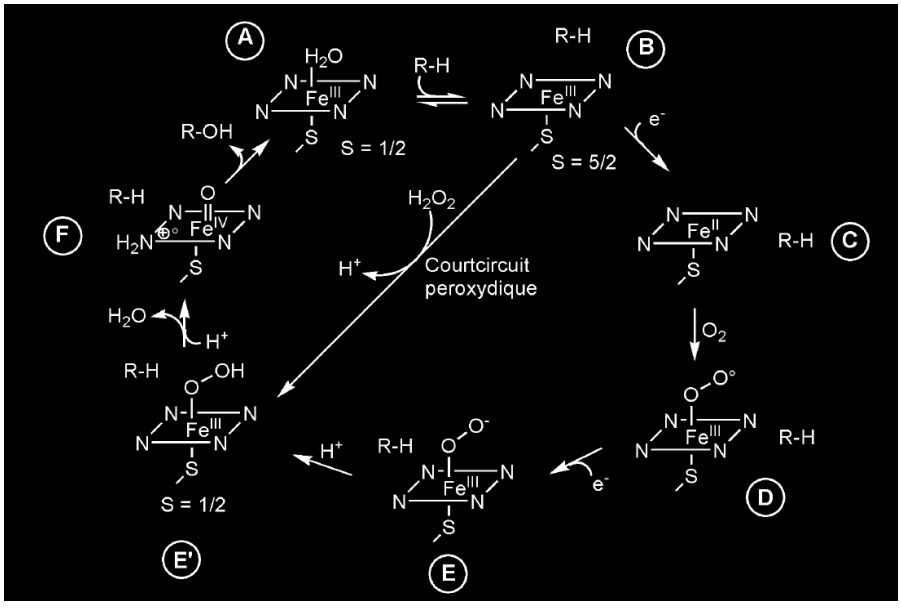


Figure 11 : Cycle catalytique du cytochrome P450 (issu de Meunier *et al.*, 2004).[73]

Le complexe oxygéné Fe(III)-$OO^{\bullet}$ est formé (**D**), et peut ensuite être réduit par un deuxième électron. C'est cette réaction qui initie l'étape catalytique et l'activation de l'oxygène. L'apport de ce deuxième électron est spécifiquement réalisé par la protéine partenaire de la chaîne de transfert d'électrons. La deuxième étape de réduction est l'étape cinétiquement déterminante. Un intermédiaire Fe(III)-peroxo (**E**) est formé. Le composé **E** est bas spin. Ce

premier intermédiaire est ensuite protoné pour donner le deuxième intermédiaire (**E'**). Une deuxième étape de protonation est nécessaire à la formation de l'espèce cationique Fe(IV)-oxo radicalaire (**F**), aussi appelé composé I, qui constitue l'intermédiaire réactif.[74,75] L'accumulation de la charge négative sur la cystéine lors de la première étape de protonation représente une des forces motrices à la coupure hétérolytique de la liaison O-O. Enfin, la libération du produit, permet de retrouver l'enzyme libre, ferrique, bas spin, de départ.
Certains P450 peuvent s'affranchir de l'apport d'électrons en utilisant le peroxyde d'hydrogène comme oxydant, ce qui leur permet de générer directement l'espèce active **E'** à partir de la forme haut spin **B**. Cette voie est appelée « court-circuit peroxydique ».

Dans le cycle général, l'apport d'électrons est assuré par le NAD(P)H. Les électrons sont ensuite transférés au centre catalytique *via* une ou plusieurs protéine(s) partenaire(s). Ces coenzymes sont des protéines à FAD ou FMN. Ces derniers possèdent un noyau azoté, l'isoalloxazine, qui leur permet de réaliser le transfert de deux électrons −en passant des formes oxydées (FAD, FMN) aux formes réduites ($FADH_2$, $FMNH_2$), et inversement− ou d'un électron à la fois, en passant par une forme radicalaire dite semiquinonique (Figure 12).

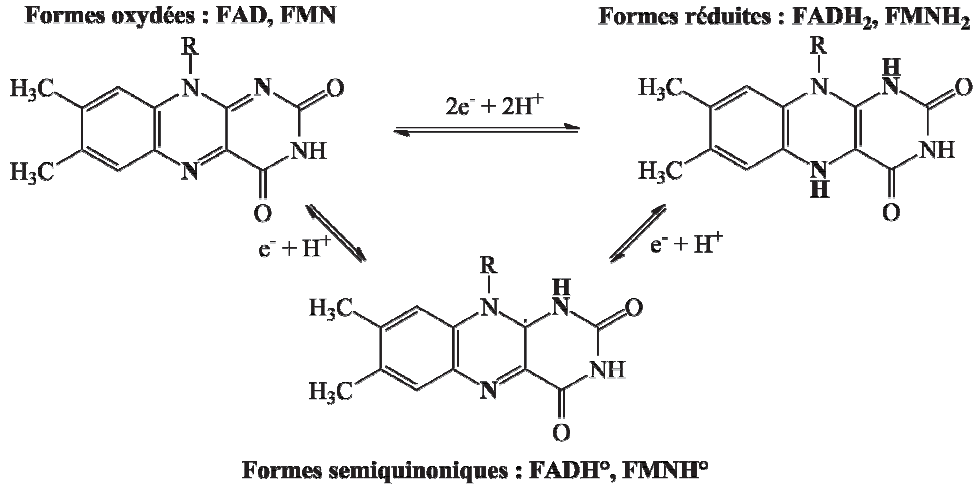


Figure 12 : Cycle d'oxydoréduction du noyau isoalloxazine des cofacteurs flaviniques FAD et FMN.

1.2.4.4 Oxydation des alcanes linéaires par les cytochromes P450

Trois familles de cytochromes ont été identifiées pour oxyder à l'état natif les alcanes linéaires. Il s'agit des cytochromes bactériens CYP153, de levure CYP52A3, et de lapin CYP4B1.

1.2.4.4.1 Cytochromes P450 de la famille CYP153

La première description d'un P450 bactérien capable d'oxyder les alcanes remonte à 1970. L'enzyme décrite, issue de *Corynebacterium* sp. 7E1C est capable d'oxyder l'octane en 1-octanol.[10] D'autre part, au début des années 80, Asperger *et al.* découvrirent que la bactérie *Acinetobacter* était capable d'utiliser l'hexadécane comme unique source de carbone, grâce à un cytochrome P450 fonctionnant comme une alcane hydroxylase.[76] Ce fut près de 20 ans plus tard que l'équipe identifia et caractérisa ce P450 comme étant un membre d'une nouvelle famille, qui fut nommée CYP153.[11] Le cytochrome issu de *Corynebacterium* sp. 7E1C fut classé dans cette même famille par van Beilen en 2006.[77]

Par la suite, plusieurs membres de cette famille ont été isolés à partir de microorganismes issus des sols ou des eaux polluées par le pétrole.[19] Les cytochromes P450 de la famille des CYP153 sont des cytochromes de classe I car ils sont solubles et utilisent une ferrédoxine et une ferrédoxine réductase pour fonctionner.[77]

1.2.4.4.2 Structure tridimensionnelle des CYP153

Un membre de la famille CYP153 (A7) a récemment été cristallisé et sa structure déterminée par diffraction des rayons X (Figure 13a). Jusqu'alors, les tentatives de cristallisation de CYP153 avaient été infructueuses, et seule une modélisation, basée sur la structure de P450 de familles différentes, avait pu être effectuée.[78]

La résolution de la structure de A7 révèle que le site actif du CYP153 est de nature hydrophobe, conformément à ce qu'avait laissé supposer la modélisation de A6,[78] et ce qu'avait présumé Maier en 2001, en observant la nature hydrophobe des acides aminés composant la première hélice I, qui borde le site actif du cytochrome P450 de *Acinetobacter* sp. EB104 (A1).[11]

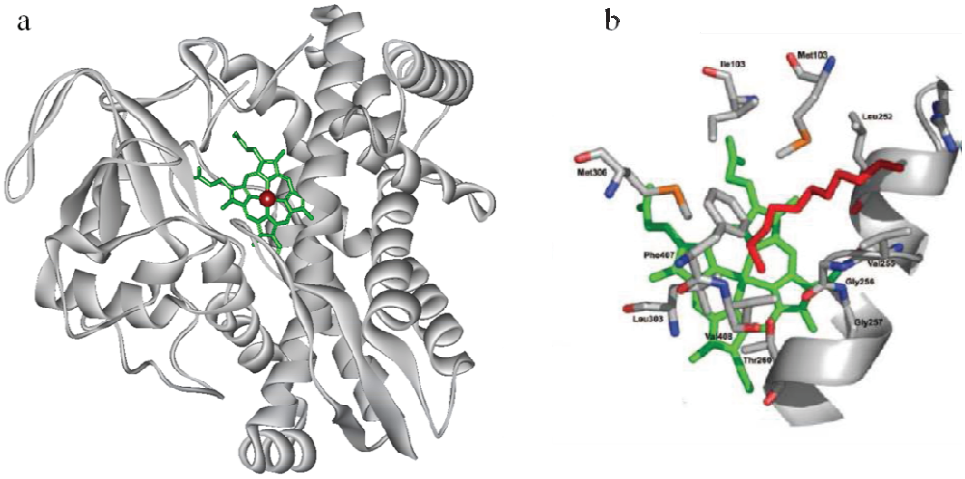


Figure 13 : Structure tridimensionnelle de CYP153. (a) Structure tridimensionnelle de CYP153A7 (PDB 3RWL). (b) Modélisation du site actif de CYP153A6, avec l'hème représenté en vert et la molécule d'alcane en rouge. Les différents résidus impliqués dans l'ancrage du substrat dans la poche catalytique sont indiqués (issu de Funhoff *et al.*, 2006).[78]

Ainsi, l'hydrophobie de la poche catalytique facilite le passage du substrat afin de l'orienter vers le centre catalytique. Des analyses *in silico* d'amarrage d'alcanes de C_5 à C_{10} ont montré que dans plus de 90 % des cas, les molécules se présentent de la même manière au site actif. Le carbone terminal est proche de l'ion ferreux de l'hème (4,5 Å pour CYP153A6) et l'alcane a une conformation coudée le long de l'hélice I, ceci en raison de la présence d'une phénylalanine située au milieu de la poche catalytique (Figure 13b). Si des alcanes de longueur de chaîne supérieure à 10 carbones sont présentés au site catalytique, seule une partie (jusqu'à 50 %) peut s'y fixer.[78]

1.2.4.4.3 Propriétés catalytiques des CYP153

CYP153A6 (A6) de *Mycobacterium* sp. HXN-1500 est le premier cytochrome de cette famille dont les propriétés catalytiques ont été étudiées. Pour cela, A6 et ses partenaires rédox ont été clonés au sein du même plasmide et exprimés chez *P. putida* et *E. coli*. Dans un premier temps, l'efficacité du système a été testée en évaluant la capacité des bactéries à croître sur l'octane comme unique source de carbone. La souche recombinante de *P. putida* croît très lentement (temps de doublement de 21 h, puis 3 h après plusieurs cycles de sélection) alors qu'aucune croissance n'est observée chez *E. coli*. La souche de *P. putida* a donc été retenue pour l'expression hétérologue de A6.[79] Par la suite, les CYP153 isolés à partir de bactéries de différentes sources ont été clonés dans un vecteur permettant la co-expression du P450 et des partenaires rédox de A6. Le criblage des CYP153 ayant une activité sur les alcanes a été effectué en fonction de la capacité de *P. putida* recombinante à croître sur l'octane.[77]

Les premiers tests d'activité ont été réalisés sur les extraits cellulaires bruts contenant le P450, ainsi que la ferrédoxine et la ferrédoxine réductase de A6 (Fd_{A6} et FdR_{A6}) (Tableau 2, entrée 5 et Tableau 4).[12,78]

Conditions	CYP153	Substrat	Produit (sélectivité)	TON/TOF	Réf
Co-expression P450, Fd_{A6}, FdR_{A6} dans *P. putida* Réaction sur extrait cellulaire brut	A1	Octane	1-octanol (> 95%)	nd / 33	12
	A6	Octane	1-octanol (> 95%)	nd / 61	78
	A7	Octane	1-octanol (> 95%)	nd / 28	12
	A11	Octane	1-octanol (> 95%)	nd / 22	12
	A11	Cyclohexane	Cyclohexanol	nd / 35	12
	A13	Octane	1-octanol (> 95%)	nd / < 0,1	12
	A13	Cyclohexane	Cyclohexanol	nd / 10	12
	A14	Octane	1-octanol (> 95%)	nd / 25	12
	D2	Octane	1-octanol (> 95%)	nd / 1,5	12
	D3	Octane	1-octanol (> 95%)	nd / 0,5	12
Co-expression P450, CamA, CamB dans *E. coli* Bioconversion (24h)	A1	Octane	1-octanol (94 %)	225 µg. $nmol^{-1}$[a]	80
	A13	Octane	1-octanol (88 %)	25 µg. $nmol^{-1}$[a]	80
Expressions indépendantes de P450, FdR_{A6}, Fd_{A6} dans *E. coli* et purification (Ratio 1 : 1 : 10)	A6	Hexane	1-hexanol (nd)	nd / 98	81
	A6	Octane	1-octanol (nd)	nd / 75	81
Expressions indépendantes de P450, CamA et CamB, dans *E. coli* et purification (Ratio 1 : 5 : 10) Régénération du cofacteur	A16	Octane	1-octanol (93 %)	40 / nd	82
	CYP153 A *P.* sp.	Octane	1-octanol (91 %)	55 / nd	82

Tableau 4 : Hydroxylation des alcanes par différents membres de la famille CYP153 : conditions réactionnelles et résultats catalytiques. [a] Pour les bioconversions, l'activité est donnée en µg de produit formé par nmol de protéines actives dans la bactérie, en 24h.[80]

Les cytochromes P450 CYP153 hydroxylent préférentiellement les alcanes linéaires à chaîne moyenne (C_5 à C_{12}) avec une forte sélectivité pour le carbone terminal (> 90 %) (Tableau 4). Les produits secondaires sont les 2-alcools et les α,ω-diols.[82] Toutefois, ils peuvent aussi hydroxyler les alcènes à chaîne moyenne, les alcanes cycliques (cyclohexane), et il s'est avéré que certains d'entre eux sont aussi capables de catalyser des réactions d'époxydation.[77] Les

fréquences de turnover n'excèdent pas 98 min^{-1}, déterminé pour A6 sur l'hexane, en système reconstitué (Tableau 4). L'optimisation du ratio entre les concentrations en P450 et en partenaires rédox est déterminant.[82] Ces derniers peuvent provenir du même organisme, ou d'un organisme différent : l'utilisation de la ferrédoxine réductase (CamA) et de la ferrédoxine (CamB) issues de *P. putida* a permis un transfert d'électrons efficace vers les cytochromes.[80,82]

1.2.4.4.4 Cytochromes P450 CYP4B1 et CYP52A3

Le CYP4B1 est le seul cytochrome de mammifère connu pour oxyder les alcanes. Il possède un large spectre de substrats, et oxyde aussi bien les acides gras linéaires comprenant de sept à dix atomes de carbones, les acides gras branchés (C_8), que les alcanes linéaires (C_7 à C_{10}) et branchés (C_8). L'oxydation se fait préférentiellement au niveau des carbones terminaux et sub-terminaux, avec une augmentation du pourcentage d'oxydation en C-terminal lorsque la longueur de la chaîne de carbone diminue. Le taux de conversion maximum est obtenu avec l'heptane avec une fréquence de turnover de 33 min^{-1}, et une régiosélectivité de 96 % pour le C-terminal (Tableau 2, entrée 6).

Le cytochrome CYP52A3 est issu de la levure *Candida maltosa*. Il accepte les alcanes linéaires à longue chaîne (C_{10} à C_{18}), avec une préférence pour l'hexadécane.[83] Celui-ci est oxydé en 1-hexadécanol avec une fréquence de turnover de 23 min^{-1} (Tableau 2, entrée 7).[25] De nombreux produits d'oxydation sont retrouvés en fin de réaction : acide hexadécanoïque (50 %), 1-hexadécanol (30 %), acide 16-hydroxyhexadécanoïque (18 %), 1,16 hexadécanediol et acide 1,16 hexadécanïque (< 10 %). Malgré une forte régiosélectivité pour les carbones terminaux, cette enzyme n'est pas chimiosélective.

1.2.5 Peroxygénases

Une peroxygénase sécrétée par le champignon *Agrocybe aegerita* (APO AaPII) a récemment prouvé sa capacité à oxyder les alcanes. Cette enzyme hémique accepte les alcanes linéaires de C_3 à C_{16} avec une activité maximale pour l'hexane (nombre total de turnovers réalisés par l'enzyme (TON) : 1900 mol de produit / mol d'enzyme) (Tableau 2, entrées 8 et 9).[26] Sa régiosélectivité est en faveur des 2- et 3-alcools (1:1). Son mécanisme est similaire à celui des P450, avec un centre actif ferrique, à la différence que cette enzyme utilise le peroxyde d'hydrogène comme source d'oxygène, et ne nécessite donc pas de cofacteur de type nicotinamidique. De plus, elle présente une forte stabilité dans différents solvants organiques,

avec des pourcentages relatifs d'activité maximaux dans l'acétone, l'heptaméthylnonane et l'hexane (par rapport à l'eau).
Sa solubilité, sa forte activité, ainsi que la dispense d'apport de cofacteur, font d'elle un biocatalyseur prometteur pour des applications en synthèse organique.

1.2.6 Conclusion sur les systèmes enzymatiques

Il existe différents systèmes enzymatiques à centre métallique, le plus souvent ferrique, capables d'activer le dioxygène ou le peroxyde d'hydrogène pour l'oxydation de molécules non réactives comme les alcanes.
Ces enzymes sont les méthanes monooxygénases, les alcanes hydroxylases, les cytochromes P450 et les peroxygénases. A elles toutes, elles couvrent une large gamme de substrat, et sont capables d'oxyder les alcanes linéaires du méthane à l'octadécane (C_{18}). D'autres enzymes, telle que LadA,[84] catalysent la monooxygénation d'alcanes à plus longue chaîne.

La plupart de ces enzymes possèdent d'excellentes chimiosélectivité et régiosélectivité (> 95 % en faveur du C-terminal pour AlkB et les CYP153). Toutefois, leur activité reste le plus souvent limitée[85] (TOF < 0,1 min^{-1} pour CYP153A13 sur l'octane : Tableau 2, entrée 5).[12]
Les causes peuvent être multiples, et la faible activité peut être due directement aux propriétés intrinsèques de l'enzyme qui ne permet pas de convertir le substrat au taux escompté, mais peut aussi provenir d'un problème de disponibilité de substrat. En effet, les hydrocarbures étant des substrats hydrophobes, ils sont peu ou pas solubles en milieu aqueux. L'utilisation de co-solvants organiques (diméthylsulfoxide, diméthylformamide, 2-propanol, éthanol, acétonitrile, acétone, etc.) est donc nécessaire pour augmenter leur solubilité, mais ils ne sont pas toujours tolérés par l'enzyme, même en faible concentration.[86] Il en découle donc un second problème de la tolérance enzymatique aux solvants. Pour cela, la peroxydase APO AapII présente des propriétés intéressantes puisqu'elle reste stable dans des solvants tels que l'acétone ou l'hexane, mais nécessite le peroxyde d'hydrogène pour fonctionner, moins stable que l'oxygène, et aussi plus difficilement transportable et stockable.
Un troisième facteur pouvant influencer de manière non négligeable l'activité de l'enzyme est la qualité de transport des électrons du cofacteur vers le centre catalytique. Dans de nombreux cas l'éloignement des partenaires rédox, ou leur inefficacité mène à une consommation non productive d'électrons appelée phénomène de découplage.[87] De plus, pour certains cytochromes P450, la partie réductase n'est pas toujours identifiée. Par conséquent, la

caractérisation enzymatique avec des donneurs d'électrons provenant d'organismes différents demeure difficile dans la plupart des cas, en raison de la lenteur du transport des électrons vers le P450,[88] ou d'une mauvaise interaction entre les partenaires rédox. Des efforts d'optimisation du ratio P450/partenaires rédox doivent systématiquement être mis en œuvre pour maximiser l'activité (Tableau 4).[82] Ce type de problème ne se pose pas pour APO AapII puisqu'elle est capable d'activer directement le peroxyde d'hydrogène, et ne nécessite donc pas d'apport d'électrons.[26]

Enfin, l'expression en système hétérologue tel qu'*E. coli* est importante pour la surexpression des protéines. La complexité des systèmes enzymatiques composés de plusieurs entités protéiques (MMO, alcane hydroxylase AlkB, P450 de classe I) explique la difficulté à les exprimer en système hétérologue.[89] Bien que certains d'entre eux présentent une activité satisfaisante (AlkB, sMMO), la reconstitution *in vitro* est plus laborieuse car elle demande la surexpression et la purification de trois protéines. L'expression dans *E. coli* et la purification de l'alcane hydroxylase AlkB, par exemple, ne sont toujours pas satisfaisantes, du fait de sa faible solubilité et qu'elle soit tri-composantes.[60] De nature soluble, les cytochromes bactériens de la famille des CYP153, quant à eux, ont été exprimés en système hétérologue avec succès.

1.3 Ingénierie des cytochromes P450

Les chercheurs ont à leur disposition une boîte à outils conséquente permettant d'améliorer les performances des P450 (Figure 14). La principale technologie utilisée pour l'ingénierie enzymatique est la mutagénèse, qu'elle soit dirigée (approche rationnelle, lorsque la structure tridimensionnelle est disponible) ou aléatoire. Dans l'histoire de l'ingénierie des P450, elle a principalement visé à améliorer leur activité, modifier leur spécificité, augmenter leur tolérance aux solvants et leur stabilité. Il est aussi possible par ces mêmes techniques d'améliorer le transfert des électrons en ciblant cette fois-ci le domaine réductase.

D'autre part, l'efficacité du procédé catalytique peut être augmentée sans modifier génétiquement l'enzyme. Pour cela, l'ingénierie de substrat et le génie des procédés biocatalytiques constituent des outils puissants.

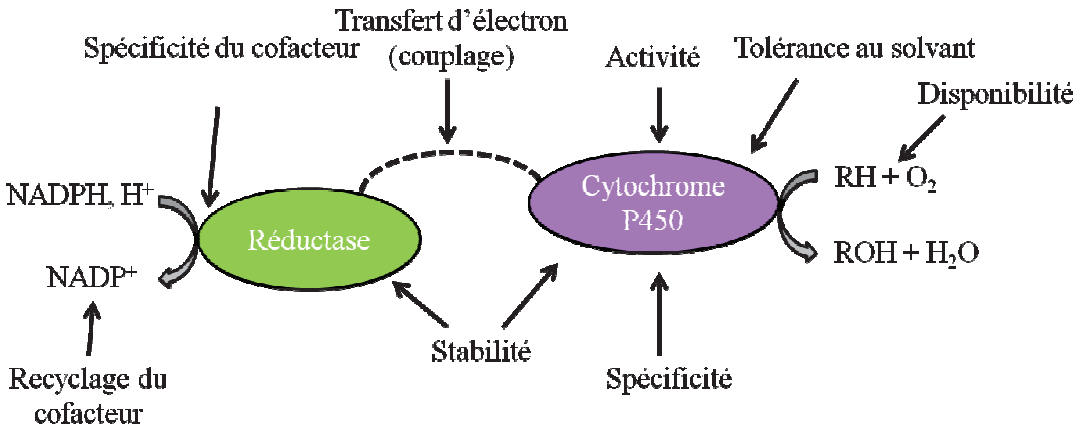


Figure 14 : Cibles d'amélioration du biocatalyseur.

1.3.1 Ingénierie de l'enzyme

1.3.1.1 Mutagénèse

La mutagénèse dirigée des enzymes a pour but principal d'améliorer leurs propriétés catalytiques telles que leur activité ou leur spécificité de substrat, mais elle est aussi couramment utilisée pour augmenter leur thermostabilité, leur tolérance aux solvants ou encore leur régiosélectivité.[90] Deux enzymes en ont particulièrement été la cible, les cytochromes P450 BM-3 et P450cam, du fait de la disponibilité de leur structure tri-dimensionnelle, et de leurs avantages respectifs tels que leur solubilité, leur forte activité et leur expression en organisme hétérologue. Les efforts peuvent se concentrer sur la modification du site actif mais l'ensemble de la protéine peut aussi être touché.

1.3.1.1.1 Cytochrome P450 BM-3

Le cytochrome P450 BM-3 (CYP102A1) est issu de *Bacillus megaterium* et est composé d'un seul et unique polypeptide qui comprend à la fois le domaine hémique et le domaine réductase.[14,91] Cette fusion avec la partie réductase lui permet d'être autonome au niveau de l'apport d'électrons, et de minimiser leur perte, qui aurait pour conséquence une consommation non productive de cofacteur (découplage). Cette propriété explique en grande partie la très forte activité de ce cytochrome sur son substrat naturel. La gamme de substrats oxydés est relativement réduite : seuls les acides gras de C_{12} à C_{20} sont oxydés, préférentiellement en positions ω-1, ω-2, et ω-3 (Figure 15).[92,93,94]

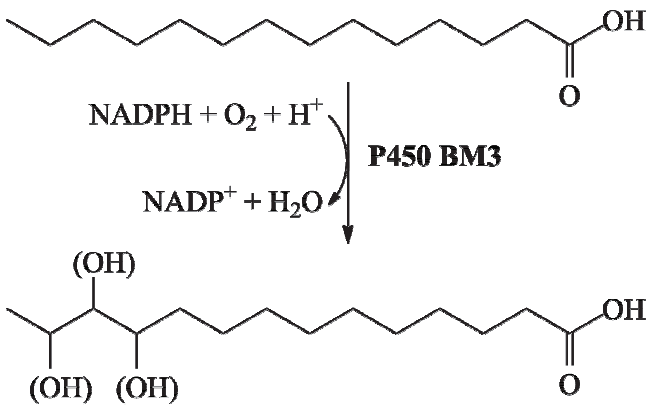


Figure 15 : Hydroxylation de l'acide myristique par P450 BM-3 à l'état natif.

A l'état natif, ce cytochrome n'a pas d'affinité pour les alcanes.[91] En combinant différentes méthodes de mutagénèses aléatoire et dirigée, ainsi que des recombinaisons entre mutants, l'équipe de Frances Arnold a mis au point des mutants capables d'oxyder les alcanes, avec un effort particulier pour augmenter l'activité sur les alcanes à chaîne courte (Figure 16).[95]

Les différents cycles de mutagénèse ont à la fois augmenté l'affinité du cytochrome pour les alcanes à chaînes plus courtes (< C_8), mais aussi amélioré leur activité et leur efficacité de couplage. L'ultime mutant créé, $P450_{PMO}$, possède la propriété d'oxyder l'éthane, avec une activité maximale sur le propane. Le $P450_{PMO}R2$ oxyde le propane en 2-propanol et 1-propanol (9:1), avec un nombre total de turnover de 45 800 et une fréquence de turnover de 370 min^{-1} (Tableau 2, entrées 10 et 11).[27,96] Sur 23 mutations, 20 sont situées dans le domaine hémique (dont quatre dans le site actif), et trois dans la réductase. Les mutations au sein du site actif remplacent des résidus alanine ou valine (peu encombrants) par des chaînes latérales plus larges qui réduisent le volume du site actif, qui passe de 560 à 314 $Å^3$. L'ancrage d'alcanes de plus petite taille (< C_5) est favorisé, et le confinement imposé par la taille du site actif réduit la liberté de positionnement du substrat. Ceci conduit à la fois à un fort couplage (98 % des électrons apportés mènent à la formation de produit) et à une régiosélectivité augmentée.[96] L'oxydation du méthane quant à lui reste toujours problématique, voire impossible dans ces conditions (pression atmosphérique et oxygène de l'air comme oxydant).[27]

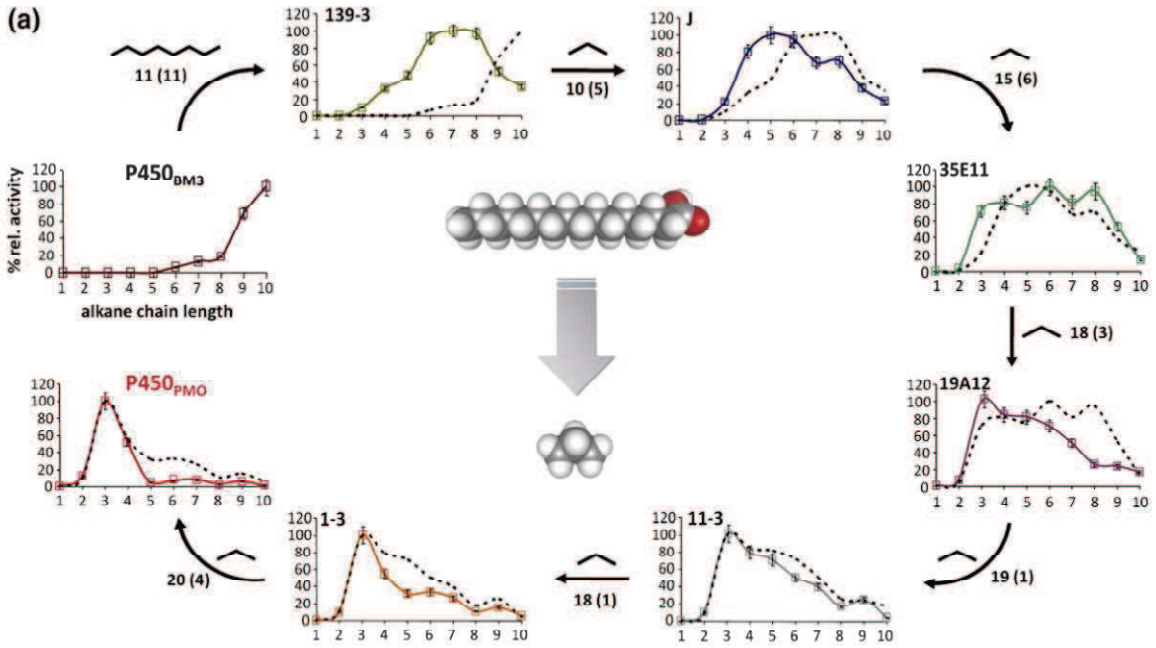


Figure 16 : Vue d'ensemble des cycles de mutagénèse réalisés sur P450 BM-3 vers l'hydroxylation de l'éthane (Fasan *et al.*, 2007).[27] Le nom des mutants est indiqué en gras. Le substrat pour lequel la banque de mutants a été criblée, ainsi que le nombre de mutations situées au sein du domaine hémique sont indiqués au niveau des flèches. Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de mutations insérées en plus par rapport au mutant précédent.

L'amélioration de l'activité d'une enzyme passe aussi par l'augmentation de la disponibilité en substrat. Toutefois, les enzymes ne sont pas souvent stables dans les co-solvants organiques utilisés pour augmenter la solubilité des substrats hydrophobes. Par évolution dirigée, la stabilité du cytochrome P450 BM-3 a pu être augmentée en présence de certains co-solvants organiques : diméthylsulfoxide (DMSO), tétrahydrofurane (THF), acétone, acétonitrile, diméthylformamide (DMF), ou encore éthanol.[97]

1.3.1.1.2 Cytochrome P450cam

Un deuxième cytochrome, le P450cam (CYP101) a lui aussi été le sujet d'intenses travaux d'ingénierie moléculaire dans le but de lui faire accepter un substrat différent de son substrat naturel, le camphre. Il est issu de *P. putida*[98] et catalyse à l'état natif l'hydroxylation du camphre en position C_5-exo. La structure de son site actif est donnée Figure 17.

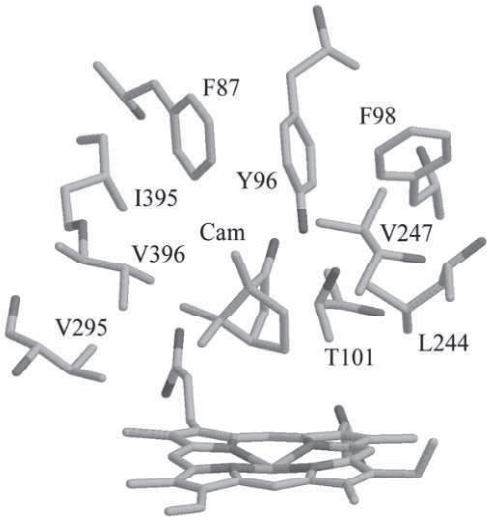


Figure 17 : Structure du site actif du P450cam avec son substrat naturel (camphre) (Bell *et al.*, 2002).[99] Seuls les résidus impliqués dans l'ancrage du substrat au sein du site actif sont représentés.

L'hydroxylation des alcanes à chaîne moyenne (C_5-C_7) avec P450cam est faible mais détectable (TOF entre 0,2 et 0,9 min^{-1}), alors qu'elle est pratiquement inexistante sur les alcanes plus courts ($\leq C_4$). Guidés par la structure cristallographique de l'enzyme native,[100] les premiers travaux de mutagénèse dirigée du cytochrome P450cam ont visé la poche catalytique. A l'état natif, les chaînes latérales des résidus qui la composent sont en majorité hydrophobes. Le résidu le plus hydrophile est la tyrosine 96. Sa mutation en phénylalanine, plus hydrophobe et plus encombrante, conduit à l'oxydation du pentane (TOF : 106 min^{-1}), de l'hexane (TOF : 110 min^{-1}) et de l'heptane (TOF : 18 min^{-1}).[101] La mutation de ce même résidu en alanine, moins encombrante que la phénylalanine, augmente aussi l'activité mais le couplage est plus bas, ce qui met en évidence le rôle de la chaîne latérale de la phénylalanine, qui réduit le volume de la poche et permet un meilleur couplage. Celui-ci est par ailleurs amélioré par l'augmentation de l'hydrophobie de la poche : les molécules d'eau sont plus facilement chassées du site actif par l'arrivée des alcanes, dont l'affinité avec les résidus composant le site actif est plus forte.[102] La combinaison d'une seconde mutation, V247L, augmente l'activité du mutant sur l'hexane (TOF : 176 min^{-1}, 67 % de couplage).[103] En conservant le même raisonnement, deux mutations supplémentaires (F87W et T101L) ont par la suite été introduites au sein du site actif, et conduit à l'oxydation du butane (TOF : 750 min^{-1}, 95 % de couplage) et du propane (TOF : 110 min^{-1}, 32 % de couplage). Tous deux sont oxydés en position 2.[99] Par la suite, une cinquième mutation (L244M) a encore permis d'améliorer l'activité sur le propane (TOF : 176 min^{-1}, 66 % de couplage).[104] La structure a été examinée et des cavités présentes dans le site actif ont été mises en évidence. Ces cavités pouvaient loger une petite molécule telle que l'éthane à l'écart du centre ferrique. Ainsi, afin

d'éviter que de telles molécules s'y logent, des mutations ont été introduites pour obstruer ces cavités. A l'état natif, trois molécules d'eau pouvaient se loger dans le site actif, alors que dans ce mutant, une seule peut rentrer. Le dernier mutant possède au total neuf mutations et, en plus de montrer une activité et un couplage accrus pour le propane et le butane (Tableau 2, entrée 12), il est capable d'oxyder l'éthane en éthanol (TOF : 78 min^{-1}, 10 % de couplage, Tableau 2, entrée 13) sans formation de produit de suroxydation.[29]

1.3.1.1.3 Cytochrome CYP153A6 et alcane hydroxylase AlkB

A la différence de P450 BM-3 et P450cam, les enzymes CYP153A6 et AlkB possèdent naturellement la capacité d'oxyder les alcanes à chaîne moyenne, avec une forte régiosélectivité. Il était alors raisonnable de penser que la mutagénèse de ces enzymes avait de fortes chances d'augmenter leur activité sur ces substrats, tout en conservant leur régiosélectivité.

La méthode de criblage est basée sur la capacité des bactéries contenant l'enzyme mutée à croître sur un milieu contenant l'alcane ciblé comme unique source de carbone.

Le mutant CYP153A6-BMO1 possède une seule mutation (A97V), avec une activité accrue sur le butane (TOF mesuré *in vivo* de 49 min^{-1}, contre 28 min^{-1} pour l'enzyme native). L'activité sur le pentane est aussi augmentée, alors que celles sur le propane et l'octane sont diminuées. Il semblerait que cette mutation, éloignée du site actif, ait un effet de stabilisation de l'enzyme, mais la raison pour laquelle seules les activités sur le butane et le pentane sont augmentées reste peu claire.[105]

Les bactéries exprimant le mutant AlkB-BMO2 montrent quant à elles une croissance plus rapide que celles contenant les enzymes natives, sur le propane et le butane. L'effet est inversé avec le pentane et l'octane. Ce mutant possède trois mutations, V129M, L132V et I233V. Les deux premières sont localisées à proximité du site actif, plus précisément de la séquence conservée $H_{138}EXXHK_{143}$, qui contribue à la coordination des atomes de fer. La troisième est située au sein d'une des hélices transmembranaires, du côté périplasmique.

A ce jour, aucune mesure de l'activité *in vitro* de ces mutants, permettant de comparer leur activité sur le butane, n'est disponible dans la littérature.

1.3.1.2 Fusion artificielle avec les partenaires rédox

La plupart des systèmes P450 fait intervenir une ou deux protéines rédox. Leur étude et leur application synthétique sont donc souvent limitées par la complexité du système multi composantes, nécessitant l'expression et la purification de deux voire trois protéines distinctes. Ces partenaires peuvent être de nature différente (ferrédoxine et ferrédoxine

réductase, diflavine réductase, flavodoxine), et ne sont pas toujours identifiés. Toutefois, leur mécanisme d'interaction avec le cytochrome est similaire : ils se lient à la partie P450 au niveau de domaines d'interaction spécifiques, conservés au cours de l'évolution et communs pour de nombreuses enzymes.[106] Les partenaires ne sont donc pas exclusifs, et dans la cellule, le transfert croisé d'électrons avec d'autres donneurs est possible.

Deux cytochromes présentent un intérêt particulier du fait de leur nature fusionnée (cytochromes de classe IV, Figure 7). P450 BM-3 est le cytochrome caractérisé le plus efficace en matière de catalyse, avec des réactions à la fois rapides et sélectives. Sa forte activité catalytique est due à l'efficacité du transport d'électrons du NADPH vers le cytochrome.[14] De plus, sa faible complexité induit une purification plus aisée. Le cytochrome P450RhF de *Rhodococcus* sp. NCIMB 9784,[15–17] plus récemment découvert, est construit sur le même schéma : la partie hydroxylase est fusionnée avec la partie réductase comprenant des domaines de liaison FMN et NADPH, ainsi qu'un centre de type ferrédoxine [2Fe2S]. La partie réductase de ce cytochrome possède l'avantage de transférer les électrons au P450 de manière plus simple et plus rapide que P450 BM-3.[16] Les propriétés de ces deux cytochromes naturellement fusionnés ont été étudiées,[107] et leurs caractéristiques avantageuses (simplification du système catalytique et amélioration de la vitesse de transfert des électrons) ont servi de modèle pour créer des systèmes de fusion artificiels entre un P450 et un partenaire rédox. De nombreux types de fusion ont été imaginés, autant avec les partenaires naturels du cytochrome qu'avec des donneurs étrangers.

Inspirée par le caractère autonome de P450 BM-3 et son activité inégalée, l'équipe du professeur de Montellano a fusionné P450cam avec ses partenaires rédox (putidarédoxine, Pd et putidarédoxine réductase, PdR), afin de créer un système artificiel autonome. Malgré des efforts d'optimisation de l'ordre des constituants et de la longueur des peptides liant les trois protéines entre elles, l'activité de la protéine PdR-Pd-P450cam a atteint seulement 1 % de l'activité du système reconstitué P450cam/PdR/Pd, obtenue avec un ratio optimal entre les trois constituants (1 : 8 : 20).[108] Cette faible activité est due aux contraintes structurales qui empêchent une interaction optimale entre la putidarédoxine et P450cam et conduit par conséquent à un mauvais transfert d'électrons entre ces deux domaines. Une méthode alternative consiste à lier les trois protéines par un système de pontage peptidique, afin de minimiser les contraintes structurales (Figure 18). Le pontage est basé sur les propriétés de la transglutaminase, capable d'établir une liaison entre les résidus glutamine et lysine. Chacune des trois protéines a donc été dotée d'une séquence de reconnaissance qui contient les résidus glutamine et lysine. L'action de la transglutaminase permet ainsi de lier les trois protéines en

une unique réaction. La liberté d'interaction entre les protéines rédox et le cytochrome a permis d'augmenter l'activité d'un facteur 10 par rapport à la protéine de fusion.[109]

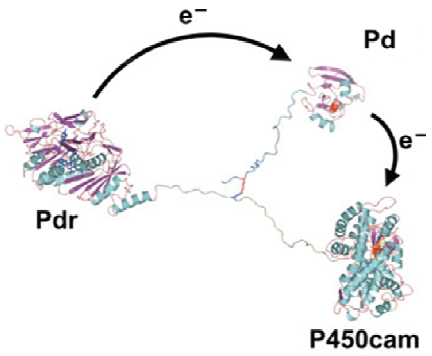


Figure 18 : Système de pontage peptidique entre le cytochrome P450cam et ses protéines rédox putidarédoxine réductase (Pdr) et putidarédoxine (Pd) (Hirakawa *et al.* , 2007).[109]

Une autre stratégie permettant d'améliorer le transfert d'électrons profite des avantages de la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), capable de créer des hétérodimères. Chacune des trois composantes a été fusionnée à une sous-unité de la PCNA, puis exprimée et purifiée de manière indépendante. L'assemblage des sous unités de la PCNA forme un hétérodimère permettant de rassembler les trois protéines dans un espace rapproché facilitant le transfert d'électrons (Figure 19). L'activité de ce système représente 25 % de l'activité de P450cam en système reconstitué.[110]

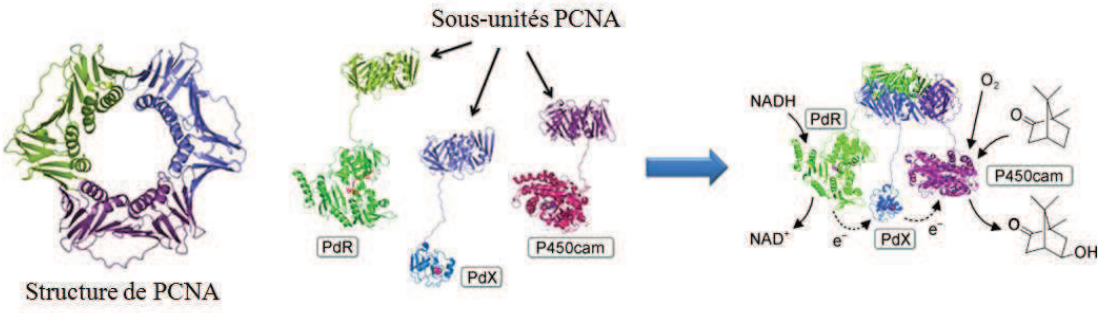


Figure 19 : Assemblage des sous unités PCNA fusionnées à P450cam et ses partenaires donneurs d'électrons putidarédoxine réductase (PdR) et putidarédoxine (PdX), pour former un hétérodimère permettant leur rapprochement spatial et facilitant le transfert des électrons (Adapté de Hirakawa *et al.*, 2010).[110]

En plus de copier la construction fusionnée de P450 BM-3, des équipes ont choisi d'isoler et de cloner directement son domaine réductase. Cette technique permet de créer une plateforme pour étudier de nombreux cytochromes dont les partenaires rédox n'ont pas forcément été idientifiés. De plus, la fusion leur permet de fonctionner de manière autonome, d'améliorer leur solubilité, et facilite leur purification. Toutefois, le taux de couplage reste relativement bas (inférieur à 30 %) et l'activité est comparable à celle du système reconstitué.[111,112]

L'étonnante vitesse de transfert des électrons au sein du cytochrome naturellement fusionné P450RhF a aussi inspiré plusieurs équipes. Ainsi, des fusions artificielles entre la partie hydroxylase d'un cytochrome, choisi en fonction de sa spécificité de substrat, et la partie réductase de P450RhF nommée RhFRED ont été développées.[20,113] L'équipe de Misawa a construit un système de « cassette PCR », permettant le clonage et l'expression de différents cytochromes appartenant à la famille CYP153, fusionnés avec le domaine réductase de P450RhF.[20] Ce système leur a permis d'exprimer dans *E. coli* plusieurs membres de cette famille de manière fonctionnelle, et de les caractériser *in vivo*.[19] Le détail de la construction génétique utilisée pour le clonage est donné à la Figure 20. Une construction identique a été utilisée par l'équipe de Sherman avec le cytochrome pikC, et a, quant à lui, permis sa caractérisation *in vitro*.[114] La longueur du peptide de liaison entre les deux domaines a aussi une influence sur l'activité : la longueur idéale semble être celle de P450RhF (composé de 16 acides aminés), allongée d'un polypeptide de neuf résidus, facilitant le repliement et la stabilité de la protéine.[115]

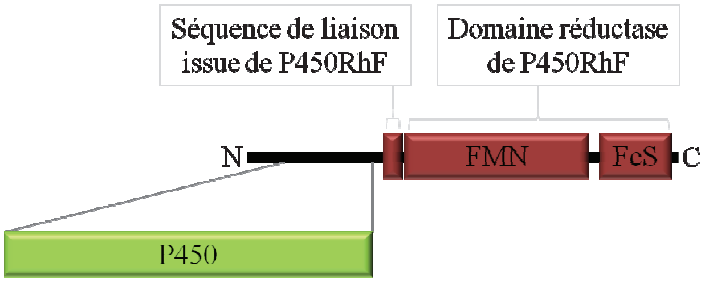


Figure 20 : Construction génétique utilisé par Nodate afin de fusionner un P450 et la partie réductase de P450RhF (adapté de Nodate, 2006).[20]

Enfin, il existe une multitude de systèmes de fusion plus exotiques entre un P450 et une réductase provenant d'organismes différents, comme par exemple le cytochrome 1A1 de rat et les partenaires rédox de chloroplastes, dont l'illumination actionne la production de NADPH et permet ainsi de reconstruire *in vitro* la chaîne d'électrons.[116] Une autre construction entre le domaine réductase de la nitrite oxyde synthase de neurone et la partie oxydase de P450 BM-3 permet de transporter les électrons de manière efficace.[117]

En plus de faciliter la composition du système biochimique, il est fréquent que ce type de fusion en augmente la solubilité. Aussi, la proximité des partenaires rédox permet, dans certains cas, de faciliter le transfert des électrons vers le cytochrome, d'en augmenter la vitesse et de diminuer leur perte menant à une consommation non productive du NADPH (découplage). Cependant, ce principe n'est pas toujours juste : l'activité en système reconstitué est parfois supérieure,[82] et le taux de couplage n'est pas systématiquement

augmenté.[111,112] Il n'est pas possible de déterminer à l'avance la meilleure stratégie, et la combinaison idéale devra donc être déterminée au cas par cas.[80]

1.3.2 Ingénierie du substrat

L'ingénierie du substrat constitue une approche indirecte ayant pour finalité l'hydroxylation d'un composé naturellement non accepté par l'enzyme. Plusieurs techniques peuvent être utilisées, soit par l'introduction d'un groupement protecteur au sein du substrat, soit par l'utilisation d'une molécule leurre facilitant l'ancrage d'un substrat non naturel au sein du site actif.

1.3.2.1 Protection du substrat

Le principe de la première technique consiste à introduire un groupement protecteur, le plus souvent aromatique, dans le substrat. Le greffage de ce groupement présente un double intérêt : le premier étant de faire accepter le substrat par l'enzyme, et le deuxième d'orienter l'hydroxylation vers une position particulière pour augmenter la spécificité (Figure 21).[118]

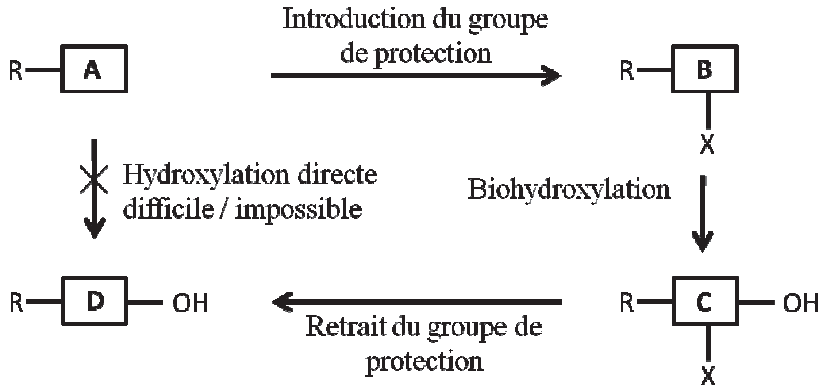


Figure 21 : Principe de protection / déprotection du substrat. Le groupement de protection (X) est introduit dans le substrat A pour donner le composé B. Ce composé peut être hydroxylé par l'enzyme pour donner le produit C. Le groupement X est enfin retiré pour donner le produit hydroxylé D (Adapté de de Raadt *et al.*, 2002).[118]

Cette méthode a notamment été utilisée pour l'hydroxylation de substrats tels que les alcools, les aldéhydes, les cétones et les acides carboxyliques. Par exemple, l'acide cyclopentanoïque est hydroxylé par *Cunninghamella blakesleeana* DSM 1906 avec 90 % d'excès énantiomérique en faveur de la forme *S* de l'alcool, lorsqu'il est protégé par un composé aromatique.[118]

1.3.2.2 Utilisation de molécules leurres

La deuxième technique consiste en l'utilisation d'une molécule leurre pour duper le centre catalytique, qui pourra être activé même en l'absence d'un substrat naturel.

Shoji *et al.* ont utilisé la seconde voie d'oxydation des cytochromes P450, appelée « court-circuit peroxydique », qui a la particularité d'activer le peroxyde d'hydrogène (Figure 11). Dans la plupart des cytochromes, cette voie n'est pas productive, mais la situation est différente pour CYP152A1 puisqu'il est capable d'utiliser le peroxyde d'hydrogène comme oxydant et ne nécessite donc pas l'apport de NADPH.[119]

Le cycle catalytique ne peut être initié que par la fixation du substrat sur un résidu arginine du site actif. L'utilisation d'une molécule leurre se fixant sur l'arginine mais n'étant pas oxydée leur a permis de duper l'enzyme : sa conformation est telle qu'elle peut se lier à l'arginine, mais sa taille est trop réduite pour se placer suffisamment proche du centre catalytique. Il ne pourra donc pas être oxydé, mais permet l'entrée dans le site actif d'un autre substrat non naturel qui pourra être fonctionnalisé (Figure 22). Cet exemple est le premier exemple d'oxydation d'un substrat non naturel par un cytochrome P450 sans mutation de l'enzyme.[119]

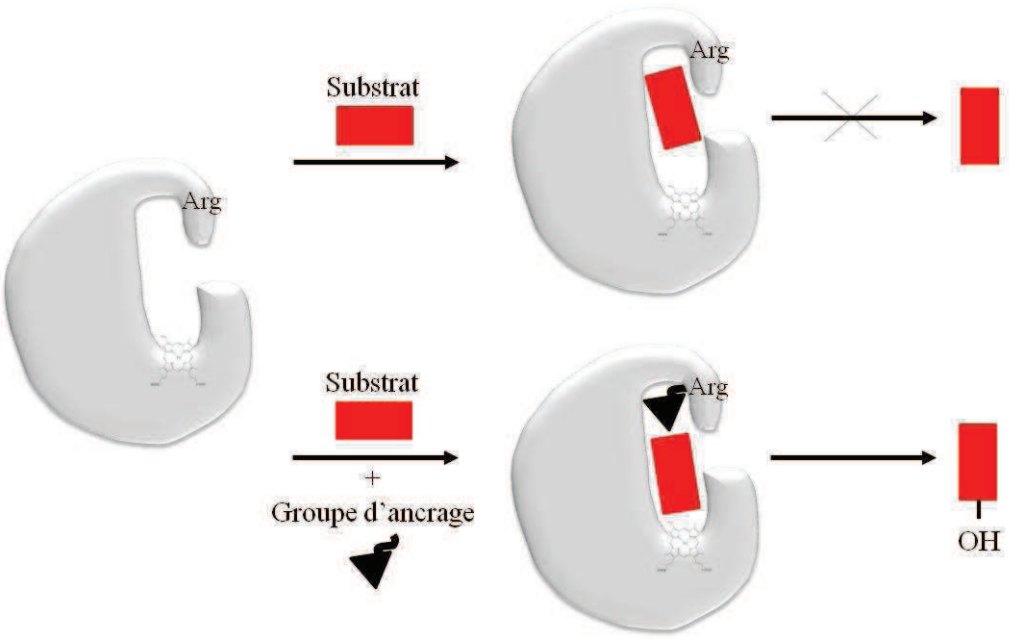


Figure 22 : Ingénierie du substrat : exemple d'utilisation d'une molécule leurre.

Plus récemment, l'équipe de Reetz est parvenue à faire oxyder le méthane par P450 BM-3 en utilisant un acide carboxylique perfluoré, qui joue le rôle d'activateur de la réaction. Celui-ci n'est pas oxydé et sa présence dans le site actif déplace la molécule d'eau, ce qui fait passer le fer de l'état bas spin vers l'état haut spin, et donc vers l'état actif. L'acide carboxylique perfluoré rempli l'espace vide du site actif, et oblige ainsi le méthane à se positionner au plus près du siège de l'oxydation (Figure 23).[30] Sans additif, P450 BM-3 n'est pas capable d'oxyder le méthane. En présence de l'acide carboxylique perfluoré, le TON de la réaction atteint 2 472 moles de méthane par mole d'enzyme (Tableau 2, entrée 14). L'activité de P450

BM-3 sur l'octane, l'hexane, le butane et le propane a aussi été améliorée, avec notamment un TON augmenté d'un facteur 7 pour le butane (TON = 3632) (Tableau 2, entrée 15).

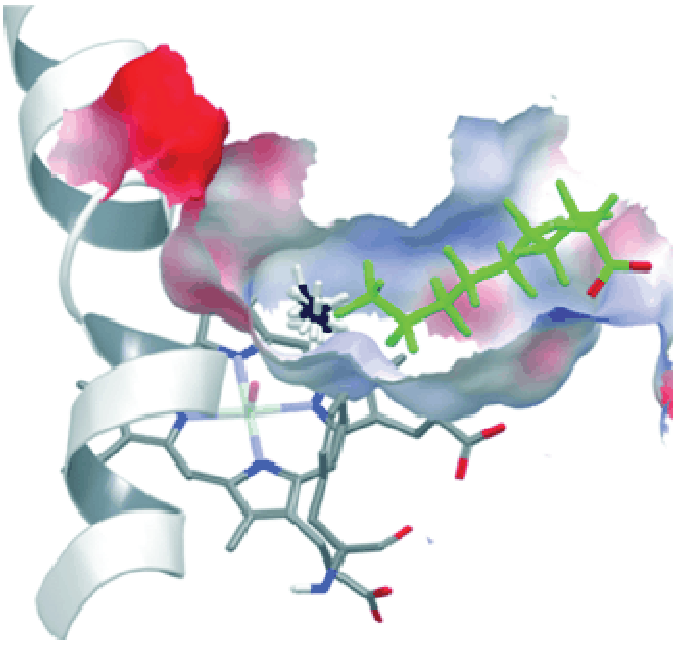


Figure 23 : Représentation schématique de la poche catalytique de P450 BM-3. L'acide carboxylique perfluoré est représenté en vert, et la molécule de méthane en noir (carbones) et blanc (hydrogènes), placée au dessus du centre catalytique (hème avec l'atome de fer au centre du noyau porphyrine) (Zilly *et al.*, 2011).[30]

Les travaux d'une seconde équipe confirment l'augmentation de l'activité lors de l'ajout d'acides carboxyliques perfluorés, mais ne parviennent pas à oxyder le méthane, du fait de différences au niveau des conditions opératoires : contrairement à cette deuxième étude, les essais de l'équipe de Reetz ont lieu sous pression de méthane (0,7 bar) et d'oxygène.[120]
Ces expériences prouvent d'une part la capacité des cytochromes à activer la liaison C-H du méthane, et d'autre part la nécessité d'appliquer des pressions en gaz et en oxygène suffisantes pour accomplir cette réaction.

1.3.3 Ingénierie de la réaction biocatalytique

L'efficacité de la réaction peut être considérablement accrue en alliant la modification intrinsèque du biocatalyseur avec le perfectionnement du procédé catalytique. Dans le cas de l'oxydation des alcanes en milieu aqueux, plusieurs limites se posent lors du déroulement de la réaction : la nécessité de réapprovisionnement en cofacteur, la disponibilité du substrat, du fait de sa faible solubilité en milieu aqueux, et la stabilité de l'enzyme sont les principaux facteurs pouvant être améliorés.

1.3.3.1 Approvisionnement en cofacteur

Le principal inconvénient pour les applications *in vitro* est la nécessité d'apport du NADPH en quantités stœchiométriques. Ce problème peut être contourné par l'exploitation d'un système de régénération du cofacteur. Plusieurs systèmes enzymatiques, avec comme première règle l'utilisation d'un substrat sacrificiel non toxique et peu coûteux, sont communément utilisés. Quelques exemples d'enzymes de recyclage, leur substrat et le type de cofacteur régénéré sont listés dans le Tableau 5.

Cofacteur	Substrat sacrificiel	Enzyme de recyclage	Produit	Ref.
NAD	Formate	Formate DH[a]	CO_2	121
NAD	Glycérol	Glycérol DH	Glycérone	122
NAD	Phosphite	Phosphite DH	Phosphate	123
NAD, NADP	Glucose	Glucose DH	Glucono- δ-lactone	124
NADP	Isopropanol	Alcool DH	Acétone	125
NADP	D/L isocitrate	Isocitrate DH	α-cétoglutarate	94

Tableau 5 : Inventaire (non exhaustif) des systèmes de régénération enzymatique *in situ* des cofacteurs de type nicotinamidique (NAD et NADP). [a] déshydrogénase.

D'autres approches ont pour but de s'affranchir de la nécessité de NADPH. La génération électrochimique d'électrons avec des particules de zinc et le médiateur Co(III)sepulchrate[126] constitue un exemple de source d'électrons alternative.

1.3.3.2 Disponibilité du substrat

Les substrats des P450 étant organiques et hydrophobes, leur solubilité dans l'eau est le plus souvent très faible voire nulle. Afin d'accroître la solubilité du substrat et donc sa disponibilité, des systèmes biphasiques émulsionnés peuvent être mis en œuvre. L'utilisation d'agents tensioactifs stabilise les émulsions, augmente l'aire interfaciale et minimise ainsi les problèmes de transfert de masse.[127] Plusieurs agents tensioactifs sont couramment utilisés, tels que l'agent anionique bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate sodium salt (AOT), ou le triton X100, non ionique. Avec son substrat naturel, P450cam forme 50 fois plus de produit en milieu biphasique émulsionné (AOT) qu'en milieu aqueux simple.[127] Les micelles inverses de type eau dans huile formées emprisonnent l'enzyme et agissent en tant que microréacteurs.

Une technique plus simple pour augmenter la solubilité du substrat est d'utiliser un co-solvant. Les enzymes ayant le plus souvent une faible tolérance aux solvants, il convient alors de le choisir de manière à ce qu'il n'influence pas, ou le moins possible, l'activité.

1.3.3.3 Stabilité de l'enzyme

En plus de la présence d'un co-solvant dans le milieu réactionnel, plusieurs autres facteurs comme la température et le pH peuvent inhiber l'activité de l'enzyme en affectant sa stabilité. La BSA (Bovine Serum Albumine), de nature protéique, et le glycérol sont des additifs permettant de stabiliser les protéines.

Une autre cause de désactivation de l'enzyme peut être son intolérance aux fortes concentrations en peroxyde d'hydrogène. Lorsque le cycle catalytique est interrompu du fait de l'arrivée trop tardive des électrons, une des voies de découplage conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène et inactive donc le centre catalytique.[87] L'ajout de catalase dans le milieu empêche cette inactivation en catalysant la conversion du peroxyde d'hydrogène en dioxygène et en eau.

Enfin, l'immobilisation de l'enzyme sur un support organique ou polymérique permet souvent d'améliorer sa stabilité dans le temps. Les différents supports varient selon leur porosité, leur hydrophobie ou encore leur stabilité. Plusieurs techniques peuvent être employées : immobilisation par adsorption, par greffage covalent, ou encore par encapsulation sol-gel, le plus souvent dans des silices.[128–131]

1.3.4 Conclusion sur l'ingénierie des cytochromes P450

De nombreux moyens peuvent être mis en oeuvre pour augmenter l'activité des cytochromes P450, mais aussi pour modifier leur spécificité de substrat, leur sélectivité, ou encore pour améliorer leur stabilité. Parmi eux, la mutagénèse constitue un outil puissant, mais demande un temps de travail considérable à partir de la création de la banque de mutants jusqu'à leur criblage. La fusion d'un cytochrome avec un partenaire donneur d'électrons peut aussi augmenter l'activité du P450, en facilitant le transfert des électrons entre les deux entités. Enfin, l'activité peut aussi être augmentée sans modifier l'enzyme, mais en visant cette fois-ci le substrat ou les conditions réactionnelles. Dans chacun des cas, aucune règle systématique ne peut être définie et il est nécessaire d'adapter la méthode en fonction du cytochrome étudié, et des objectifs fixés.

1.4 Oxydation chimique

En catalyse chimique, les alcanes ne sont réactifs que sous des conditions radicalaires, de haute température ou par photochimie. Ils ne sont pas attaqués par les acides forts, ni par les oxydants forts ni par les réducteurs forts. De nombreux catalyseurs ont été développés dans le but d'activer les alcanes de manière régio- et chimiosélective.

La plupart des catalyseurs employés nécessitent de hautes températures, de hautes pressions, des réactifs toxiques et/ou coûteux tels que les halogènes, l'or ou le platine. De plus, les réactions se déroulent en milieu corrosif comme l'acide sulfurique concentré, voire fumant.[2–6]

Toutefois, de nombreux efforts ont été réalisés par la communauté chimique, dans le but d'améliorer à la fois les conditions de réaction et l'activité des catalyseurs. Seuls les catalyseurs d'oxydation des alcanes linéaires présentant les avancées les plus remarquables, du point de vue de la sélectivité et de l'activité, et capables de fonctionner en conditions douces seront présentés dans cette partie.

1.4.1 Polyoxométalates

Le premier catalyseur homogène d'oxydation des alcanes (hexane) présentant une très forte chimiosélectivité pour l'alcool (96 %) est un hétéropolyanion phosphotungstique dopé par deux atomes de vanadium, constituant le centre actif (Figure 24a). Les deux atomes de vanadium sont reliés par des oxygènes (forme dihydroxo). L'arrivée du peroxyde d'hydrogène forme le complexe hydroxo-hydroperoxo, qui se déshydrate pour donner la forme active peroxo (Figure 24b). Ce système opère en conditions relativement douces (pression atmosphérique et 70 °C), mais n'est toutefois pas régiosélectif pour la position terminale, puisque le produit majoritairement formé est le 2-hexanol (66 %) avec seulement 2 % de 1-hexanol formé (Tableau 2, entrée 16).[31]

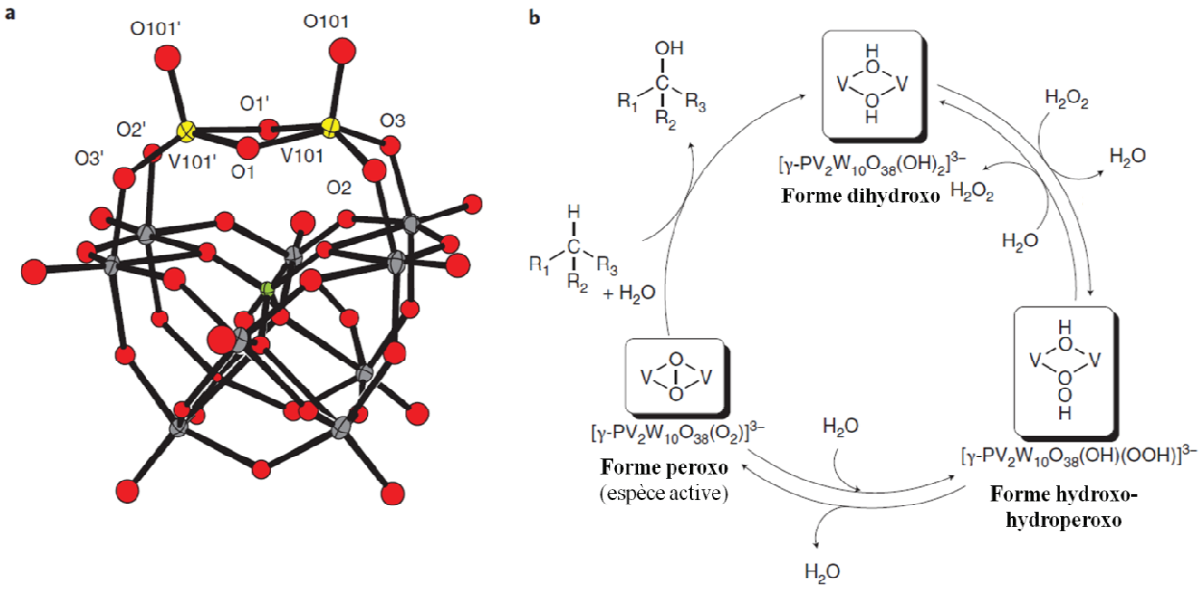


Figure 24 : Structure du polyoxométalate de type hétéropolyanion phosphotungstique et son cycle catalytique. (a) Structure de l'hétéropolyanion phosphotungstique bisubstitué par le vanadium. Les atomes de vanadium, tungsten, phosphore et oxygène sont respectivement jaune, gris, vert et rouge. (b) Mécanisme d'hydroxylation des alcanes par l'H_2O_2 par le catalyseur présenté en (a), (adapté de Kamata *et al.*, 2010).[31]

1.4.2 Catalyseurs de type microporeux

Une approche judicieuse pour améliorer la régiosélectivité est l'utilisation de matériaux microporeux, permettant de maîtriser l'entrée des molécules de substrat dans les pores, ou de limiter la forme des molécules produites. Ces matériaux diffèrent selon la taille de leurs pores, la nature de leur centre catalytique, l'acidité de leur surface et leur stabilité chimique, thermique et mécanique. L'échange avec des métaux de transition crée des centres catalytiques d'oxydation, alors que la sélectivité est donnée en contrôlant la taille des pores.

1.4.2.1 Zéolithes

Les propriétés microporeuses de la zéolithe ZSM-5 sont intéressantes puisqu'elles autorisent l'entrée des *n*-alcanes et des *n*-alcènes mais interdit celle des isomères branchés.[132] Partant de l'observation que l'efficacité et la régiosélectivité des enzymes monooxygénases sont dues à l'ancrage de la molécule de substrat au plus près du centre catalytique, les équipes d'Iglesia et de Panov ont tenté de reproduire ces propriétés en utilisant la zéolithe ZSM-5 échangée au manganèse,[133] au cuivre[8] ou encore au fer,[134] représentant les centres catalytiques. En jouant sur le diamètre des pores, la connectivité des canaux, et le centre métallique, des résultats prometteurs ont pu être obtenus. La zéolithe ZSM-5 échangée au fer a une sélectivité de 45 % pour l'alcool terminal (1-octanol), avec le peroxyde d'hydrogène comme oxydant.[135] La Mn-ZSM-5 forme quant à elle 24 % de 1-hexanol et utilise l'oxygène.[133] Enfin, les Fe-ZSM-5[134]

et Cu-ZSM-5[8] oxydent toutes deux le méthane en méthanol, mais leur activité reste très faible (TON : 0,024) (Tableau 2, entrée 17). L'activation du métal se fait par le protoxyde d'azote dans le cas de la Fe-ZSM-5, alors que la Cu-ZSM-5 peut aussi être activée par l'O_2.

1.4.2.2 Aluminophosphates

Les aluminophosphates (AlPO) sont d'autres types de matériaux microporeux permettant de contrôler la régiosélectivité. Ils sont formés d'un réseau d'atomes d'aluminium et de phosphores liés par des oxygènes. Les phosphates peuvent être substitués par des centres réactifs métalliques (Co ou Mn) (Figure 25). Ces centres apportent des propriétés rédox aux matériaux, qui peuvent alors intervenir dans l'oxydation ou l'activation des alcanes.[9] Les métaux de transition sont intégrés dans le réseau AlPO à l'état d'oxydation +2. Chauffés à une température supérieure à 550 °C en présence d'air, ils s'auto-oxydent pour passer à l'état +3 qui devient l'espèce active, alors que la morphologie du matériau ne change pas.[136] L'équipe de Thomas a montré la sélectivité de l'oxydation du pentane en pent-1-ol, pent-2-one et pent-3-one (rapport 3 : 4 : 2) avec les catalyseurs Co- et Mn-AlPO en utilisant l'oxygène de l'air comme oxydant. [9,136,137] Ce même type de catalyseur possède un taux de régiosélectivité pour le carbone terminal de l'hexane non égalé (65 %, répartis entre l'alcool, l'aldéhyde et l'acide) (Tableau 2, entrée 18). Toutefois, ces résultats ont été jugés non reproductibles par l'équipe d'Iglesia qui n'a obtenu qu'une régiosélectivité terminale inférieure à 10 % dans les mêmes conditions, ce qui correspond au pourcentage théorique attendu compte tenu des différentes énergies de dissociation des liaisons C-H de la molécule d'hexane.[138]

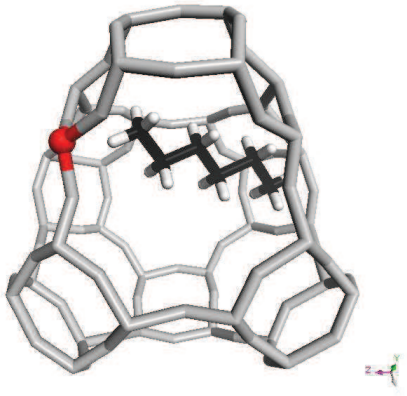


Figure 25 : Cavité du microporeux Mn-AlPO-18 contenant une molécule d'hexane. Le centre actif (Mn) est représenté en rouge.

En dépit de l'attrait que représentent ces catalyseurs microporeux au niveau du contrôle de la régiosélectivité, l'extraction des produits formés demeure insatisfaisante, et de nombreux produits de suroxydation sont retrouvés en fin de réaction.[139]

Finalement, malgré leur haute sélectivité,[2] ces techniques ne sont que peu satisfaisantes d'un point de vue chimiosélectif. De plus, l'activité de ces catalyseurs reste faible (Tableau 2, entrées 16, 17 et 18).

Ainsi, la plupart des catalyseurs chimiques développés s'inspirent du monde du vivant. En effet, de nombreuses études se sont intéressées aux systèmes enzymatiques pour mimer les réactions biocatalysées, capables d'activer l'oxygène moléculaire et de réaliser des oxydations à la fois régio- et chimiosélectives dans des conditions douces (milieu aqueux, température ambiante, pression atmosphérique), cette approche est appelée « biomimétisme ».

1.4.3 Catalyseurs biomimétiques

La haute sélectivité des systèmes enzymatiques ainsi que leur capacité d'activation de l'oxygène moléculaire en conditions douces ont largement inspiré la communauté des chimistes. Des complexes binucléaires et mononucléaires, hémiques (métalloporphyrine) ou non hémique, de différents métaux de transition tels que le fer, le cuivre ou encore le manganèse, imitant le site actif enzymatique, ont été synthétisés et caractérisés.

1.4.3.1 Les métalloporphyrines

Les hémoprotéines jouent un rôle important dans les processus d'oxydations biologiques, comme par exemple la dismutation du peroxyde d'hydrogène par les catalases ou encore l'oxygénation de substrats organiques catalysée par le cytochrome P450. La spécificité de ces catalyseurs résulte généralement des variations des structures protéiques environnantes et de l'interaction entre un ou plusieurs acide(s) aminé(s) de la protéine avec le métal du macrocycle tétrapyrrolique (porphyrine) constituant le centre actif du P450. Face à la spécificité non égalée de ce type d'enzymes, il était alors judicieux de penser à la conception de porphyrines métallisées de synthèse, plus simples, capables de catalyser de telles réactions dans des conditions bien définies (Figure 26). Ainsi, dans le but de valoriser les dérivés du pétrole ou encore d'obtenir des composés chiraux purs, intéressant l'industrie pharmaceutique, de nombreuses métalloporphyrines ont été imaginées pour catalyser des réactions sélectives, parmi lesquelles l'activation stéréospécifique d'une liaison C-H prochirale pour créer une liaison C-O ou l'époxydation asymétrique d'oléfines.[140]

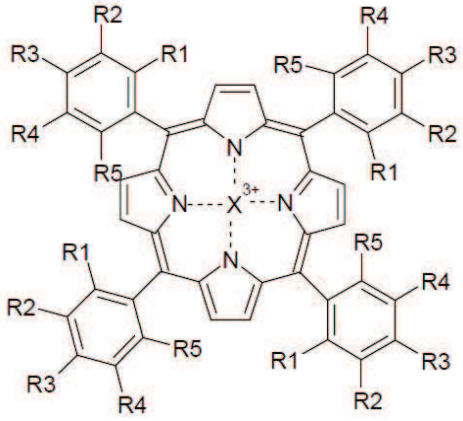


Figure 26 : Structure d'une métalloporphyrine. Ligand TDCPP : R1, R5 = Cl ; R2, R3, R4 = H ; X = Fe, Cu, Mn.

La nature des ligands présente une importance primordiale au niveau de la spécificité de substrat. De plus, l'hème étant très vite dégradé en milieu oxydant, la modification de son environnement direct par le greffage de composés halogénés le rend plus résistant vis-à-vis des dégradations oxydantes. Des porphyrines stabilisées au chlore (TDCPP) sont capables de supporter un nombre raisonnable de turnover, qui atteint 200 pour l'oxydation de l'heptane avec la porphyrine à manganèse Mn(TDCPP)Cl, et l'H_2O_2 comme oxydant (Tableau 2, entrée 19).[32] Toutefois, ni la régio-, ni la chimiosélectivité ne sont contrôlées, puisqu'un mélange d'alcools et de cétones, oxydées en positions 2- et 3- est obtenu en fin de réaction.

L'une des utilisations de métalloporphyrines les plus prometteuses est celle développée par l'équipe de Sorokin, qui a mis au point un catalyseur capable de fonctionner en conditions relativement douces.[33]

Des complexes ferriques binucléaires avec un ligand macrocyclique de type phtalocyanine ont été utilisés pour l'oxydation du méthane (Figure 27a). Ce catalyseur $(FePc^tBu_4)_2N$ est fixé sur un aérogel de silice par adsorption physique, et permet par l'action du peroxyde d'hydrogène de créer une espèce oxo-ferrique active de haute valence (Figure 27b).

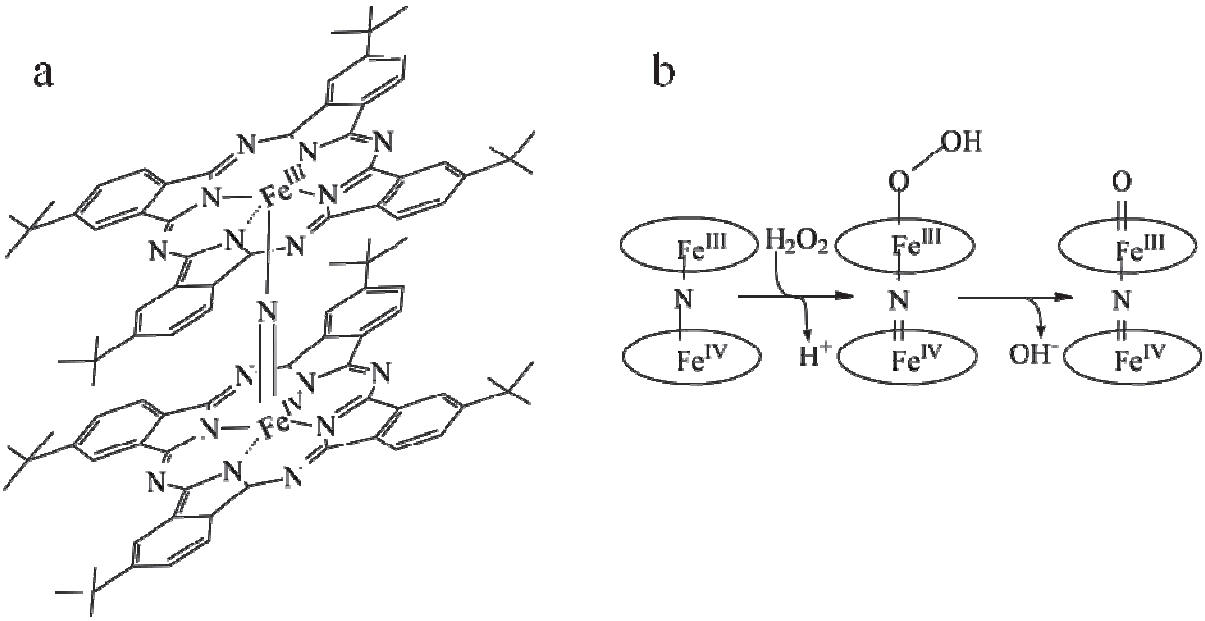


Figure 27 : Structure de la métalloporphyrine de synthèse développée par Sorokin et son mécanisme d'activation. (a) Complexe μ-nitrido diiron phthalocyanine : les deux atomes de fer (état d'oxydation +3,5 sont liés par un azote ; (b) Mécanisme proposé pour la formation de l'espèce oxo-ferrique à haute valence dans le système $(FePc^{t}Bu_4)_2N\text{-}SiO_2\text{-}H_2O_2$ (adapté de Kudrik *et al.,* 2008).[141]

Ce complexe est capable d'oxyder le méthane à 40 °C dans l'eau (Tableau 2, entrée 20). Les études ont montré qu'il n'est pas plus actif à des températures plus élevées. Par contre, l'augmentation de la température favorise la suroxydation.[33] Dans le cadre de l'oxydation des alcanes linéaires, ce catalyseur non enzymatique est à ce jour le seul capable de fonctionner en milieu aqueux.

La réactivité de la liaison C-H du méthane étant moindre que celles des alcanes à chaîne moyenne, son oxydation en méthanol fait de cette réaction une des plus stimulantes d'un point de vue fondamental.

1.4.3.2 Complexes non hémiques

Les espèces actives de fer non hémiques sont fréquemment décrites comme intermédiaires clés dans le cycle catalytique de systèmes biologiques impliqués dans l'activation de l'O_2.[39] Une autre approche de catalyseur biomimétique s'inspire donc du site actif des monooxygénases à fer non hémique (MMO). Plusieurs types de complexes synthétiques non hémiques ont prouvé leur capacité à activer le dioxygène,[39,142–144] mais aucun exemple d'oxydation des alcanes linéaires en conditions douces n'a été rapporté à ce jour.

Le fer complexé au ligand BPMEN (*N,N'*-bis(2-pyridylméthyl)-*N,N'*-diméthyl-1,2-diaminoéthane, Figure 28a) a permis d'oxyder le cyclohexane en présence de H_2O_2. Ce ligand gouverne la reconnaissance du substrat et son orientation vers le site catalytique. La

chimiosélectivité de Fe^{II}-BPMEN/H_2O_2 est de 88 % pour le cyclohexanol, avec un TON de 6,3, ce qui reste toutefois relativement faible.[144,145]

L'énergie de dissociation de la liaison C-H du cyclohexane (94 kcal/mol) étant similaire à celle des carbones secondaires des alcanes linéaires (94,6 kcal/mol),[1] il est probable que ce catalyseur soit capable d'oxyder ce type de substrats. Cette hypothèse est confirmée par la simulation de la réaction avec le fer complexé au ligand TPA (tris(2-pyridylméthyl)amine, Figure 28b), qui montre que la rupture de la liaison C-H du carbone secondaire du propane est théoriquement possible.[146]

(a) (b)

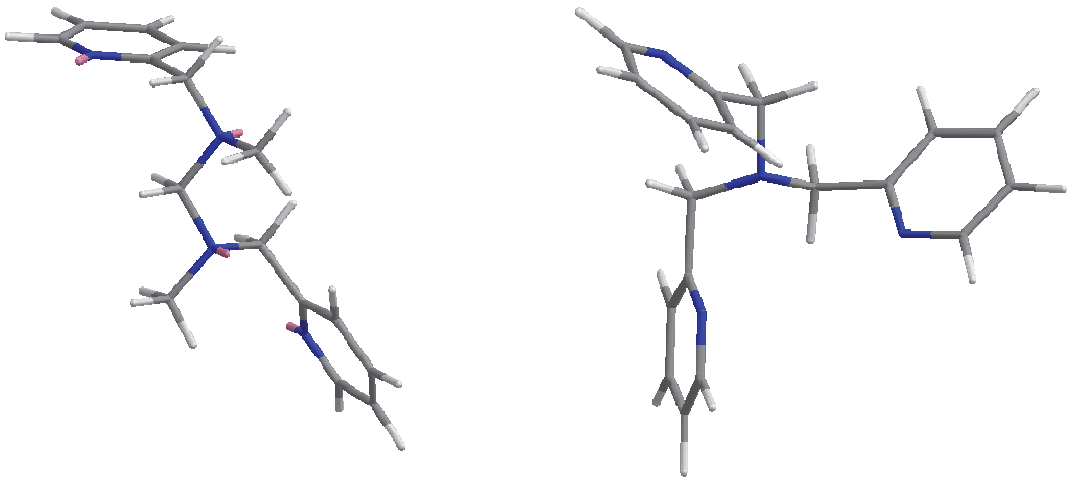


Figure 28 : Représentation tridimensionnelle des ligands BPMEN (a) et TPA (b).

1.4.4 Conclusion sur les catalyseurs chimiques

Plusieurs types de catalyseurs chimiques permettent l'oxydation des alcanes aliphatiques. Les plus efficaces sont inspirés des enzymes et utilisent des métaux de transition comme centre actif. La sélectivité peut être contrôlée en utilisant différents types de ligands afin d'optimiser leur encombrement et d'orienter le substrat vers le site métallique. Il a été observé que les ligands les plus encombrants augmentent la formation de produits oxydés à partir d'alcanes, les contraignant à se lier plus près du site catalytique.[147] La chimiosélectivité quant à elle peut être maitrisée en fonction de la puissance de l'oxydant choisi. Malgré tout, les produits d'oxygénation des alcanes étant plus réactifs que l'alcane lui-même, le contrôle de la chimiosélectivité reste toujours un problème majeur. De nombreux efforts ont été consacrés à l'augmentation de la stabilité des différents catalyseurs, qui doivent rester robustes dans les solvants utilisés pour les réactions d'oxydation (dichlorométhane, acétonitrile). L'immobilisation ou le greffage d'halogènes peuvent rendre le catalyseur plus résistant face

aux dégradations oxydantes, mais l'utilisation du chlore reste non idéale du fait de sa toxicité pour l'environnement.

Cependant, ces différents procédés nécessitent un apport considérable d'énergie, et montrent une sélectivité amoindrie par rapport aux systèmes naturels que sont les cytochromes P450. De plus, aucune des métalloporphyrines de synthèse ne permet l'hydroxylation par l'oxygène moléculaire, du fait de la difficulté à copier le cycle catalytique d'oxydation du P450 par l'O_2, qui demande un couplage efficace entre les étapes de transfert d'électrons et de protons. Il faut aussi retenir qu'à l'exception du catalyseur $(FePc^tBu_4)_2N$ développé par l'équipe de Sorokin,[33] aucun catalyseur chimique n'est capable de fonctionner en milieu aqueux. La plupart des réactions présentées ici utilisent l'acétonitrile comme solvant, composé nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.[148]

L'approche biomimétique est prometteuse, puisqu'il est possible de jouer sur le choix du métal, ainsi que sur la nature et l'encombrement du ligand, afin de guider la molécule de substrat au plus près du centre catalytique. Les études se dirigent vers des procédés plus propres, en favorisant l'utilisation de l'oxygène moléculaire comme oxydant, les milieux aqueux, et des métaux de transition non toxiques et peu coûteux tels que le fer ou le cuivre.

Enfin, à ce jour, aucun catalyseur chimique ne permet d'hydroxyler de manière à la fois chimiosélective et régiosélective les *n*-alcanes.

1.5 Objectifs de la thèse

Depuis quelques années, on assiste à une évolution de la chimie traditionnelle, qui s'oriente vers des procédés plus propres et moins gourmands en énergie. Afin de répondre aux principes de la chimie verte, nous nous sommes orientés vers le développement d'un système enzymatique. Les liaisons C-H des alcanes peuvent être fonctionnalisées par des monooxygénases, telles que les cytochromes P450, les alcanes hydroxylases AlkB, les méthanes monoxygénases et certaines peroxydases (APO).

Bien que présentant des activités remarquables, les méthanes monooxygénases et les alcanes hydroxylases ne sont pas idéales pour des applications synthétiques car elles sont multi-composantes. Leur expression et leur purification sont donc plus compliquées que pour un système composé d'une seule protéine. De plus, les pMMO et les AlkB sont membranaires et ne sont donc pas solubles. La peroxydase APO1_AaP présente une activité intéressante pour l'hydroxylation terminale du butane. Par ailleurs, elle ne nécessite pas l'apport de cofacteur et est soluble. Elle semble donc satisfaire les nombreuses exigences requises du biocatayseur

idéal, bien que l'utilisation du peroxyde d'hydrogène soit plus contraignante que celle de l'oxygène, puisqu'il est moins stable et donc plus difficile à transporter et à stocker. Nous aurions donc pu retenir cette enzyme, mais sa caractérisation n'a été publiée qu'en juillet 2011, soit environ deux ans après le début de cette thèse.

Les cytochromes de la famille des CYP153 sont naturellement capables d'hydroxyler les alcanes linéaires à chaîne moyenne (C_6 à C_{12}) de manière sélective, et sont solubles. Toutefois, leur activité est relativement faible. Ceci est lié à la nécessité d'apport d'électrons par un partenaire rédox : le transfert d'électrons est souvent lent, et la perte d'électrons combinée à la faible stabilité du biocatalyseur conduisent à une activité réduite. Nous avons donc fusionné un cytochrome de la famille des CYP153 et la partie réductase du cytochrome P450RhF. Notre stratégie de fusion, l'expression et la caractérisation de cette enzyme sont présentées dans le chapitre suivant (chapitre 2). Les tests catalytiques, ainsi que l'optimisation des conditions opératoires sont développés dans les chapitres 3, 4 et 5. La partie expérimentale et les références bibliographiques apparaissent en fin de ce manuscrit.

CHAPITRE 2. EXPRESSION ET CARACTERISATION DE CYTOCHROMES P450 AUTONOMES

Plusieurs membres de la famille CYP153 possèdent des caractéristiques prometteuses pour l'hydroxylation régiosélective des alcanes linéaires. Ces enzymes sont solubles et présentent une forte activité sur les alcanes linéaires à chaîne moyenne, en particulier sur l'hexane, l'octane ou le décane.[12] De plus, leur excellente régiosélectivité pour le carbone terminal et leur chimiosélectivité en font des catalyseurs de choix. Toutefois, leur application synthétique reste problématique du fait qu'ils nécessitent des partenaires rédox et ne sont donc pas autonomes. Ces partenaires n'étant pas toujours identifiés, et leur utilisation en système reconstitué pouvant être limitée par une interaction non optimale,[102] le projet de fusion entre CYP153A13a et P450RhFRed permettrait de conserver les spécificités du cytochrome (gamme de substrat, régiosélectivité, chimiosélectivité), en s'affranchissant de ses limites, par la création d'un système autonome.

Les travaux préliminaires ont été réalisés à l'échelle génétique et concernent la stratégie de fusion des gènes, ainsi que le choix du vecteur et du système d'expression. La suite des travaux se rapporte à l'échelle cellulaire et s'est attachée à étudier l'expression de la protéine de fusion entre le cytochrome CYP153A13a et la partie réductase de P450RhFRed, nommée A13red, en fonction de plusieurs paramètres concernant la culture et la purification. L'enzyme de fusion a pour finir été caractérisée et sa partie oxydase modélisée. Les détails expérimentaux sont reportés en fin de manuscrit.

2.1 Stratégie de fusion

A l'état natif, la partie réductase du P450RhF est fusionnée en N-terminal de la partie hydroxylase, laissant la partie C-terminale de la réductase libre.[15,16] Par conséquent, il paraît logique d'effectuer la fusion en respectant la configuration naturelle de P450RhF. De plus, plusieurs travaux montrent que la présence du tag histidine en C-terminal de la partie réductase mène à une forme non active de la protéine. Ces travaux ont par ailleurs mis l'accent sur le rôle essentiel que joue la partie C-terminale dans le transfert d'électrons.[16,114] L'importance de la longueur du polypeptide reliant les deux domaines a aussi été démontrée. Le nombre d'acides aminés le composant influencerait l'expression de la protéine ainsi que son repliement, et pourrait mener à une mauvaise conformation du complexe cytochrome-réductase.[80] Ainsi, la protéine de fusion A13red conserve le peptide de liaison présent dans P450RhF natif, et respecte une longueur de 27 acides aminés (Figure 29).

Figure 29 : Schéma de la construction de la protéine de fusion A13red de 820 acides aminés, montrant les différents domaines : P450 hydroxylase (en vert) fusionné en C-terminal avec la partie réductase de P450RhF (en rouge). L'étiquette histidine est située du côté N-terminal.

2.2 Choix du vecteur et de la souche

E. coli est communément utilisée pour l'expression hétérologue de P450, car sa croissance est rapide, son système génétique est bien connu et elle ne contient pas de P450 endogène. Parmi les nombreux systèmes d'expression de P450 testés dans la littérature, la combinaison du plasmide pET28a avec la souche BL21(DE3) a déjà prouvé son efficacité.[149] Le choix de la souche bactérienne a donc été porté sur *E.coli* BL21 Star^{TM}(DE3). Celle-ci permet la surexpression de protéines recombinantes non toxiques, et possède le lysogène lambda DE3 qui exprime l'ARN polymérase T7 sous contrôle du promoteur *lacUV5,* inductible par l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Sa combinaison avec le plasmide pET28b, contenant un gène de résistance à la kanamycine et le promoteur T7, permet d'exprimer la protéine recombinante (pour plus de détails consulter la Figure 68 de la partie expérimentale). Le gène d'intérêt peut être cloné en amont ou en aval d'une étiquette histidine, qui facilitera la purification de la protéine. La présence du tag histidine en C-terminal de la protéine de fusion menant à une forme non fonctionnelle,[114] le gène a été inséré en aval de l'étiquette. Les détails du clonage sont présentés au paragraphe II.1.2, II.1.3, et II.1.4 de la partie expérimentale.

2.3 Optimisation des conditions d'expression de A13red

Le rendement en protéines A13red dépend de deux facteurs. Le premier consiste en l'obtention d'une quantité suffisante de biomasse, alors que le deuxième est relatif à la qualité des protéines exprimées (solubles et fonctionnelles). La souche bactérienne, le mode de culture (flasque ou fermenteur), le milieu peuvent influencer la quantité de biomasse, alors que les paramètres d'induction, la température de culture, l'oxygénation, et la présence de protéines chaperonnes peuvent impacter la solubilité et la fonctionnalité de la protéine.

2.3.1 Culture en flasque

2.3.1.1 Conditions standard

Les premiers tests de croissance bactérienne et d'expression ont été réalisés avec la souche BL21 Star^{TM}(DE3). Les conditions standard de culture sont reportées sur l'organigramme de la Figure 30, et détaillées dans la partie expérimentale au paragrpahe II.2. Ces conditions ont été fréquemment rapportées dans la littérature pour la production de P450 recombinants en système pET et permettent un niveau d'expression pouvant atteindre jusqu'à 120 mg/L de culture.[149]

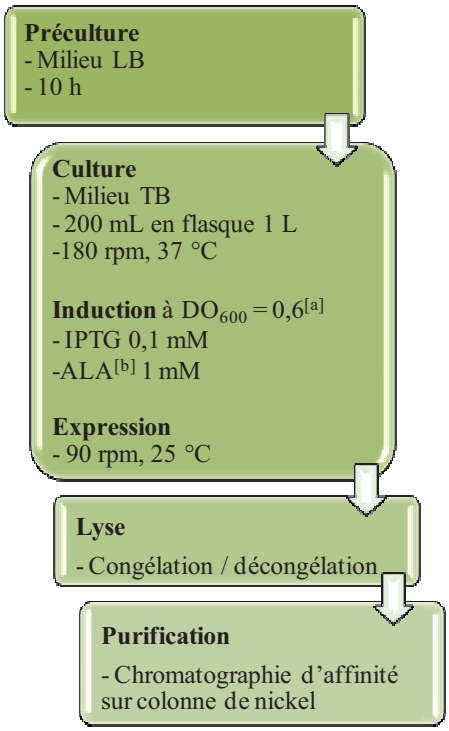


Figure 30 : Organigramme des conditions standard d'expression et de purification de A13red. [a] DO_{600} = densité optique à 600 nm. Elle est proportionnelle à la densité cellulaire dans l'échantillon (voir II.3, partie expérimentale). [b] ALA : acide aminolévulinique, précurseur du noyau hème.

Dans ces conditions, la surexpression d'A13red sous forme soluble est faible (10 mg/L de culture) et la protéine est synthétisée à 90 % sous forme de corps d'inclusion. L'insolubilité des protéines recombinantes est un phénomène courant chez *E. coli* et a été rapporté pour de nombreuses protéines. Il est le plus souvent lié à un mauvais repliement de la chaîne peptidique, engendrant une exposition des zones hydrophobes qui s'agrègent entre elles et adhèrent à la membrane.[150] Sous cette forme, les protéines ne sont pas fonctionnelles.

Les tests présentés dans cette partie s'attachent à augmenter d'une part le niveau d'expression de la protéine et d'autre part à améliorer sa solubilité. L'influence des paramètres d'induction (concentration en IPTG, densité cellulaire au moment de l'induction), de la température

d'expression, de l'ajout d'acide aminolévulinique (ALA), ainsi que de la souche d'*E. coli* ont été étudiés.

2.3.1.2 Paramètres d'induction

La densité cellulaire optimale à atteindre pour induire l'expression dépend de la souche bactérienne, du système d'expression, et de la protéine recombinante. Les différents travaux avec BL21(DE3) exprimant un P450 en système pET induisent l'expression à une DO_{600} comprise entre 0,6 et 1.[20,113,114] Afin de comparer l'influence de la phase de croissance dans laquelle se trouvent les bactéries avant l'induction, trois cultures ont été réalisées en parallèle. La première a été induite au début de la phase exponentielle de croissance (DO_{600} de 0,4), tandis que les deux autres ont été induites respectivement en milieu et en fin de la phase exponentielle de croissance (DO_{600} de 0,6 et 1). Les différentes phases de croissance bactérienne sont détaillées dans la partie expérimentale (paragraphe II.2.1)

La comparaison des trois essais a montré que le rendement protéique final est meilleur lorsque l'induction à lieu à une DO_{600} de 1. Elle permet d'atteindre une quantité plus importante de bactéries, et donc d'accumuler plus de protéines A13red. Toutefois, pour chacun des trois essais, la majeure partie est synthétisée sous forme de corps d'inclusion (environ 90 %). Il convient d'ajouter que la synthèse commence même en l'absence d'IPTG. Ce type de fuite du promoteur, qui engendre une expression non contrôlée, est couramment observée chez *E. coli* BL21(DE3), et est problématique puisqu'avant l'induction, les paramètres de culture ne sont pas adéquats pour l'expression (haute température : 37 °C et forte agitation : 180 rpm). Des souches bactériennes possédant les plasmides pLysS ou pLysE ont été créées pour pallier ce type de problème. Le plasmide possède le gène d'un inhibiteur de l'ARN polymérase T7 (le lysozyme T7). L'utilisation de ces souches permettrait de supprimer l'expression basale du promoteur et de contrôler le début de l'expression de A13red.

Une étude précédente de l'équipe d'Urlacher, utilisant le même système pET pour la production de P450 recombinants avait déterminé une concentration optimale en IPTG de 0,5 mM.[121] La concentration en IPTG de 0,1 mM a donc été augmentée à 0,5 et 1 mM. Au niveau de l'expression, aucune différence significative n'a été observée entre les trois concentrations testées, la concentration de 0,1 mM a donc été conservée pour la suite des expériences.
La solubilité des protéines hémiques peut aussi être améliorée en diminuant la température pendant la phase d'expression.[151] Une température de 20 °C permettrait un repliement plus

lent et une meilleure incorporation du noyau hème. La diminution de la température d'expression à 20 °C (au lieu de 25 °C) n'a pas permis d'augmenter de manière significative la solubilité de la protéine, évaluée par SDS-PAGE. La température de 25 °C a donc été conservée, puisqu'elle permet une croissance bactérienne plus rapide, et par conséquent la production d'une quantité plus importante de bactéries et donc de protéines.

2.3.1.3 Apport complémentaire d'acide δ-aminolévulinique

Dans le cadre de la production de protéines hémiques recombinantes, l'incorporation du noyau hème au sein de l'apoprotéine est souvent limitante.[152] Des travaux ont montré que l'enrichissement du milieu de culture en acide δ-aminolévulinique (ALA), précurseur dans la biosynthèse du noyau hème, peut conduire à l'augmentation du niveau d'expression de ce type de protéine.[152,153] Dans le cas de A13red, aucune augmentation significative n'a été observée lors de l'addition d'ALA à une concentration de 1 mM. L'effet semble être variable selon les enzymes : sur dix cytochromes de la famille 2C, l'équipe de Richardson a démontré l'augmentation de l'expression de sept P450 d'un facteur 2 à 10 tandis qu'aucun effet n'a été observé sur les trois derniers.[154] Une recherche plus approfondie concernant les voies de synthèse de l'hème tend à confirmer ce résultat. La régulation de la synthèse de l'hème n'est pas entièrement décodée mais semble être couplée à la formation de l'apoprotéine. De plus, l'accumulation de l'hème n'est pas tolérée par la cellule, ce qui sous-entend un rétrocontrôle négatif régulé par la quantité d'hème.[155] Ainsi, même si l'ajout d'ALA augmente la concentration d'intermédiaires porphyriques dans la cellule, d'autres facteurs entrent en jeu dans la biosynthèse de l'hème et la seule addition d'ALA dans le milieu n'est parfois pas suffisante pour en augmenter la production.[156,157]

2.3.1.4 Induction de l'expression de protéines chaperonnes

Lors de la surexpression de protéines recombinantes chez *E. coli*, le phénomène d'agrégation a été très documenté dans la littérature.[158] La co-expression de protéines chaperonnes constitue une stratégie permettant d'augmenter la quantité de protéines solubles. Les protéines de choc thermique (Hsp pour heat shock protein) sont capables d'interagir avec les protéines pas ou mal repliées, et favorisent leur repliement correct en une forme fonctionnelle. La technique la plus couramment utilisée est la co-transformation de la bactérie avec des plasmides possédant les gènes de différentes protéines chaperonnes,[159,160] mais l'expression de ce type de protéines, dont certaines sont endogènes à *E. coli*, peut aussi être induite plus simplement par l'ajout d'alcool benzylique.[161] Cette deuxième technique permet de co-

exprimer les Hsp à un niveau similaire à la méthode de co-transformation. Elle a été mise en œuvre par l'ajout de 10 mM d'alcool benzylique 20 minutes avant l'induction, afin de laisser le temps à la bactérie de produire les molécules chaperonnes. Toutefois, dans notre cas, elle n'a pas permis d'augmenter la quantité de protéines solubles.

L'effet de l'alcool benzylique est variable selon les protéines, et peut ne pas être significatif.[161] Dans ce cas, la co-transformation de la bactérie par un cocktail de plasmides permettant d'exprimer de manière contrôlée plusieurs protéines chaperonnes pourrait être bénéfique.[162] Il est aussi possible que l'ajout de l'alcool benzylique, 20 minutes avant l'induction, soit trop tardif, du fait de la fuite du promoteur, qui induit l'agrégation des protéines dès le début de la culture.

2.3.1.5 Toxicité de A13red pour la souche BL21.

Face à la productivité relativement faible de la protéine d'intérêt dans BL21 Star^{TM}(DE3), l'hypothèse selon laquelle la protéine surexprimée serait toxique pour la bactérie a été émise. La toxicité d'une protéine pour un type de souche donné peut facilement être mise en évidence en étudiant la vitesse de croissance bactérienne, qui sera alors ralentie. Pour le vérifier, la croissance de BL21 a été comparée à celle de la souche d'*E. coli* C41(DE3) contenant le même plasmide, ainsi qu'à celle de BL21 non transformée. La souche C41, dérivée de BL21, possède des mutations qui favorisent la surexpression de protéines toxiques pour la cellule.[163] Les vitesses de croissance des trois souches étant similaires, A13red ne semble pas être toxique pour la souche BL21 Star^{TM}(DE3).

De manière intéressante, l'analyse des fractions solubles et insolubles après la lyse des bactéries montre une légère différence au niveau de la qualité d'expression de A13red. La fraction soluble paraît plus importante dans C41(DE3) avec environ 20 % de forme soluble contre 10 % dans BL21. L'augmentation de la solubilité, suite à un changement de souche a largement été rapportée dans la littérature et est dépendante de chaque protéine.[164] La poursuite des études a été réalisée avec la souche C41(DE3).

2.3.2 Culture en conditions contrôlées

L'utilisation de fermenteurs pour la culture cellulaire permet d'en assurer la reproductibilité, par le contrôle et le suivi des différents paramètres.[165] De plus, il permet de cultiver dans un volume plus important qu'en flasque, et d'atteindre de plus hauts rendements en masse de bactérie par litre de culture.

Trois types de fermentations sont possibles : en batch, en fed-batch et en continu. Le procédé batch implique une croissance des microorganismes dans une quantité fixe de milieu, sans apport additionnel de nutriments. La croissance s'arrête lorsqu'un des composés devient limitant. Au contraire, le fed-batch et le continu permettent l'apport contrôlé et continu des nutriments. En limitant et contrôlant l'apport de la source de carbone, ils permettent d'atteindre de fortes concentrations bactériennes en phase exponentielle de croissance, et de minimiser l'utilisation du carbone pour la synthèse de produits secondaires.
Une première expérience en mode batch a été réalisée, et sera présentée dans cette partie. Cette approche a pour but de tester différents milieux de culture, et de déterminer l'effet de l'aération sur la production de A13red. Les paramètres de culture déterminés en flasques ont servi de base pour les essais en fermenteurs.

2.3.2.1 Milieux de culture

Le milieu de culture doit être choisi en fonction de la souche bactérienne, et peut aussi influencer la synthèse de la protéine recombinante. Un milieu complexe de type Terrific Broth (TB), Luria Bertani (LB) ou Yeast Tryptone (2YT) apportera les sources de carbone et les nutriments essentiels pour leur croissance, mais favorisera le fonctionnement simultané de plusieurs voies du métabolisme, et donc l'utilisation de l'énergie, autrement dit de la source de carbone, pour la production de nombreuses protéines intrinsèques et de produits secondaires. A l'inverse, en milieu synthétique, les quantités de carbone et de nutriments apportés sont rigoureusement contrôlées. La fermentation dans ce type de milieu est par conséquent facilement maîtrisable.[166] Le milieu doit donc être choisi de manière à ce qu'il permette une croissance rapide tout en obligeant la bactérie à optimiser sa consommation de carbone pour la production de la protéine recombinante.

Deux milieux riches (TB et 2YT) et un milieu synthétique (FB) ont été testés. Le milieu TB est fréquemment employé pour la production de P450 recombinants.[30,167,168] Il contient plusieurs sources de carbone, dont le glycérol, rapidement métabolisable.[151] Par ailleurs, le milieu 2YT est conseillé pour la culture de la souche C41(DE3). En milieu synthétique FB, deux sources de carbone, le glucose et le glycérol (à des concentrations de 5 g/L) ont été comparées. Le glucose est la source de carbone la plus communément utilisée, du fait de son faible coût, de son assimilation rapide par *E. coli,* lui permettant un taux de croissance plus élevé que le glycérol. Toutefois, lorsque son apport n'est pas contrôlé, le taux de croissance dépasse un certain seuil et déclenche la production d'acide acétique, qui inhibe la synthèse

protéique.[169] Le glycérol, quant à lui, est assimilé plus lentement par la cellule. Par conséquent, le flux de carbone utilisé pour la glycolyse est réduit, ce qui diminue la quantité d'acide acétique produit.[166]

La qualité des milieux a été évaluée selon deux critères : la vitesse de croissance d'*E.coli* (et donc la quantité de biomasse obtenue en un temps donné), ainsi que sa capacité d'expression (aspects qualitatif et quantitatif conjugués) (Tableau 6).

	Conditions	Milieux	$G^{[1]}$ (min)	$\mu^{[2]}$ (h^{-1})	Biomasse $g_{(CDW)}.L^{-1}$	$c_{P450}{}^{[3]}$ $nmol_{P450}.L^{-1}$	$p_{P450}{}^{[3]}$ $nmol_{P450}.g_{(CDW)}{}^{-1}$
1	Fermenteur	TB	26	1,6	5,9	23,6	4
2	Fermenteur	2YT	38	1,1	2,2	0,4	0,2
3	Fermenteur	FB + Gly	100	0,4	1,8[4]	n.m.[5]	n.m.
4	Fermenteur	FB + Glu	52	0,8	1,2[4]	n.m.	n.m.

Tableau 6 : Effets du milieu sur la culture et l'expression de A13red dans C41(DE3). TB = Milieu Terrific Broth contenant 10 g/l de glycérol ; 2xYT = Milieu Yeast Tryptone 2x ; FB = Milieu synthétique contenant 5 g/l de glucose ou glycérol. Conditions : 350 mL de culture en fermenteur de 1 L, 300 rpm, air flow = 1 vol / vol cult / min, 37 °C jusqu'à DO_{600} = 0,6 puis induction avec 0,1 mM IPTG. Expression : 300 rpm, 25 °C, 21 h de temps d'expression, pH régulé à 7,4. [1] G : Temps de génération ; [2] μ : taux de croissance ; [3] [P450] déterminé par CO-binding après purification (voir paragraphe II.8 de la partie expérimentale) ; [4] La source de carbone a été épuisée avant l'arrêt de la culture : au bout de 15h30 pour le glucose et 19h pour le glycérol ; [5] non mesurable.

La composition du milieu influence fortement la vitesse de croissance d'*E.coli*. Les paramètres G et μ, déterminés en phase exponentielle de croissance, donnent respectivement le temps de génération (durée nécessaire au doublement de la population), et le taux de croissance (nombre de doublement par heure). La croissance est plus rapide en milieu TB, avec un doublement toutes les 26 minutes, comparée au milieu 2YT (toutes les 38 minutes). La croissance en milieu synthétique est plus lente, avec un doublement toutes les 100 minutes en milieu FB supplémenté en glycérol et toutes les 52 minutes pour le glucose (Tableau 6, entrées 3 et 4). Le glycérol étant assimilé plus lentement que le glucose, il est logique que la vitesse de croissance soit ralentie.

Le temps de génération est directement proportionnel au taux de croissance (μ). Ce dernier paramètre est plus fréquemment rencontré dans la littérature, et a donc été calculé à titre comparatif. Le taux de croissance varie d'un facteur 2 selon si la source de carbone est le glucose (0,8 h^{-1}, entrée 4) ou le glycérol (0,4 h^{-1}, entrée 3). Ce même facteur a été rapporté dans la littérature pour *E. coli* non recombinante.[170] Un taux de croissance largement inférieur (0,06 h^{-1}) a quant à lui été rapporté pour *P. putida* exprimant CYP153A13.[12]

Les paramètres G et μ sont proportionnels à la quantité de biomasse obtenue pour des temps de culture identiques. Ainsi, le milieu TB permet de récupérer une quantité de bactéries près de trois fois plus importante (6 g de cellules sèches par litre de culture) qu'en milieu 2YT. La croissance en milieu synthétique FB a été limitée par la consommation de la totalité du glucose et du glycérol, au bout de 15h30 et 19h de culture, respectivement. La quantité de biomasse obtenue est donc sous estimée par rapport à celle qui aurait pu être obtenue en conditions non limitantes de carbone. Malgré tout, il semble probable que la biomasse théoriquement récoltée en conditions non limitantes (et à temps de culture identiques) soit inférieure à celle en milieux complexes, du fait que le taux de croissance y soit plus bas.

L'analyse des rendements en P450 fonctionnels par litre de culture, et par gramme de cellules sèches, notés respectivement c_{P450} et p_{P450} (Tableau 6), met en évidence une nette variation du niveau d'expression fonctionnelle de A13red en fonction du milieu. Cette concentration est 60 fois plus importante en milieu TB (24 nmol/L de culture) qu'en milieu 2YT (Tableau 6, entrées 1 et 2). La protéine est synthétisée à un niveau très faible en milieux synthétiques, pour lesquels l'épuisement de la source de carbone a eu pour conséquence l'arrêt de la croissance. Ainsi, il est possible que le manque de carbone ait induit un mécanisme de survie chez la bactérie. En situation de carence, elle régule son métabolisme pour faire un maximum d'économie d'énergie. Pour cela, un système de dégradation de l'ARN lui permet de libérer des nucléotides, tandis que la protéolyse libère des acides aminés. Les nucléotides et les acides aminés peuvent alors être réutilisés ou à leur tour dégradés pour la production d'énergie.

2.3.2.2 Aération du milieu

Les rendements en enzymes fonctionnelles des essais en fermenteurs (Tableau 6, entrée 2) sont moins importants qu'en flasque (c_{P450} = 11,4 nmol. L^{-1} et p_{P450} = 10,3 nmol. $g_{(CDW)}^{-1}$, déterminés en conditions standard et milieu 2YT). Cette différence est souvent observée lors du transfert des paramètres déterminés en flasque vers le fermenteur,[153,171] et ce problème peut être résolu en adaptant le protocole de culture pour le procédé en fermenteur.

Un des paramètres non transposables entre la flasque et le fermenteur est la vitesse d'agitation, et donc l'aération. Lors du premier essai en batch en milieu TB, le taux d'oxygène apporté n'a pas été suffisant par rapport au nombre de bactéries présentes dans le milieu. Ainsi, au bout de 9 h de culture, la pression partielle en oxygène (pO_2) du milieu devient nulle ce qui indique que la biomasse est en anaérobie.

L'aération du milieu de culture est un paramètre important pour la croissance et l'expression.[164] Les travaux sur P450 BM-3 ont montré qu'une augmentation de l'agitation (de 180 à 200 rpm), et donc un fort taux d'oxygène dissout réduisait considérablement la quantité de P450 obtenus par litre de culture,[153] alors que le phénomène contraire a été observé pour $P450_{scc}$.[164] Ainsi, la variation du taux d'oxygène dissout entre la flasque et le fermenteur pourrait expliquer la diminution du rendement protéique.

2.3.2.3 Influence de la stabilité de la protéine sur le rendement

De manière générale, la concentration en A13red reste relativement faible par rapport aux rendements obtenus en procédés batch pour d'autres P450 exprimés dans *E. coli*. Par exemple, P450 BM-3 est produit à 400 nmol. L^{-1} en simple batch, après un temps d'expression de 5 h.[172] A la différence de P450 BM-3, le cytochrome CYP153A13 est très instable à l'état natif.[12] L'écart entre les rendements de cytochromes stables, tels P450 BM-3, et moins stables tels CYP153A13, était donc prévisible.

La fusion artificielle entre CYP153A13 et le domaine réductase a une forte probabilité d'augmenter la solubilité de la protéine.[173] Les seules données concernant A13 non fusionné, pouvant infirmer ou confirmer cette hypothèse, ont été calculées chez *P. putida*, avec un c_{P450} de 3,2 nmol de CYP153A13 par litre de culture, alors que nous avions obtenu 24 nmol / L de culture en milieu TB.[12] Toutefois, la différence de souche bactérienne utilisée rend difficile une quelconque comparaison.

2.4 Purification

La protéine de fusion A13red est synthétisée dans le cytoplasme d'*E. coli*. En fin de culture, les bactéries sont lysées et la fraction soluble est récupérée. Les protéines recombinantes, qui possèdent à leur extrémité N-terminale une étiquette hexahistine, sont purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel. Le principe de la chromatographie et les conditions de purification sont détaillés au paragraphe II.4 de la partie expérimentale.

2.4.1 Purification par chromatographie d'affinité

Les fractions soluble et insoluble du lysat sont séparées par centrifugation. Les protéines recombinantes His-taguées présentes dans la fraction soluble sont purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel. Les étapes de purification sont contrôlées

par gel SDS PAGE (Figure 31 et paragraphe II.6 de la partie expérimentale) et les protéines totales sont quantifiées par le test de Bradford (partie expérimentale, paragraphe II.5).[174]

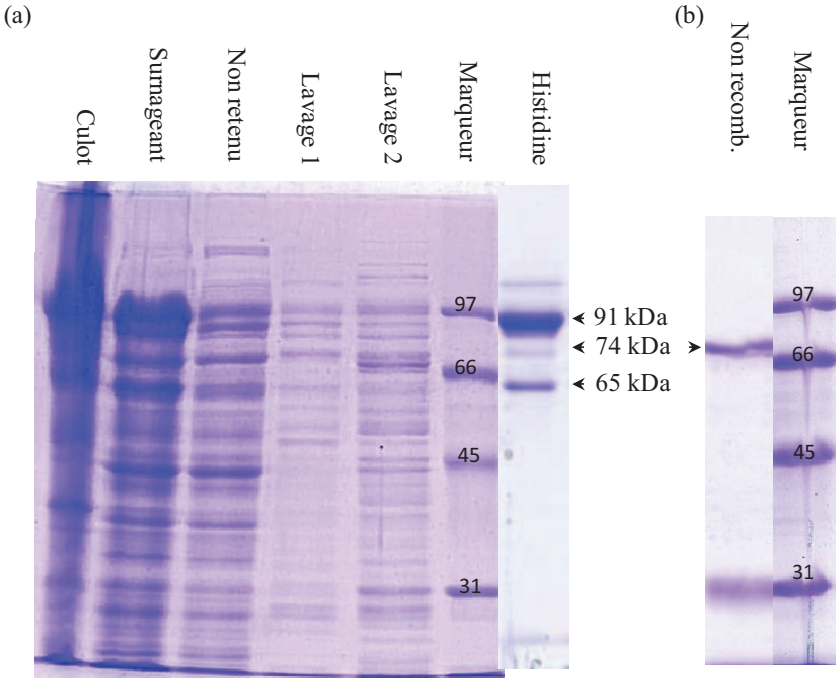


Figure 31 : Gel SDS PAGE des différentes fractions obtenues lors des étapes de purification de A13red après culture de BL21*(DE3) contenant le plasmide pETA13red. Les poids moléculaires des bandes du marqueur sont indiqués en kDa. Non recomb = *E. coli* non recombinante.

Outre les protéines nécessaires au métabolisme d'*E.coli*, le surnageant contient la protéine d'intérêt surexprimée (environ 10 % du total des protéines, Figure 31a : piste surnageant). Une quantité non négligeable de la protéine A13red est retrouvée dans le culot, et traduit la formation de corps d'inclusion (piste culot). La plus grande partie des protéines non taguées est ensuite éluée lors des différents lavages (pistes Non retenu, Lavage 1, Lavage 2).

Les premiers essais d'élution ont été effectués par une solution d'imidazole, mais les enzymes purifiées n'avaient pas d'activité. Les enzymes étant actives *in vivo* (tests de bioconversion mettant en œuvre les bactéries vivantes), l'hypothèse selon laquelle la purification par l'imidazole provoquerait une perte d'activité enzymatique a été testée : il a été remplacé par la L-histidine et une deuxième série de tests *in vitro* a été menée. La protéine purifiée est finalement active, et l'élution par l'histidine a donc été retenue. Lors de l'utilisation de l'imidazole, il semble que celui-ci entre en compétition avec le substrat et se lie avec le fer de l'hème, ce qui provoque un phénomène d'inhibition et rend la protéine inactive.[121,175]

L'analyse de la fraction enzymatique récupérée après élution à l'histidine montre trois bandes à 91, 74 et 65kDa (piste histidine). La première, plus intense, correspond à la protéine de fusion A13red, dont la taille attendue est de 91 kDa.

La bande à 74 kDa correspond à une protéine synthétisée par *E.coli* ayant une forte affinité avec la colonne (Figure 31b : la piste « non recombinante » montre la fraction enzymatique obtenue après culture, induction et purification de la même souche d'*E.coli* non recombinante et présente la même bande à 74 kDa). Cette complexation pourrait s'expliquer par un nombre important d'acides aminés histidines ou tryptophanes dans sa séquence. Afin de s'affranchir de cette contamination, des étapes de lavages ont été effectuées avec des concentrations plus fortes en histidine, dans le but de l'éluer de manière différée dans le temps par rapport à la protéine d'intérêt. Toutefois, quelque soit le gradient de concentration en L-histidine, les deux protéines sont éluées en même temps. Il semble donc qu'elles aient toutes deux la même affinité pour la colonne. Un essai de purification avec la thrombine, dont une séquence de reconnaissance a été insérée au sein du plasmide pET28b entre le tag histidine et le polylinker a été réalisé. La thrombine permet de cliver la protéine directement sur la colonne entre le tag histidine et la partie cytochrome, et de s'affranchir de l'étape d'élution par l'histidine. Cet essai n'a pas été concluant car il n'a pas permis de libérer les protéines. Ceci peut provenir des conditions d'action de la thrombine non optimales. En effet, la température d'action de la thrombine est de 25 °C, or le clivage a été effectué à 4 °C, afin de ne pas dénaturer A13red. Des investigations plus poussées permettront de déterminer un compromis de température afin de préserver la fonctionnalité de A13red tout en assurant l'action de la thrombine.

Enfin, la troisième bande à 65 kDa correspond à une protéolyse partielle de la protéine d'intérêt. Un site particulièrement sensible à l'action des protéases est certainement présent au sein de la séquence de la réductase. Un western blot réalisé avec un anticorps anti HisTag montre que les deux bandes à 91 et 65 kDa possèdent un tag histidine, et le séquençage de la seconde bande par spectrométrie de masse après extraction du gel et digestion trypsique montre qu'elle correspond bien au cytochrome CYP153A13a His-tagué, avec un indice de confiance de 72 %. L'ajout de l'inhibiteur de protéases phénylméthylsulfoxyde (PMSF) dans le tampon de lyse n'a pas empêché la protéolyse. D'autres inhibiteurs de protéases tels que le pefabloc (plus stable en milieu aqueux) ou le DFP pourraient être testés.

Des analyses par CO-binding ont été réalisées sur les différentes fractions de purification (culture en milieu TB). Le CO-binding permet de quantifier la forme fonctionnelle des P450 (voir paragraphe II.8 de la partie expérimentale). Dans la partie soluble non purifiée

(surnageant), le cytochrome est à 90 % sous forme non fonctionnelle. La majeure partie est éluée avec la fraction non retenue. Ceci peut s'expliquer par un mauvais repliement de l'enzyme qui empêcherait le tag histidine de se lier correctement à la colonne. Ainsi, la part de cytochrome fonctionnel récupérée dans la fraction d'élution avec l'histidine est nettement supérieure et représente entre 70 et 80 % du total des P450. Il est intéressant de noter qu'en milieu 2YT, cette forme fonctionnelle est plus faible et représente 62 % des P450 solubles purifiés. Certains composés présents dans le milieu TB pourraient donc influencer le repliement correct de l'enzyme de fusion.

Après purification, la fraction enzymatique purifiée est conservée dans un tampon phosphate pH 7,4 contenant 10 % de glycérol puis stockée à −80°C. Des tests de conservation dans différents tampons contenant des pourcentages variables de glycérol ont été réalisés. Il est apparu qu'à des concentrations en glycérol inférieures à 10 %, la protéine précipite lors de la décongélation. La concentration de la fraction enzymatique obtenue après purification varie entre 1 et 4 mg / mL. Les tests d'activité ont démontré que la protéine est toujours active après deux mois de congélation, et que son activité n'a pas diminué. La stabilité de la protéine n'a pas été testée au-delà de deux mois.

2.5 Généralisation du concept de fusion aux cytochromes A1 et A6 de la famille CYP153

2.5.1 Comparaison des cytochromes CYP153A1, A6 et A13a

Le concept de fusion avec la partie réductase a été élargi à deux autres cytochromes de la même famille que CYP153A13a : CYP153A1 issu d'*Acinetobacter calcoaceticus* (nommé A1) et CYP153A6 de *Mycobacterium* sp. HXN1500 (A6). Malgré leur appartenance à la même famille (chaque famille est définie par un pourcentage d'identité supérieur à 40 %), chaque membre possède des caractéristiques physiques, chimiques et biochimiques particulières (Tableau 7).

	A1	A6	A13a
Nombre de résidus	497	420	469
% Aliphatiques (GAVLI)	36	34	34
% Aromatiques (FWY)	9	8	9
% Basiques (KRH)	4	5	3
% Acides (DENQ)	15	13	15
Masse molaire (kDa)	53,3	47,7	56,6
Index d'hydropathie[a]	-0,267	-0,318	-0,459
pI théorique	pH 6,53	pH 4,94	pH 6,91
Activité sur l'octane (U/g CYP153)[12]	587	1222	2
% d'identité avec A13a	67	51	-

Tableau 7 : Propriétés physico-chimiques et catalytiques des cytochromes CYP153A1, A6 et A13a. [a]Plus l'index est négatif et plus la protéine est hydrophile.[176]

Leur pourcentage d'identité est relativement fort, avec 67 % entre A1 et A13, 51 % entre A6 et A13, et 54 % entre A1 et A6, et des compositions en acides aminés hydrophobes, basiques et acides comparables. Malgré ces similitudes, les activités des trois cytochromes varient fortement : l'activité spécifique de A6 sur l'octane est ainsi le double de celle de A1, et plus de 600 fois supérieure à celle de A13. Ces différences d'activité peuvent donc s'expliquer par la nature des résidus composant le site actif, mais aussi par leurs propriétés physiques variables : A1 possède 28 acides aminés de plus que A13a alors que A6 en présente 49 de moins du côté N-terminal. Fusionnés avec la réductase, leur masse molaire est donc de 95 kDa pour A1red, 87 kDa pour A6red et 91 kDa pour A13red. L'index d'hydropathie, qui illustre le caractère hydrophile ou hydrophobe de la protéine,[176] est négatif dans les trois cas, ce qui signifie que les trois protéines auront plutôt un comportement hydrophile. A13a serait le plus hydrophile, et A1 le moins. Le calcul théorique du point isoélectrique montre que dans les conditions expérimentales (pH 7,4), les trois protéines ont une charge globale négative. La fusion avec le domaine réductase ne change pas ces propriétés.

Compte tenu des variations entre les caractéristiques de ces trois cytochromes, on peut s'attendre à un comportement différent au niveau de leur expression. Les protocoles de culture devront donc être optimisés pour chacun d'eux. En plus d'élargir la gamme de substrats acceptés par ces enzymes, l'extension du concept à A1 et A6 pourra permettre une meilleure compréhension des relations entre la structure, les propriétés physico-chimiques, et l'activité de cette famille d'enzymes.

2.5.2 Clonage, expression et purification de A1red

Au niveau génétique, CYP153A1 a été introduit dans le vecteur pRed (contenant le gène de la partie réductase de P450RhF préalablement inséré). Le plasmide est nommé pETA1Red. Son séquençage met en évidence cinq mutations par substitution dans le gène : 135T>C, 438A>G, 503C>T, 623G>A, 842A>G. Les deux premières sont silencieuses, alors que les trois dernières entraînent les mutations A168V, G208E et K281R au niveau de la séquence protéique.

Les bactéries *E. coli* BL21 Star^{TM}(DE3) ont ensuite été transformées par pETA1Red, et la culture et l'expression ont été menées selon le protocole mis en œuvre pour A13red. Le temps de doublement bactérien (31 minutes) est du même ordre que ceux déterminés pour *E. coli* transformées par pETA13red et *E. coli* non recombinantes. La protéine de fusion A1red ne semble donc pas être toxique pour la cellule.
Les bactéries ont ensuite été lysées, et les protéines recombinantes libérées dans le surnageant ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (Figure 32).

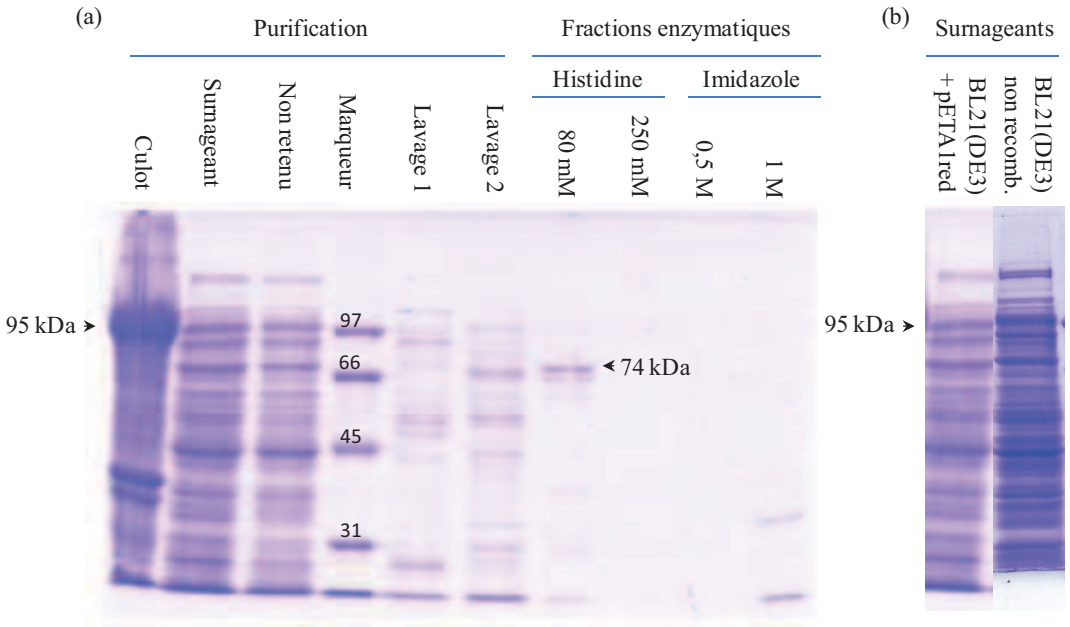


Figure 32 : Gel SDS PAGE des fractions obtenues lors des étapes de purification de A1red. Les poids moléculaires des bandes du marqueur sont indiqués en kDa.

La masse molaire attendue de la protéine A1red est de 95 kDa. L'analyse des fractions soluble (Figure 32a, piste surnageant) et insoluble (piste culot) montre que la totalité des protéines de fusion se retrouve dans le culot. Ce résultat suggère qu'elles se sont agrégées sous forme de corps d'inclusion, indiquant un mauvais repliement et une forme insoluble. Une bande à

environ 95 kDa dans le surnageant pourrait correspondre à A1red, mais il est aussi probable qu'il s'agisse d'une protéine endogène d'*E. coli*, visible aussi dans la fraction soluble issue de la souche non transformée (Figure 32b, profils des gels des bactéries transformées et non transformées similaires). Un western blot pourrait être mis en œuvre afin de vérifier cette hypothèse. De la même manière que pour A13red, la fraction d'élution avec 80 mM d'histidine présente une bande à environ 74 kDa qui correspondrait à une protéine endogène d'*E. coli* ayant une forte affinité avec la colonne.

Il apparaît clairement que l'ensemble des protéines recombinantes A1red est synthétisé sous forme de corps d'inclusion. Des essais de solubilisation à partir des corps d'inclusion, utilisant l'urée, n'ont donné aucun résultat. Différents paramètres du protocole de culture ont aussi été modifiés, afin de diminuer la formation des corps d'inclusion. Tout d'abord, la production de protéines chaperonnes a été induite par l'ajout d'alcool benzylique (10 mM) dans le milieu de culture, quelques minutes avant l'induction de la production de la protéine recombinante. Ensuite, la température a été abaissée à 20°C tout au long de la culture (au lieu de 37 puis 25 °C). Ces deux essais n'ont pas aboutit à la solubilisation des protéines. La méthode de lyse a aussi été modifiée, afin de s'assurer que les protéines ne restaient pas dans le culot à cause d'une mauvaise lyse des bactéries. Pour cela, trois cycles de congélation (dans l'azote liquide) / décongélation (à 25°C) ont été rajoutées avant la sonication. Les contrôles ont indiqué que la protéine ne s'était pas solubilisée dans le surnageant. La concentration en sels du tampon de lyse a également été diminuée, et 10 % de glycérol y ont été rajouté, afin de stabiliser les protéines et d'éviter leur agrégation. Toutes ces tentatives se sont révélées infructueuses. Une autre technique demanderait à être testée : l'ajout d'éthanol (3 %) dans le milieu de culture, qui pourrait aider à réduire la formation de corps d'inclusion.[177]

L'expression de A1red a été réalisée dans les mêmes conditions que A13red. Malgré leur fort pourcentage d'homologie, ces deux protéines possèdent des propriétés physiques différentes (pI, hydrophobie, taille). Le protocole de culture, d'expression et de purification doit donc être adapté spécifiquement à A1red. Ces études n'ont à ce jour pas été poursuivies, mais des moyens assez simples comme la modification du temps d'induction, ou encore de l'aération du milieu pourraient, dans un premier temps, être facilement mis en œuvre.

2.5.3 Clonage, expression et purification de A6red

De la même manière que pour A13red et A1red, le gène de CYP153A6 a été introduit dans le vecteur pRed, et le plasmide nommé pETA6Red. Une mutation par substitution a été décelée

au niveau génétique dans la partie cytochrome (1262C>T), qui introduit au niveau protéique la mutation P421L. Les cellules ont été mises en culture selon le même protocole que pour A13red. Leur temps de doublement est plus long (40 minutes), donnant un taux de croissance de 1 h^{-1}, qui laisse penser que la protéine A6red serait plus toxique pour la bactérie que A13red et A1red. Le passage de la souche BL21 Star^{TM}(DE3) à C41(DE3), idéale pour l'expression de protéines toxiques, n'a pas changé ce taux de croissance. Le surnageant récupéré après la lyse des bactéries a fait l'objet d'une purification par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (Figure 33). La masse molaire théorique de A6red est 87,1 kDa.

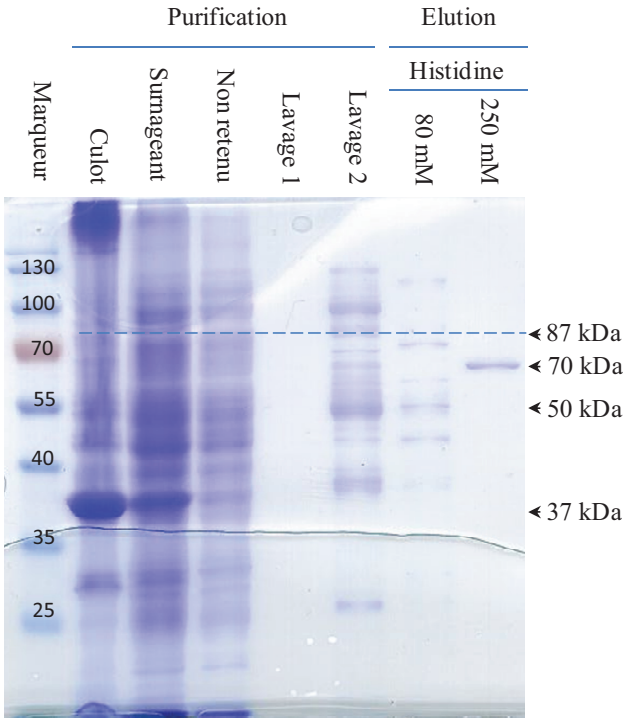


Figure 33 : Gel SDS PAGE des fractions obtenues lors des étapes de purification de A6red. Les poids moléculaires des bandes du marqueur sont indiqués en kDa. La ligne en pointillés indique le poids moléculaire attendu de A6red (87 kDa).

L'analyse par gel SDS PAGE ne permet de ne visualiser A6red ni dans le surnageant, ni dans le culot. Toutefois, une bande plus intense à environ 37 kDa y apparaît nettement, et pourrait correspondre à la partie réductase (masse molaire théorique : 35,6 kDa). Le lien peptidique situé entre la partie cytochrome et la partie réductase n'est pas protégé par l'environnement peptidique, il est donc plus vulnérable à la protéolyse. La protéine étant étiquetée histidine du côté de la partie cytochrome, la partie réductase n'a pas d'affinité avec la colonne et serait donc éluée lors des étapes de lavage (Figure 33, piste lavage 2). La bande à 50 kDa retrouvée dans les fractions « lavage 2 » et « histidine 80 mM » pourrait alors correspondre à la partie cytochrome, dont le mauvais repliement, du fait de conditions d'expression non optimales,

aurait pour conséquence une faible affinité avec la colonne. Une seule bande à 70 kDa est visualisée dans la fraction d'élution à l'histidine. Celle-ci est de taille semblable à celle qui apparaît dans les fractions d'élution des deux autres enzymes de fusion A13red et A1red (74 kDa). Il s'agit certainement là encore de la protéine endogène à *E. coli* dont la forte affinité avec la colonne empêche son élimination lors des différents lavages.

La protéine A6red n'est pas, ou très peu exprimée dans ces conditions de culture. Une mutation a pu apparaître au sein du plasmide, et par conséquent empêcher la synthèse correcte de A6red. Un séquençage du plasmide permettrait de s'en assurer. Il est aussi possible que l'expression de A6red soit inhibée par des conditions de culture non optimales. L'influence de paramètres tels que le milieu, l'aération, ou encore la température devrait être étudiée.

2.6 Caractérisation biochimique de A13red

Le prérequis pour la caractérisation des enzymes est leur expression sous forme soluble. Les enzymes de fusion A1red et A6red étant respectivement exprimée sous forme insoluble et pas exprimée, seule A13red a pu être caractérisée.

2.6.1 Caractérisation de la partie hydroxylase

Le repliement et la fonctionnalité des cytochromes sont déterminés par CO-binding. Cet essai est basé sur la réactivité de la forme fer (II) de l'hémoprotéine avec le monoxyde de carbone, qui forme un complexe dont le spectre montre un maximum d'absorption à 450 nm. La perte d'activité du cytochrome induit la diminution de l'intensité du pic à 450 nm et l'apparition d'un pic à 420 nm, représentatif de la forme non fonctionnelle (voir paragraphe II.8 de la partie expérimentale).[61]

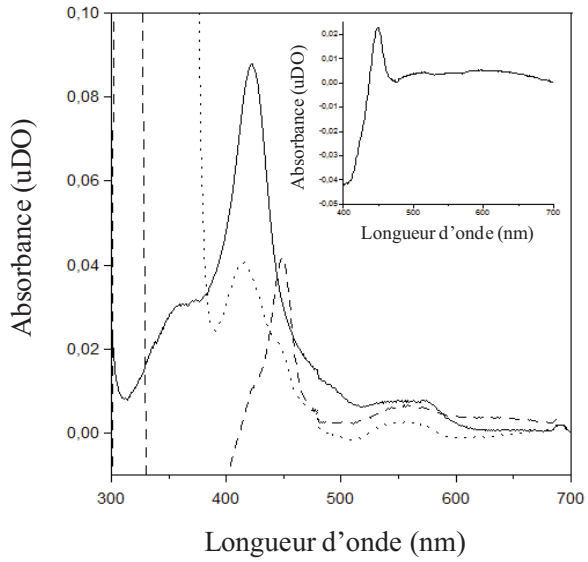


Figure 34 : Spectre UV-visible de A13red purifié. Trait plein : cytochrome oxydé - Pointillés : cytochrome réduit - Tirets : cytochrome réduit et complexé au monoxyde de carbone. Insert : spectre différentiel obtenu par soustraction du spectre du cytochrome réduit par le spectre du cytochrome réduit et complexé au monoxyde de carbone.

Le spectre UV-visible de A13red oxydé montre un pic d'absorption à 420 nm, caractéristique de l'état bas spin du fer (Figure 34). Ce maximum d'absorption indique que les propriétés électroniques du fer n'ont pas été perturbées par la fusion avec le domaine réductase. De plus, après réduction et complexation au monoxyde carbone, ce pic à 420 nm est déplacé à 450 nm. Ce résultat révèle une bonne incorporation hémique et un repliement correct du domaine hydroxylase. Ceci traduit l'expression fonctionnelle du gène de fusion. Etant donné que les domaines réductase et hydroxylase sont fusionnés, il est possible d'avancer que l'ensemble de la protéine de fusion est correctement replié. En effet, la dénaturation d'une partie de la protéine induit généralement la dénaturation de son ensemble.[173,178]

2.6.2 Caractérisation de la partie P450 réductase

Le repliement correct et l'activité de la partie réductase peuvent être contrôlés par un test spectrométrique.[179] Le cytochrome c est utilisé comme accepteur final d'électrons, car il possède des propriétés d'absorbance à 550 nm lorsqu'il est réduit, et n'est pas réoxydé à l'air (Figure 35, et paragraphe II.9 de la partie expérimentale).

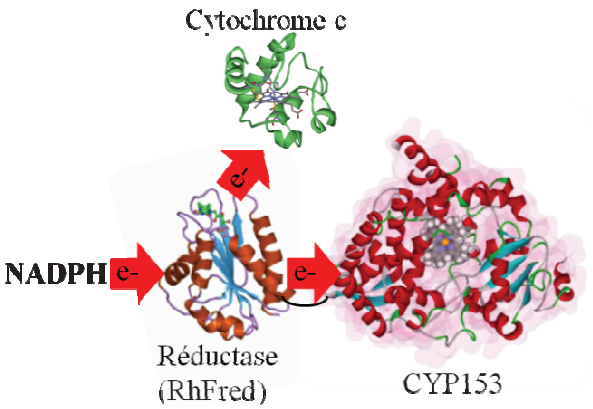


Figure 35 : Caractérisation de la partie P450-réductase : chaîne de transfert des électrons au sein du système A13red / cytochrome c.

Le suivi de la diminution de l'absorbance à 340 nm (due à la consommation du NADPH), combiné à celui de son augmentation à 550 nm (réduction du cytochrome c), permet une détermination directe de l'activité de la réductase (Figure 36).

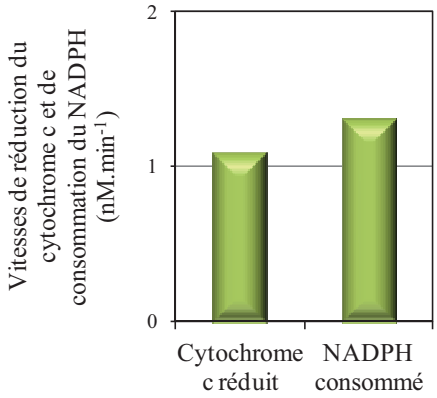


Figure 36 : Mesure des vitesses de réduction du cytochrome c et de consommation du NADPH, en l'absence d'alcane, de manière à ce que les électrons provenant du NADPH soient en totalité dirigés vers le cytochrome c.

La consommation du NADPH, combinée à la réduction du cytochrome c, témoignent de la fonctionnalité de la réductase. Dans le cas de A13red, deux accepteurs d'électrons sont présents dans le milieu (le cytochrome c et A13 fusionné). En l'absence de substrat, le fer du noyau hème de A13 ne passe pas à l'état haut spin et n'est pas prêt à accepter les électrons. Ils seront alors transférés préférentiellement au cytochrome c, présent en excès. En admettant que la perte d'électrons est négligeable (0,2 nM par minute), l'activité de la réductase s'élève à 1,1 nM de cytochrome c réduit par minute. Il est évident que cette valeur n'est pas représentative de l'activité réelle de la réductase fusionnée avec A13, qui a de fortes chances d'être supérieure, du fait de leur proximité. Il serait aussi possible de suivre directement la diminution du NADPH en présence de A13red et de son substrat, mais celle-ci est limitée par

le cycle catalytique du cytochrome. Elle ne sera donc pas représentative de l'activité de la réductase, mais plutôt du cytochrome A13.

Ce test met particulièrement en évidence que le transfert d'électrons au sein de A13red pourrait se faire à la fois de manières intra- et/ou intermonomérique, à la différence de P450 BM-3 qui est active sous forme dimérique avec un transport d'électrons de type intermonomérique.[180] Une expérience de gel filtration a été menée et elle montre que seule la forme monomérique de A13red semble être présente en solution. Une analyse structurale de A13red pourrait donner d'autres éléments pouvant confirmer ou infirmer cette hypothèse. En effet, le mécanisme de reconnaissance entre le P450 et sa réductase est de nature électrostatique, et la liaison a lieu au niveau de résidus chargés positivement au sein du P450.[181] La localisation spatiale de ce domaine de liaison chez A13, et l'étude de sa proximité avec la partie réductase pourra dans un premier temps aider à déterminer si ce domaine est accessible ou non par la réductase, et donc comprendre si le transfert intramonomérique est possible (voir paragraphe 2.7).

2.6.3 Constantes de dissociation

La constante de dissociation K_D est inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Cette valeur est déterminée pour chaque substrat par spectrométrie UV-visible : lorsqu'une molécule d'alcane entre dans le site actif et déplace la molécule d'eau coordonnée au fer (III), ce dernier change d'état de spin pour passer de bas spin à haut spin, ce qui se traduit par une diminution du pic à 418 nm (bas spin) et une augmentation du pic à 392 nm (haut spin). Ainsi, les différences d'absorption entre A_{392} et A_{418} déterminées pour une gamme de concentration en substrat, et corrigées par rapport à la valeur sans substrat, permettent de calculer la valeur de K_D.[78] Ces constantes de dissociations ont été déterminées pour l'octane, le décane, le dodécane et le cyclohexane (Figure 37).

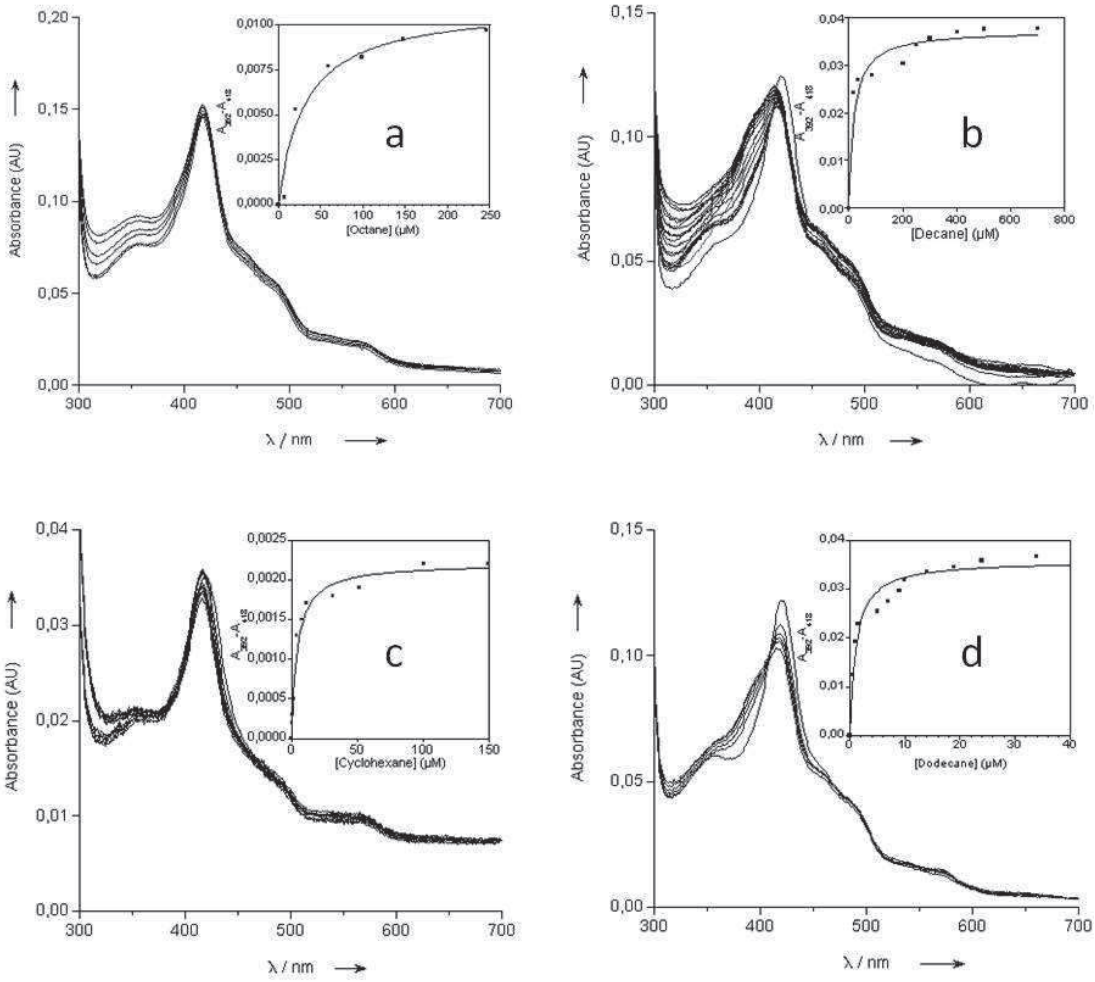


Figure 37 : Courbes de titration (K_D) de A13red sur : a - octane ; b - décane ; c - cyclohexane ; d - dodécane. Les inserts montrent les différences d'absorbance entre 392 et 418 nm, en fonction de la concentration en substrat.

L'analyse des constantes de dissociation K_D indique qu'A13red a une forte affinité pour ces molécules hydrophobes (de l'ordre du micromolaire), et que le site actif est suffisamment large pour accueillir des molécules cycliques telles que le cyclohexane. L'affinité est meilleure pour le dodécane. Viennent ensuite par ordre d'affinité décroissante le cyclohexane, le décane et l'octane (Tableau 8).

Substrats	K_D (µM)
Octane	29
Décane	16
Dodécane	1
Cyclohexane	5

Tableau 8 : Constantes de dissociation d'A13red déterminées pour différents substrats. Les expériences ont été réalisées en triplicat et les écarts types sont de 10 %.

Ces constantes sont du même ordre de grandeur que celles déterminées pour A6 par l'équipe de van Beilen.[78] Les affinités n'ont cependant pas été déterminées pour A13 non fusionné, mais étant donné le fort pourcentage d'identité des sites actifs de A13 et A6 (81 % des résidus sont conservés),[12] on peut néanmoins supposer que la fusion avec le domaine réductase n'a pas d'impact significatif sur l'affinité de l'enzyme pour ces substrats.

2.7 Modélisation de la structure tridimensionnelle

La résolution de la structure de A13red est essentielle pour comprendre la relation entre sa structure et sa fonction, son mode d'action, étudier l'ancrage du substrat au sein de son site actif, ou encore expliquer le mécanisme d'interaction entre le cytochrome et la réductase. A l'heure de l'écriture de cette thèse, la purification de l'enzyme de fusion n'est pas encore optimale pour permettre sa cristallisation, mais la modélisation de sa structure peut d'ores et déjà délivrer de précieuses informations.

L'unique membre de la famille CYP153 cristallisé est P450pyr (CYP153A7, possédant 51 % d'identité de séquence avec A13), et sa structure a été résolue par diffraction des rayons X (identification PDB 3RWL).[182] Basé sur la structure de P450pyr, un modèle de A13 a pu être créé par homologie entre les séquences, à l'aide du logiciel SwissModel. Le logiciel Visualizer Studio d'Accelrys permet de visualiser le modèle 3D. Bien qu'il ne s'agisse que d'un modèle, celui-ci reste tout de même relativement fiable du fait du fort pourcentage d'identité entre A7 et A13.[183–185]

2.7.1 Organisation de la structure tertiaire

Ce modèle de A13 permet tout d'abord de prédire l'organisation tridimensionnelle de l'enzyme (Figure 38).

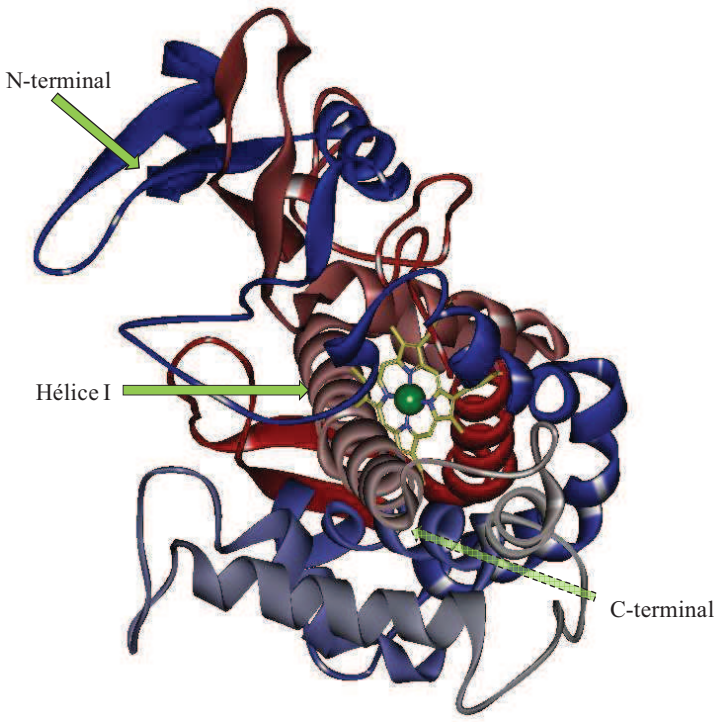


Figure 38 : Modélisation de la structure tridimensionnelle de CYP153A13. L'extrémité N-terminale est identifiée en bleu, qui se dégrade vers le rouge vif représentant l'extrémité C-terminale.

Le tag histidine est situé à l'extrémité N-terminale, et semble être facilement accessible. La partie réductase, fusionnée du côté C-terminal, est située en arrière du plan. Le canal d'entrée du substrat étant situé à l'avant du plan, la position de la réductase ne semble *a priori* pas gêner l'entrée de la poche catalytique.

L'hélice I est très conservée au sein des différents cytochromes de la famille des CYP153.[12] Le modèle montre qu'elle borde le site actif, et constitue une partie du tunnel emprunté par le substrat pour atteindre le centre catalytique. Les acides aminés constituant l'hélice I sont essentiellement hydrophobes, ce qui donne un premier indice pour expliquer l'affinité particulière des CYP153 pour les alcanes.

2.7.2 Modélisation de la surface de A13

L'étude de la surface de la protéine permet de visualiser l'entrée de la poche catalytique. Celle-ci est bordée d'acides aminés hydrophobes, qui facilitent l'entrée des alcanes et les guident vers le centre catalytique (Figure 39a). La porphyrine est située dans l'axe du canal, avec sa face distale orientée vers le substrat (Figure 39b).

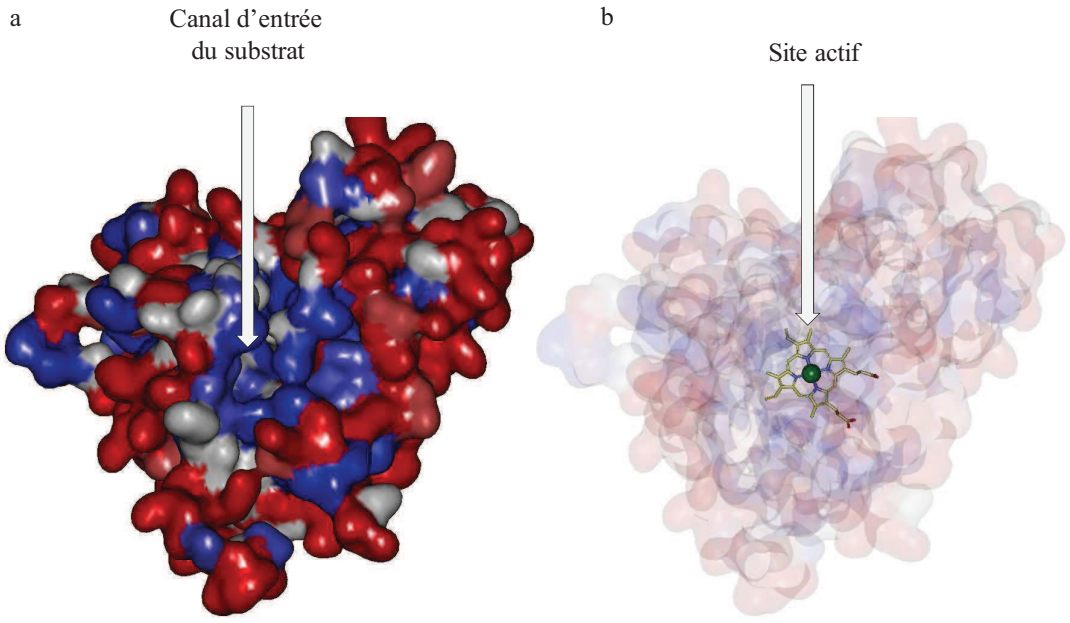


Figure 39 : Modélisation de la surface de CYP153A13a. (a) Les résidus hydrophobes, hydrophiles et neutres sont respectivement représentés en bleu, rouge et gris. (b) Visualisation par transparence de la position et de l'orientation du site catalytique (noyau hème). Les modèles (a) et (b) sont superposables.

2.7.3 Domaine d'interaction P450/réductase

La partie réductase a été fusionnée en C-terminal de la chaîne polypeptidique, par l'intermédiaire d'un lien de 27 acides aminés. Celui-ci joue le rôle d'espaceur entre A13 et la réductase, ce qui lui autorise une certaine liberté spatiale. Les résidus impliqués dans le domaine de liaison avec la réductase ont été mis en évidence dans un cytochrome : le CYP2B4 de lapin.[186] Il s'agit de R122, R126, R133, F135, M137, K139, R422, R433 et R443. L'alignement global de ce cytochrome avec A13 présente un faible pourcentage d'identité (22 %), mais il est possible de faire apparaître les résidus qui leur correspondent : M143, P150, H152, V154, R156, D403, V414 et E424 (ANNEXE 8). Ceux-ci ont été localisés sur le modèle de A13 (Figure 40).

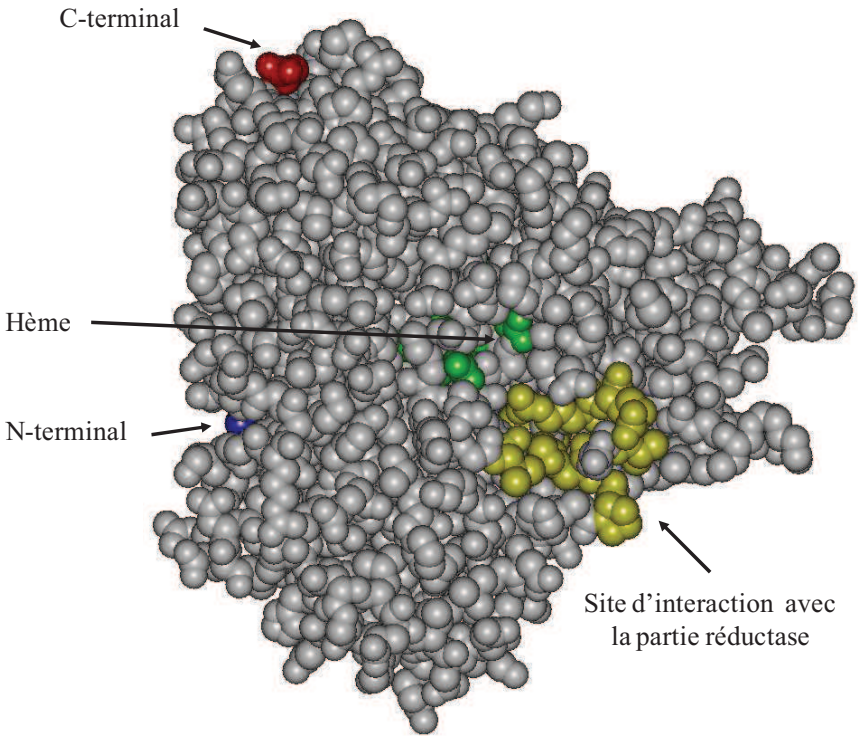


Figure 40 : Modèle du cytochrome CYP153A13 faisant apparaître le domaine de liaison présumé à la partie réductase. Les acides aminés C- et N-terminaux sont indiqués en rouge et bleu, respectivement. Le noyau hème est représenté en vert, le domaine de liaison en jaune.

Le modèle permet de visualiser la localisation du domaine de liaison à la réductase (en jaune). Il convient de noter que les résidus impliqués dans ce domaine au sein de CYP2B4 sont essentiellement chargés positivement, ce qui n'est pas le cas de la majorité de ceux déterminés par l'alignement global avec A13. Toutefois, de nombreux résidus arginine seraient situés à proximité de cette région, et le domaine serait lui-même proche du noyau hème (entre 10 et 20 Å), ce qui contribue à appuyer la validité du modèle. La longueur du lien serait suffisante pour permettre le transfert d'électrons de manière intramonomérique. Le domaine de liaison à la réductase ne semble pas gêner l'accessibilité du tunnel menant au site actif, situé du côté opposé de la protéine.

2.8 Conclusion

Au niveau génétique, les cytochromes CYP153A1, A6 et A13a ont été fusionnés avec succès au domaine réductase de P450RhF. L'optimisation des protocoles de culture et de purification réalisée pour A13red a amélioré la synthèse de protéines solubles et fonctionnelles dans *E. coli*. Toutefois, la quantité de protéines synthétisée de manière soluble reste faible, et la

formation de corps d'inclusion est prédominante. De plus, une partie des protéines solubles subit une protéolyse.

Trois paramètres ont été mis en place pour améliorer le rendement : (i) la culture en milieu TB favorise la croissance bactérienne et la synthèse de protéines fonctionnelles, (ii) l'induction à une DO_{600} de 1 augmente la quantité de protéines synthétisées, et (iii) la purification par l'histidine au lieu de l'imidazole permet d'obtenir des enzymes fonctionnelles. Malgré ces efforts, le taux d'expression reste faible (24 nmol d'enzyme fonctionnelle par litre de culture). Celui-ci est plus élevé que chez *P. putida* lors de l'expression de A13 natif,[12] et du même ordre de celui de CYP153A16 chez *E. coli*.[82] A la différence des autres systèmes CYP153, qui demandent l'expression et la purification de deux voire trois protéines distinctes, la nature fusionnée de A13red réduit le temps de travail nécessaire pour obtenir un tel système.

Les paramètres de culture et d'expression mis au point pour A13red ont été transposés pour A1red et A6red, mais leur expression reste insatisfaisante : A1red est synthétisée sous forme de corps d'inclusion, et A6red ne semble pas être exprimée. L'adaptation spécifique des conditions de culture à ces enzymes devrait permettre d'améliorer leur synthèse. L'influence du milieu, l'aération, le temps de culture sont des exemples de paramètres à explorer. Si l'expression de A6red n'est toujours pas satisfaisante, il faudra envisager de changer de système d'expression.

Les objectifs de cette thèse étant l'expression, la caractérisation et l'application de A13red en catalyse, il n'a pas été nécessaire à cette échelle de pousser la production à ses limites. Toutefois, étant donnés les avantages que présente la culture en fermenteur de type fed-batch, en permettant notament de maîtriser l'apport de nutriments et de carbone pour atteindre des quantités importantes de biomasse, il serait intéressant que son optimisation fasse l'objet d'investigations plus poussées.

La caractérisation du système fusionné A13red a confirmé d'une part sa forte affinité pour les alcanes linéaires à chaîne moyenne (octane, décane, dodécane), mais aussi pour le cyclohexane, et d'autre part son expression sous forme fonctionnelle. Le transfert d'électrons est sans doute assuré au sein même du monomère. L'application de A13red en catalyse sur ces alcanes est présentée dans le chapitre suivant. La caractérisation des enzymes A1red et A6red a été entravée par leur faible niveau d'expression sous forme soluble.

Enfin, la poursuite de l'étude des propriétés de l'enzyme A13red est en cours : sa cristallisation permettrait de résoudre sa structure tridimensionnelle par diffraction des rayons X et offrirait de précieuses informations structurales. Celles-ci constitueraient une base idéale pour une meilleure compréhension de son fonctionnement, en complément des modèles tridimensionnels. De plus, la cristallisation est essentielle pour valider le modèle tridimensionnel. Il est pour cela nécessaire de s'affranchir des contaminations contenues dans la fraction enzymatique afin d'obtenir un échantillon pur. Une amélioration de la purification pourrait aussi être effectuée simplement par chromatographie échangeuse d'ions. Enfin, l'utilisation du pefabloc, inhibiteur de protéase plus stable que le PMSF, pourrait aider à réduire le phénomène de protéolyse.

CHAPITRE 3. OXYDATION DES ALCANES LINEAIRES PAR BIOCATALYSE

Les cytochromes de la famille CYP153 ont la propriété d'oxyder les alcanes en position terminale.[19] Ils catalysent le transfert d'un atome d'oxygène (provenant de l'oxygène moléculaire) dans le substrat (alcane) pour produire l'alcool correspondant. Cette réaction est une oxydoréduction, dont les électrons sont amenés par le cofacteur NADPH, H^+, selon l'équation (1).

$$R{-}H + O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow R{-}OH + H_2O \qquad (1)$$

Deux types de tests ont été menés afin d'étudier les propriétés catalytiques des protéines de fusion : les bioconversions *in vivo* et les tests d'activité *in vitro*. A la différence des bioconversions, qui font intervenir la bactérie vivante, les tests *in vitro* sont réalisés sur l'enzyme purifiée. L'activité a été mesurée sur différents substrats : des alcanes linéaires à chaîne moyenne (C_5 à C_{12}) et sur un alcane cyclique (alcanes liquides), ainsi que sur des alcanes gazeux. Les détails expérimentaux sont décrits en fin de manuscrit (II.11et II.12).

3.1 Alcanes liquides

3.1.1 Bioconversions

Les essais de bioconversions ont été réalisés afin de mesurer l'activité de l'enzyme A13red dans *E. coli*. Après culture, les cellules sont récoltées par centrifugation et resuspendues dans un tampon phosphate à pH 7,4 contenant 10 % de glycérol. La réaction est réalisée sous agitation permanente pour une oxygénation suffisante du mélange, et permettant de créer une émulsion entre les substrats organiques et le milieu aqueux. Les substrats linéaires tels que l'octane, le décane et le dodécane ont été testés, ainsi qu'un substrat plus encombrant, le cyclohexane.

En fin de réaction, les produits sont extraits à l'acétate de butyle. L'analyse des produits et leur quantification sont réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC/MS). Les détails des conditions de réaction et d'analyse sont donnés aux paragraphes II.12 et II.13 de la partie expérimentale.

3.1.1.1 Sélectivité

Pour les quatre substrats testés, l'enzyme forme à plus de 95 % l'alcool terminal correspondant (Tableau 9). Aucun produit secondaire n'a été détecté, sauf pour l'octane pour lequel on retrouve du 2-octanol (5 %) et de l'acide octanoïque (< 0,1 %). Ce dernier apparaît tardivement, après environ 24h de réaction. Sa présence pourrait s'expliquer par la suroxydation du 1-octanol par l'enzyme de fusion A13red, ou par la machinerie enzymatique

d'*E. coli*. Ceci pourrait être vérifié en réalisant des bioconversions par *E. coli* non recombinante sur du 1-octanol. Pour le décane et le dodécane, la sélectivité est supérieure à 99 % en faveur du carbone terminal. Les quantités de produits obtenues étant plus faibles que celles avec l'octane, il est possible que l'enzyme oxyde aussi le carbone 2, mais en quantités insuffisantes pour être détectées en GC/MS. Enfin, les bioconversions sur le cyclohexane montrent uniquement une formation de cyclohexanol. Aucun produit de suroxydation, tel que des aldéhydes ou des acides carboxyliques n'a été détecté : en plus d'être fortement régiosélective, l'enzyme de fusion A13red est aussi chimiosélective dans ces conditions.

Substrats	Produits (sélectivité)	Activité *in vivo*[a]	Activité spécifique[b]	Log P[c]	
				Alcane	Alcool
Cyclohexane	Cyclohexanol (< 99%)	12,7	1,0	3,2	1,6
Octane	1-Octanol (95%)	60,9	3,2	4,5	3,1
Décane	1-Décanol (< 99%)	13,5	0,2	5,7	4,1
Dodécane	1-Dodécanol (< 99%)	2,1	0,006	6,7	5,2

Tableau 9 : Activité enzymatique *in vivo*. [a] mg de 1-alcool produit / gramme de cellules (poids sec) en 24h. [b] µmol de 1-alcool produit / gramme de cellules (poids sec) / min. Les erreurs ont été évaluées entre 25 et 35 %. [c] Le Log P illustre la facilité du composé à franchir la membrane bactérienne.[187]

3.1.1.2 Activité in vivo

L'activité de A13red *in vivo* est plus forte sur l'octane, avec 61 mg de 1-octanol formé par gramme de cellules sèches, suivi du décane (13,5 mg/g), du cyclohexane (12,7 mg/g), puis du dodécane (2,1 mg/g).

Ces résultats sont en accord avec les activités spécifiques (AS) mesurées sur les différents substrats : l'activité spécifique maximale de A13red est obtenue pour l'octane avec 3,2 µmol de 1-octanol formé / gramme de cellules sèches / min. Viennent ensuite le cyclohexane (1 µmol / g / min), le décane (0,2 µmol / g / min), puis le dodécane (< 0, 01 µmol / g / min).

Les travaux effectués par l'équipe de Misawa avec la protéine de fusion A13a-RhFred exprimée dans *E. coli*, montrent la même tendance, avec une meilleure activité sur l'octane que sur le cyclohexane.[19] Ces activités ont aussi été déterminées par van Beilen pour A13 non fusionné, exprimé dans *E. coli*. Les résultats sur l'octane sont similaires, avec 41,7 mg de 1-octanol formés par gramme de cellules sèche.[105] La différence entre 61 mg/g obtenu avec A13red et 42 mg/g obtenu avec A13 pourrait s'expliquer par une plus grande stabilité de l'enzyme de fusion qui permet d'accumuler du 1-octanol sur un temps plus long.

Les produits sont détectés à des temps différents, selon la nature du substrat. Le cyclohexanol est détecté au bout de 30 minutes de réaction, alors que l'octanol apparait au bout d'une heure. Le décanol et le dodécanol sont détectés après plus de 2 h de réaction. Ce phénomène pourrait provenir du fait que chaque substrat diffuse plus ou moins facilement à travers la membrane bactérienne. Cette faculté à traverser la membrane peut être prévue en étudiant les log P des substrats (Tableau 9). Un composé possédant un log P compris entre 1,5 et 4 franchira la membrane bactérienne plus aisément.[188] Il s'en suit que la réaction démarrera plus vite. Le log P du dodécane étant supérieur à 4, il traverse difficilement la membrane bactérienne. De plus, si le produit formé traverse lui aussi la membrane bactérienne difficilement (log P de 5,2 pour le dodécanol), il va s'accumuler dans le cytoplasme. Il sera alors plus toxique pour la bactérie et la réaction s'arrêtera plus vite.
La mort cellulaire pourrait aussi engendrer la formation de micelles composées des lipides provenant de la membrane bactérienne, qui emprisonneraient l'alcool. Sa quantification serait alors sous estimée. Cette formation est observable visuellement au moment de l'extraction : l'épaisseur de la couche lipidique augmente en fonction du temps, ce qui tendrait à confirmer cette hypothèse.

Les activités sur les différents substrats ne sont toutefois pas seulement régies par leur capacité à franchir la membrane bactérienne, mais aussi par leur affinité avec l'enzyme, ainsi que par la rapidité de l'enzyme à accomplir l'acte catalytique. De plus, la solubilité des substrats en milieu aqueux étant variable, ils sont donc plus ou moins disponibles, ce qui influe aussi sur la vitesse de réaction. L'équipe de Funhoff a incriminé la concentration en oxygène comme étant le facteur limitant dans le cas de réactions comparables avec celles que nous avons mis en œuvre.[12] Dans notre cas, le manque d'oxygène est peu probable, du fait que la réaction soit réalisée sous agitation. Ainsi, la détection de produit *in vivo* est fonction de deux paramètres : (i) la nature du substrat, qui influence sa faculté à traverser la membrane bactérienne, sa cytotoxicité pour la bactérie, sa solubilité et sa volatilité dans le milieu réactionnel (ainsi que celles du produit), et (ii) l'activité de l'enzyme sur ce substrat.

Finalement, ces bioconversions dévoilent une première tendance de l'enzyme qui présente une meilleure activité sur l'octane. Toutefois, les tests *in vivo* ne permettent pas de confirmer son caractère autonome. En effet, *E. coli* exprime des protéines capables de transporter les électrons au cytochrome. Ses résultats ont donc été complétés par des tests *in vitro* avec A13red purifiée, dans le but de déterminer ses constantes catalytiques et d'étudier son

autonomie. Ces tests permettent en outre de s'affranchir du biais engendré par les différences de diffusion des substrats à travers la membrane bactérienne.

3.1.2 Tests d'activité *in vitro*

Ces tests sont réalisés en milieu aqueux tamponné avec les enzymes purifiées. La concentration enzymatique est d'environ 0,15 µM d'enzymes fonctionnelles par essais (les détails des conditions de réaction sont donnés au paragraphe II.11.2 de la partie expérimentale). Les quantités de produits formés ont été déterminées par analyse GC/MS, et la consommation de NADPH par spectrométrie UV-visible à 340 nm.

3.1.2.1 Résultats des tests catalytiques

L'activité de l'enzyme A13red en présence de différents substrats est présentée dans le Tableau 10.

Substrats	TOF [a]	Activité spécifique [b]	TON[c]	Couplage (%)[d]	K_D (µM)	k_{cat}/K_M
Cyclohexane	3	4.0	20	25	5	0,6
Hexane	1,8	19,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d
Octane	57	350	410	54	29	2
Décane	30	45.6	235	28	16	1,9
Dodécane	0,1	0.15	1	< 1	1	0,1

Tableau 10 : Activité enzymatique de A13red *in vitro*. [a] TOF : Fréquence de turn over (mol de 1-alcool formé) / (mol de P450 fonctionnel) / min ; [b] (µmol de 1-alcool formé) / (g de P450 fonctionnel) / min ; [c] (mol de 1-alcool formé) / (mol de P450 fonctionnel) en 24 h ; [d] (mol de 1-alcool formé) / (mol de NADPH consommé) x 100.

Les valeurs de productivité *in vitro* sont en accord avec les résultats obtenus *in vivo* : le substrat pour lequel l'activité de A13red est la plus élevée est l'octane, suivi du décane, du cyclohexane, de l'hexane et du dodécane. Ces résultats peuvent être comparés à ceux publiés par l'équipe de van Beilen pour les cytochromes CYP153A13a et CYP153A6 non fusionnés.[12] Ainsi, la fréquence de turnover (TOF) de A13red que nous mesurons sur l'hexane est 1,8 min^{-1} alors qu'aucune activité n'a été mesurée avec le cytochrome A13a natif. Cette activité est du même ordre de grandeur que celle de A6 non fusionné,[78] qui avait lui-même montré la meilleure activité comparée aux autres CYP153. La fréquence de turnover de A13red sur l'octane est de 57 min^{-1} alors qu'aucune activité n'avait été détectée par l'équipe de van Beilen pour A13 non fusionné (< 0,01 min^{-1}).[12] Cette activité est comparable à celle

obtenue pour A6 natif par l'équipe de van Beilen.[78] De même, sur le décane, la fusion de A13 avec le domaine réductase a augmenté l'activité de manière considérable (elle a été multipliée par 5). Ces résultats pourraient s'expliquer par un transfert d'électrons plus efficace entre les deux partenaires rédox lorsqu'ils sont fusionnés, mais aussi par une augmentation de la stabilité de A13 du fait de sa fusion avec la réductase.

On remarque par ailleurs que l'affinité et l'activité ne sont pas corrélées (par exemple, l'enzyme présente la meilleure activité sur l'octane mais la plus faible affinité). La même tendance a été rapportée par l'équipe de van Beilen avec CYP153A6[78] et peut s'expliquer par le fait que malgré une plus faible affinité pour l'octane, l'acte catalytique peut être largement plus rapide : l'efficacité résultante de l'enzyme sera donc meilleure. La détermination du rapport k_{cat} / K_M, qui illustre l'efficacité de l'enzyme sur les différents substrats, appuie cette hypothèse (Tableau 10).

3.1.2.2 Sélectivité

La sélectivité de l'enzyme fusionnée est supérieure à 99 % pour l'oxydation terminale de l'octane en 1-octanol avec des traces de 2-octanol (< 1 %). Ce pourcentage est du même ordre que celui déterminé pour le A6 (95 %),[78] et AlkB (100 %)[23] mais très supérieur à celui du meilleur variant de P450 BM-3 pour l'oxydation de l'octane en 1-octanol (variant 9-10A-A328V : régiosélectivité de l'ordre de 10 %).[94] Le mutant Y96F-V247L de P450cam, actif sur l'hexane n'a quant à lui montré aucune oxydation sélective du carbone terminal, mais une régiosélectivité de 100 % pour former le 2−hexanol.[103] D'autres cytochromes sont capables d'oxyder les alcanes linéaires : le cytochrome CYP4B1 du lapin,[24] dont le pourcentage de régiosélectivité est similaire à celui de A13red (96 %), ainsi que le cytochrome CYP52A3 de la levure *Candida maltosa*, qui possède une forte régiosélectivité en faveur du C-terminal (98 %), mais dont aucune activité sur les *n*-alcanes à chaîne plus courte que le décane n'a été rapportée.[25]

La régiosélectivité de A13red sur l'hexane, le décane et le dodécane est identique à celle sur l'octane, avec 99 % de conversion en l'alcool terminal correspondant. Pour finir, la comparaison avec les pourcentages de régiosélectivité obtenus par procédés chimiques lors d'oxydation de *n*-alcanes à chaîne moyenne montre que la nouvelle enzyme A13red présente une régiosélectivité non égalée à ce jour par un catalyseur chimique.[9,31]

La modélisation de la structure tridimensionnelle de A13red, et plus précisément de son site actif, donne des éléments qui permettraient d'expliquer cette excellente régiospécificité. Cette modélisation a été effectuée par alignement du modèle tridimensionnel de CYP153A7 avec celui de A13. La modélisation de l'ancrage du substrat au sein du site actif de l'enzyme (Figure 41a) indique clairement que le substrat est ancré dans la poche catalytique de telle façon que le carbone terminal soit celui situé le plus proche du site ferrique (4,1 Å) (Figure 41b). Même si les cytochromes A7 et A13 possèdent un fort pourcentage d'identité (51 %), et que par conséquent ce modèle est relativement fiable, il est important de souligner que cette rationalisation n'est réalisée qu'à partir d'un modèle, et non pas de la structure cristallographique de l'enzyme.

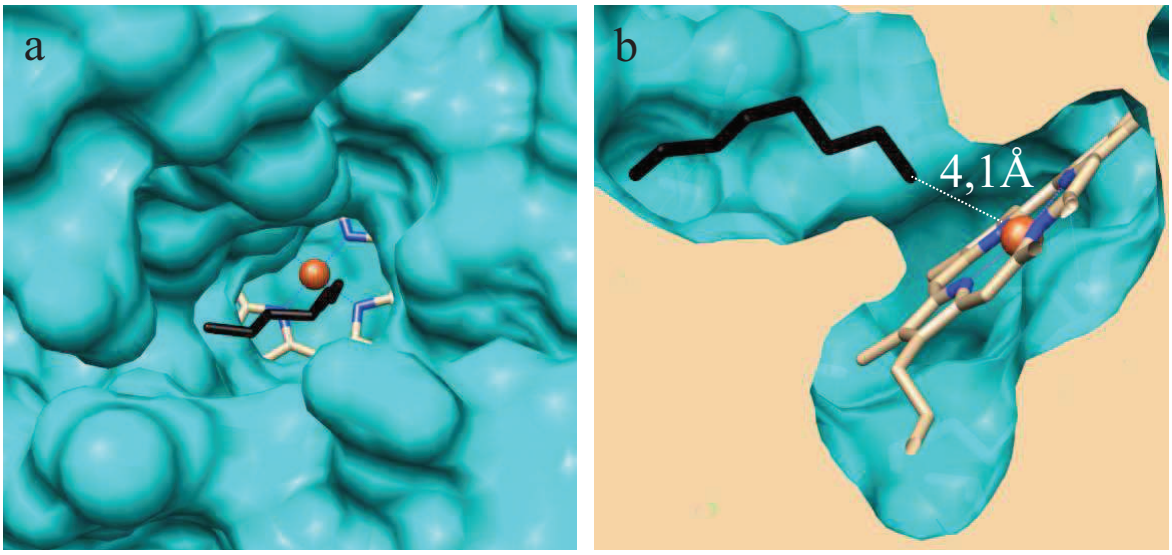


Figure 41 : Représentation tridimensionnelle du site actif de CYP153A13a qui montre l'ancrage du substrat (octane, en noir) et illustre la régiosélectivité de A13 pour l'hydroxylation en C-terminal. La modélisation de l'ancrage de l'octane a été effectuée avec le logiciel SwissDock, disponible en ligne, et la visualisation avec le logiciel Chimera 1.6.2rc.

3.1.2.3 Efficacité de couplage

Dans les cytochromes de classes I et II, les interactions entre le P450 et ses partenaires rédox sont souvent très lentes et le taux d'électrons transférés de la flavine à l'hème est bas : les différents intermédiaires réactionnels étant très instables, leur décomposition est fréquente si les électrons n'arrivent pas à temps. Le cycle est alors rompu et le substrat n'est pas oxydé.[87,102] Ce phénomène est appelé découplage. D'autres facteurs peuvent aussi augmenter le découplage, tels un excès de molécules d'eau dans le site actif, ou la nature du substrat, qui engendre des liaisons non productives avec le site actif.[102,189] En effet, les intermédiaires réactionnels sont souvent stabilisés par leur liaison au substrat. La première voie de découplage est appelée court-circuit auto-oxydant : lorsque le substrat possède un nombre

insuffisant de sites réactifs, la durée de vie du complexe oxyferreux formé entre l'atome de fer de l'hème et l'oxygène moléculaire n'est pas suffisamment longue, et il se décompose avant l'arrivée du second électron. Cette voie mène à la formation d'ions superoxyde. Une seconde voie de découplage conduit à la production de peroxyde d'hydrogène, tandis qu'une troisième voie peut intervenir lors de la décomposition du composé I : la consommation de deux électrons et de deux protons supplémentaires mène alors à la formation d'une molécule d'eau (Figure 42).

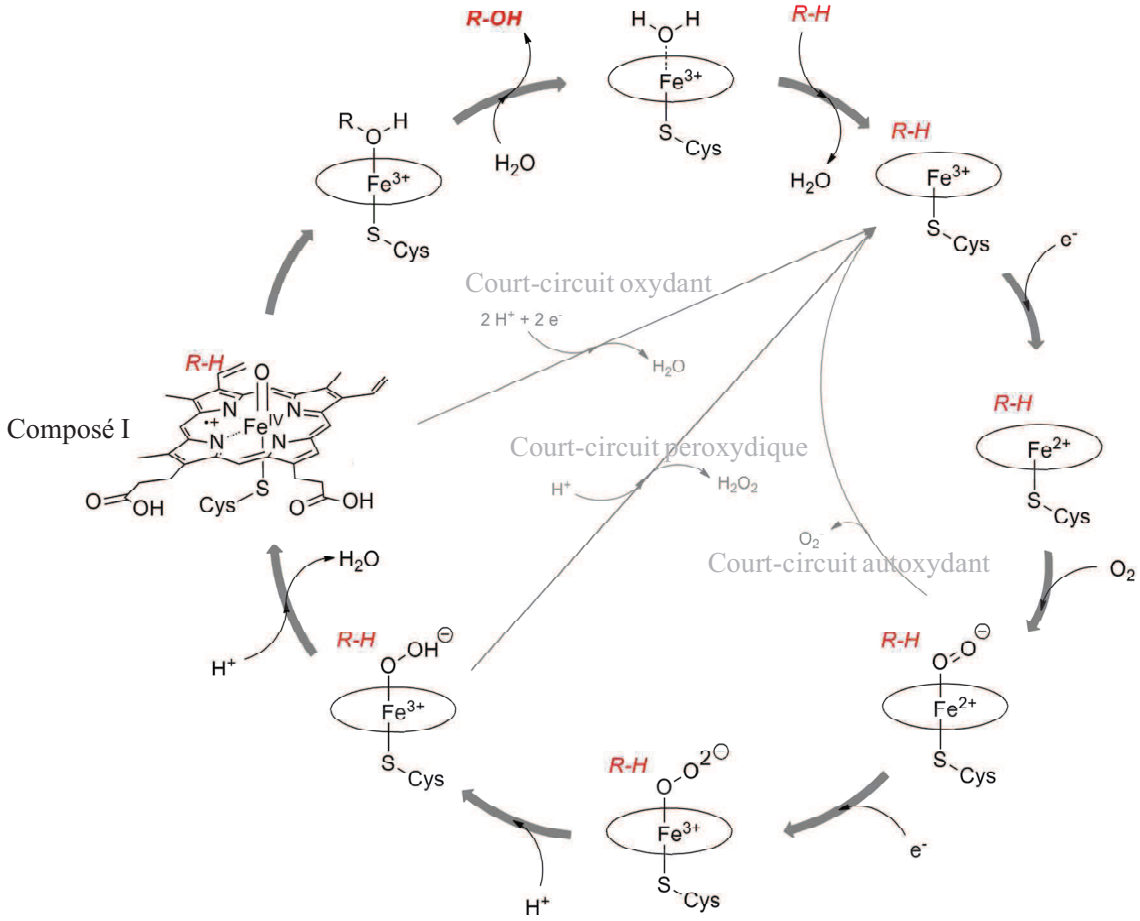


Figure 42 : Cycle réactionnel du P450 et ses voies de découplage.

Malgré une activité de A13red supérieure à celle de l'enzyme non fusionnée, les études de consommation du NADPH montrent un fort taux de découplage. En effet, seulement 54 % du NADPH consommé conduit à la formation de 1−octanol, et les taux sont inférieurs pour le décane (28 %), le cyclohexane (25 %) et le dodécane (< 1 %) (Tableau 10). Les efficacités de couplage sont très variables d'un P450 à un autre. Par exemple, le double mutant de CYP102A3 issu de *Bacillus subtilis* 5BS1 montre 5 % de couplage avec une régiosélectivité de 48 % pour le 1-octanol.[190] Le mutant 1-12G de BM3 quant à lui possède 37 % de couplage

avec une régiosélectivité de 82 % pour le 2-octanol.[94] Aucune donnée d'efficacité de couplage concernant les membres de la famille CYP153 n'a été rapportée dans la littérature à ce jour.
Le devenir du NADPH a été analysé : lorsque l'on incube l'enzyme avec l'octane et le NADPH, 54 % du NADPH est utilisé pour produire du 1-octanol, 0,5 % produit du 2-octanol et 35,5 % est non productif et engendre la formation de peroxyde d'hydrogène. Il est donc possible d'identifier le devenir de 90 % du NADPH. Les 10 % restants non identifiés peuvent s'expliquer par une imprécision des méthodes de quantification (extraction non totale, seuil de détection GC/MS trop haut). Il est donc probable que la quantité de produit déterminée par GC/MS soit sous-estimée, ou que le cycle catalytique soit interrompu au niveau d'une des deux autres voies de découplage conduisant à la formation d'une molécule d'eau ou d'un anion superoxyde. Le devenir de l'oxygène pourrait être suivi en effectuant un marquage à l'oxygène 18.

En plus de consommer du cofacteur sans former de produit, le découplage est problématique puisqu'il conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène qui inactive le P450.

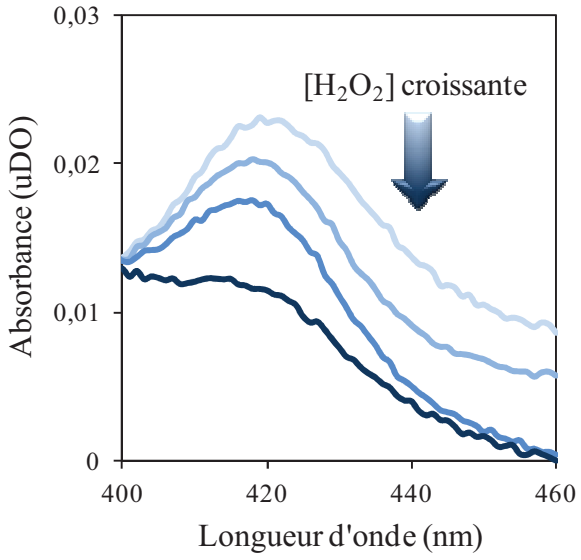


Figure 43 : Effet du peroxyde d'hydrogène sur A13red. Les quatre spectres ont été enregistrés après 15 min d'incubation avec des concentrations croissantes en H_2O_2 (du plus clair vers le plus foncé : 0 ; 0,5 ; 1 et 5 mM d' H_2O_2).

Le peroxyde d'hydrogène est capable de se lier au fer du groupe prosthétique du cytochrome, mis en évidence par la diminution de l'intensité du pic à 420 nm (Figure 43), et provoquer sa dégradation.[191] Cette inactivation peut expliquer le nombre de turn over (TON) relativement bas supporté par A13red sur le décane (TON : 235), alors qu'il est de 410 sur l'octane.

L'efficacité de couplage étant plus faible pour le décane, il est possible que le peroxyde d'hydrogène produit inactive plus rapidement A13red, qui supporte alors moins de nombre de turnover du fait de sa plus faible stabilité.

3.1.2.4 Facteurs extrinsèques influençant l'activité

Plusieurs facteurs qui ne sont pas liés directement à l'enzyme peuvent influencer son activité. La faible solubilité des alcanes liquides en milieu aqueux limite leur disponibilité. Par exemple, la solubilité de l'octane est de 10 µM et celle du décane de 8 µM dans l'eau, à 20 °C. L'utilisation d'un co-solvant (l'éthanol) a donc été nécessaire. Celui-ci ne modifie pas la stabilité de l'enzyme lorsque sa concentration n'excède pas 1 %.

D'autre part, il est nécessaire de contrôler l'agitation des flacons, qui influence l'oxygénation des échantillons, la température de la pièce (évaporation du substrat et du produit), ainsi que les méthodes d'extraction, afin d'assurer la reproductibilité des résultats. L'octane étant le substrat pour lequel A13red présente l'activité la plus forte, le mélange réactionnel a fait l'objet de modifications, qui ont pour but de limiter l'impact des ces différents facteurs sur son activité, ou de s'en affranchir. Ces modifications ont permis d'atteindre un TON d'environ 3000. Les différents facteurs modifiés ainsi que les résultats catalytiques sont présentés au Chapitre 5.

3.1.3 Conclusion sur l'activité de A13red sur les alcanes linéaires à chaîne moyenne

Les tests effectués *in vivo* et *in vitro* confirment la forte affinité de A13red pour les alcanes linéaires à chaîne moyenne (C_6 à C_{12}), et pour le cyclohexane. Le pentane a aussi été testé mais aucun produit d'oxydation n'a été détecté. Le substrat pour lequel l'enzyme montre l'activité la plus élevée est l'octane. L'activité de la protéine chimère est supérieure à celle de A13 non fusionnée en présence de partenaires exogènes.[12] Il est possible que la fusion ait un double impact sur l'activité. D'une part, elle augmenterait la stabilité de l'enzyme, grâce à la liaison covalente entre les deux entités qui stabiliserait les interactions entre les domaines hydroxylase et réductase. D'autre part, la proximité des partenaires rédox favoriserait un transfert rapide des électrons entre les deux entités. Il s'en suit une augmentation de l'activité catalytique (TOF et TON) alors que la spécificité de substrat reste inchangée. La régiosélectivité pour ces substrats est en faveur du carbone terminal (99 %). *In vitro*, aucun produit de suroxydation n'a été détecté.

Les tests réalisés *in vitro* apportent la confirmation que A13red est bien une protéine autonome et que la reconstruction artificielle de la chaîne de transport d'électrons a été

réalisée avec succès, puisqu'aucun autre partenaire rédox n'est présent dans le milieu réactionnel. L'efficacité du transfert d'électron est variable selon le substrat : le taux de couplage atteint 54 % pour l'octane alors qu'il est inférieur à 1 % pour le dodécane. Cette différence peut s'expliquer par une liaison non productive du substrat au niveau du site actif, qui engendre une consommation du cofacteur sans formation de produit. Le découplage est d'autant plus indésirable qu'il mène à la formation de peroxyde d'hydrogène, qui inactive l'enzyme. Les nombres totaux de turnover sont alors réduits.

3.2 Tests d'activité sur les alcanes gazeux

L'enzyme A13red présentant une activité intéressante sur les alcanes à chaîne moyenne, les tests catalytiques ont été poursuivis sur les alcanes gazeux que sont le méthane, l'éthane, le propane et le butane. D'un point de vue énergétique, la rupture de la liaison C-H du méthane est plus difficile que celle des autres alcanes, avec une énergie de dissociation de 104 kcal / mol, contre 98 pour les trois autres.[1] L'activation du méthane par un cytochrome P450 a été récemment rapportée à deux reprises. La première fait intervenir une molécule leurre qui permet l'ancrage du méthane dans le site actif,[192] tandis que la deuxième utilise l'iodosylbenzène comme oxydant à la place de l'oxygène[81] (pour plus de détails sur l'utilisation de molécules leurres se reporter au paragraphe 1.3.2.2). A la différence d'A13red, le cytochrome utilisé pour la première étude (P450 BM-3) n'a pas d'affinité pour les alcanes linéaires à l'état natif. La deuxième étude met en œuvre A6 mais aucun résultat n'est donné quant à l'oxydation du méthane par l'oxygène. Il était donc intéressant d'étudier l'activité de A13red sur les alcanes gazeux, en utilisant l'oxygène moléculaire.

3.2.1 Mise au point du test d'activité et de la méthode de détection

3.2.1.1 Conditions de réactions

La comparaison de deux études récemment publiées montre l'importance de la pression en alcane et en oxygène dans le milieu réactionnel. Dans des conditions réactionnelles comparables, seule la réaction réalisée sous pression mène à l'oxydation de l'alcane gazeux.[30,120] Les réactions ont donc été menées en réacteur pressurisé (0,7 bar d'alcane, 9,3 bar d'un mélange à 10 % d'oxygène dans l'azote). De plus, les conditions de réactions ont été déterminées dans le but d'obtenir des quantités suffisantes d'alcool pour pouvoir être quantifiables. Un temps de réaction de 24 h a été retenu pour une accumulation maximale de produit. Un système de capture du peroxyde d'hydrogène (catalase) a été introduit dans le

milieu afin de prévenir l'inactivation de A13red dans le cas d'un fort découplage. Enfin, un système de recyclage du NADPH a été ajouté afin que la quantité de cofacteur ne soit pas limitante. Le Chapitre 5 détaille ces conditions de réaction, qui sont résumées dans le paragraphe II.11.4 de la partie expérimentale.

3.2.1.2 Détection des produits

Les produits de la réaction ont été séparés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne non polaire et analysés par un détecteur FID (GC/FID). La méthode permet de séparer les différents isomères, et les temps de rétentions sont différents pour chaque produit. La seule exception est le méthanol, dont le temps de rétention est le même que pour le formaldéhyde. Afin de les différencier, des tests faisant varier la température du four et la nature de la colonne ont été menés, mais sans succès.

3.2.1.2.1 Limites de détection

Les limites de détection ont été mesurées pour chaque produit potentiel. Elles sont présentées Tableau 11.

Substrat	Produit	Limite de détection (µM)
CH_4	Méthanol	100
	Formaldéhyde	850
	Acide formique	50 mM
C_2H_5	Ethanol	35
	Ethanal	100
	Acide éthanoïque	300
C_3H_8	1-propanol	20
	2-propanol	20
	Propanal	20
	Acide propanoïque	10
C_4H_{10}	1-butanol	10
	2-butanol	10
	Butanal	10
	Acide butanoïque	5

Tableau 11 : Limites de détection des produits potentiels d'oxydation des alcanes gazeux par A13red en analyse GC/FID.

On peut considérer que les limites de détection des produits en C_3 et C_4 sont tout à fait acceptables (10 à 20 µM). Les limites de détection des alcools en C_1 et C_2 sont plus hautes

(100 µM pour le méthanol et 35 µM pour l'éthanol), mais restent dans la gamme de concentrations potentiellement attendues. De plus, si l'on considère que l'activité de l'enzyme devient intéressante à partir d'un nombre total de turnover de 100 (qui correspond à 100 µM de produit formé par 1 µM d'enzyme), il n'est pas nécessaire de détecter les produits dont la concentration se situe en dessous de cette limite. Etant donnée la forte chimiosélectivité de cette enzyme, les limites de détection des produits de suroxydation du méthane (850 µM pour l'aldéhyde et 50 mM pour l'acide) et de l'éthane (100 µM pour l'éthanal et 300 µM pour l'acide) semblent *a priori* plus hautes que les quantités auxquelles on pourrait s'attendre. Des méthodes de détection des aldéhydes par des tests colorimétriques (purpald, MBTH), ou des acides par dérivatisation pourraient permettre de quantifier ultérieurement de tels produits.

3.2.1.2.2 Dérivatisation du méthanol

La détection du méthanol par GC/MS n'a pas été possible avec la colonne disponible au laboratoire, et sa quantification par GC/FID pose un double problème. D'une part, son temps de rétention est similaire à celui du formaldéhyde, et ne permet donc pas de les différencier. D'autre part, même si la limite de détection de 100 µM est acceptable, elle reste tout de même relativement haute. Par conséquent, la dérivatisation du méthanol par le nitrite de sodium en condition acide a été envisagée.[193] Le produit de dérivatisation, le nitrite de méthyle a toutefois une limite de détection supérieure à celle du méthanol (1 mM contre 100 µM). La méthode a donc été abandonnée.

3.2.2 Tests catalytiques

3.2.2.1 Réactions sur le méthane

Les produits de réaction de A13red sur le méthane ont été analysés en GC/FID. Cette expérience a été réalisée cinq fois. Seules deux réactions sur les cinq présentent l'apparition d'un pic au temps de rétention attendu pour le méthanol. Le spectre obtenu est présenté à la Figure 44.

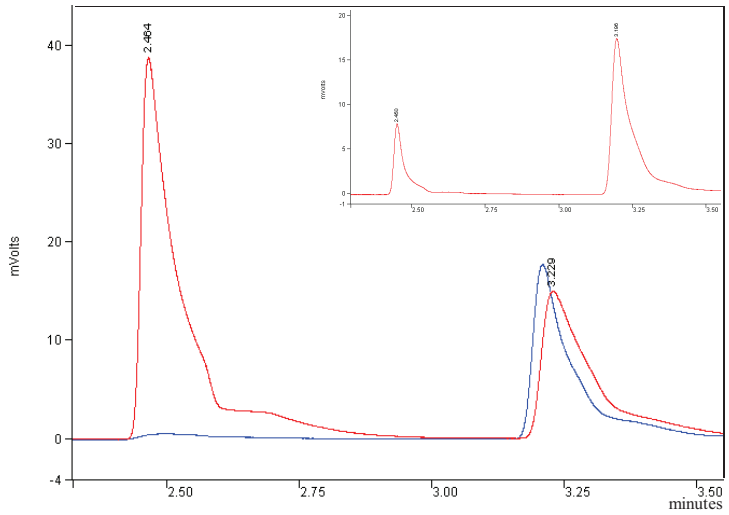


Figure 44 : Chromatogrammes obtenus après analyse GC/FID des produits de réaction d'A13red sur le méthane à t_0 (bleu) et après 24 h de réaction (rouge). L'encart présente le chromatogramme témoin après injection d'un échantillon de méthanol à 4 mM dans l'eau. Le pic à 2,45 minutes correspond au méthanol / formaldéhyde. Le pic à 3,2 minutes correspond à l'étalon interne (éthanol, 4 mM).

La quantité de méthanol produit a été mesurée à 8 mM pour le premier essai et 12 mM pour le second, soit un nombre de turnover moyen de 10000 en 24 h. Dans des conditions comparables, ce TON avait été évalué à 3000 pour la production d'octanol. L'activité de A13red sur le méthane paraît donc très élevée. Le fait de réaliser les réactions sous pression en oxygène et en méthane favorise la disponibilité des substrats et peut expliquer la forte quantité de méthanol récupéré en fin de réaction. Toutefois, l'apparition de méthanol n'est pas reproductible et des expériences complémentaires doivent être menées. De nombreux facteurs peuvent expliquer l'absence de reproductibilité : une température de réaction non maîtrisée (variable entre 25 et 32 °C), l'utilisation d'un lot de production de A13red différent, le changement de lot de l'enzyme de recyclage du cofacteur en sont des exemples. Selon les conditions opératoires, le système de recyclage utilisé (ICDH) est capable de convertir 5 µmol de $NADP^+$ par minute. Son cofacteur (D/L isocitrate) est présent en conditions suffisantes pour produire la quantité de NADPH nécessaire, en 24 h, pour former les 10 mM de méthanol. De plus, la quantité de méthane introduite au départ dans le mélange réactionnel (28,3 mM) est elle aussi en excès. Ces résultats, bien que peu reproductibles, sont très intéressants et les taux de conversion théoriquement possible.

3.2.2.2 Réactions sur l'éthane, le propane et le butane

Des tests catalytiques sur l'éthane, le propane et le butane ont été conduits selon les mêmes conditions réactionnelles que pour le méthane. Aucun de ces tests, réalisés chacun en

triplicata, n'a mené à la formation de produit en quantité suffisante pour être détecté en GC/FID.

3.3 Conclusion

Tout d'abord, les bioconversions effectuées sur l'octane, le décane, le dodécane et le cyclohexane montrent que la protéine est active dans la bactérie. Le taux de conversion varie en fonction de la longueur de la chaîne de l'alcane et de son encombrement (Tableau 9) : *in vivo*, l'enzyme est plus active sur l'octane que sur le décane, le cyclohexane et le dodécane (ordre décroissant). Sa régiosélectivité est en faveur du carbone terminal. Les tests catalytiques *in vitro* du système fusionné A13red ont permis de confirmer d'une part sa préférence pour les alcanes linéaires à chaîne moyenne (octane, décane), et d'autre part son fonctionnement autonome et indépendant. La comparaison des résultats obtenus avec ceux de la littérature montre une efficacité accrue en matière de catalyse, avec des réactions à la fois plus rapides qu'avec les systèmes CYP153 non fusionnés,[12] et plus sélectives qu'avec les catalyseurs chimiques.[9,31,32] Ainsi, il a été démontré que la proximité des partenaires rédox permet d'améliorer le transfert d'électrons et donc la productivité.

Les mesures des activités sur les alcanes gazeux n'ont pas été concluantes (activité non détectée sur l'éthane, le propane et le butane, et résultats non reproductibles dans le cas du méthane). Il paraît intéressant de continuer l'investigation avec des lots d'enzymes fraichement préparés. En effet, l'étude de la fonctionnalité de A13red n'a pas été réalisée au-delà de deux mois, alors que les enzymes utilisées lors de ces tests avaient été préparées six à dix mois plus tôt selon le lot. D'autre part, la mutagénèse dirigée du site actif de A13red a été envisagée dans le but de réduire le volume de la poche et de favoriser l'ancrage de telles molécules. Ceci fait l'objet du Chapitre 4.

CHAPITRE 4. MUTAGENESE DIRIGEE DU SITE ACTIF

La protéine de fusion A13red a montré une bonne activité d'oxydation des alcanes à chaîne moyenne (C_6-C_{12}) pour former leur alcool terminal correspondant. L'activité d'oxydation des alcanes gazeux a été trop faible voire inexistante pour le pentane, l'éthane, le propane et le butane, et non reproductible pour le méthane. La forte régiosélectivité de A13red sur les alcanes à chaîne moyenne, ainsi que son excellente chimiosélectivité, font d'elle une base prometteuse pour l'évolution moléculaire dirigée de son site actif en vue de réduire son volume pour l'oxydation des alcanes plus courts. De plus, et contrairement aux autres P450 utilisés comme base pour l'évolution dirigée en vue d'oxyder les alcanes linéaires (P450-cam, BM3), A13 en est capable naturellement.

Une des approches les plus courantes d'évolution moléculaire consiste à introduire des mutations de façon aléatoire au sein du gène. Un nombre presque infini de mutants peut ainsi être obtenu, et le criblage haut débit de ces mutants permet de sélectionner celui qui aura la fonction désirée. Ni le choix des résidus, ni celui des mutations ne sont maîtrisés. De plus, cette technique demande le criblage d'un nombre important de mutants. La mutagénèse aléatoire est nécessairement utilisée lorsque la fonction ou la propriété de la protéine devant être améliorée n'est pas localisée dans le gène. Par contre, lorsque celle-ci est connue, il devient plus judicieux de faire appel à une méthode d'ingénierie dite « rationnelle ».

La modélisation de la structure tridimensionnelle de A13 étant possible, l'approche rationnelle va permettre de se focaliser sur les résidus constituant la poche catalytique. Une réflexion préalable est nécessaire pour cibler les résidus potentiels à la mutation et ainsi en restreindre le nombre. De plus, cette approche possède l'avantage de limiter le nombre de mutants à cribler.[161,194]

4.1 Sélection des résidus et proposition de mutations

La sélection des résidus est basée sur le modèle tridimensionnel de CYP153A13a. La structure de CYP153A7 issue de sa cristallisation est parue en 2012 et n'avait donc pas été publiée au moment de ces travaux.[182] Le modèle de A13 avait donc été obtenu en utilisant le logiciel Swiss Model avec comme matrice le cytochrome P450 CYP108 (référence PDB 1CPT) qui possèdait le plus fort pourcentage d'identité avec A13, soit 28 %. Ce modèle de A13 a permis d'identifier les résidus impliqués dans l'ancrage de la molécule d'alcane dans le site actif. Les acides aminés candidats à la mutation ont été sélectionnés selon plusieurs critères : localisation dans le site actif, hydrophobie, conservation au sein de la famille. Ainsi,

ont tout d'abord été retenus les acides aminés situés à moins de 6 Å de la molécule d'octane. En effet, on a considéré que les résidus situés à proximité du substrat possèdent un fort potentiel d'être impliqués dans son ancrage au sein du site actif. Le carbone terminal de l'octane étant la cible de l'oxydation, il n'a pas été pris en compte : autrement dit, les acides aminés à proximité du C-terminal n'ont pas été mutés afin d'éviter de déstabiliser les liaisons impliquées dans le positionnement de la partie terminale de l'alcane au sein du site actif, pour conserver la régiosélectivité pour l'oxydation terminale. Parmi les résidus sélectionnés, ceux possédant une interaction potentielle avec l'hème (situé à moins de 4 Å de l'atome de fer), n'ont pas non plus été retenus (Figure 45).

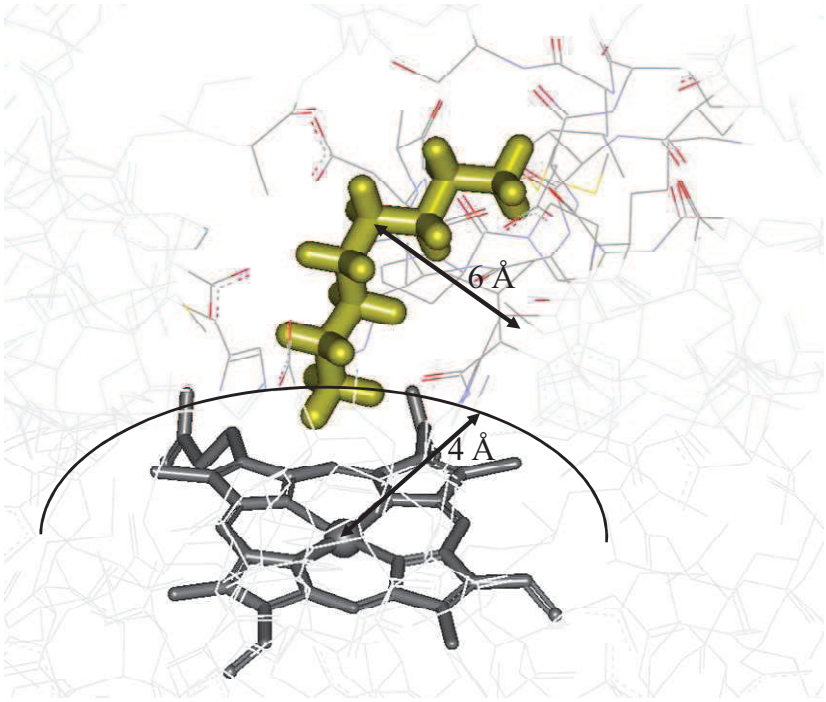


Figure 45 : Stratégie de sélection des résidus candidats à la mutation. Les résidus situés à moins de 6 Å de la molécule d'alcane (le C-terminal n'est pas pris en compte), et à plus de 4 Å du fer de l'hème sont sélectionnés et apparaissent en couleur sur la figure.

Pour chaque position sélectionnée, un seul résidu alternatif est proposé pour la mutagénèse. Les critères de choix concernent l'encombrement du résidu (plus important), et sa nature : le choix d'un acide aminé dont la taille de la chaîne latérale est supérieure à celle du résidu natif permet d'augmenter l'encombrement stérique dans la poche catalytique, et ainsi d'en réduire le volume pour permettre l'ancrage de plus petites molécules, tandis que le respect de la nature permet de garder l'hydrophobie qui caractérise le site actif de cette famille d'enzyme (Tableau 12).

Résidus A13 candidats à la mutation	Interaction avec l'hème	Mutation proposée (résidu hydrophobe de plus fort encombrement)
Met143	oui	Lys
Ala302	non	Val
Leu303	non	Ile
Val306	non	Leu
Gly307	non	Ala
Thr311	oui	Ser
Leu354	oui	Ile
Met357	oui	Ile
Phe455	non	-
Val141	non	Leu / Phe
Ile145	non	Phe
Leu304	oui	Phe
Gly308	oui	Ala
Cys418	oui	-
Phe455	non	-
Val456	non	Leu

Tableau 12 : Evolution moléculaire dirigée du site actif de A13red en vue de réduire son volume : sélection des résidus constituant le site actif et situés à moins de 5 Å (partie haute du tableau) ou entre 5 et 6 Å (partie basse du tableau) de la molécule d'octane. Les résidus sélectionnés pour la mutation sont en gras.

Finalement, sept résidus ont été sélectionnés pour être mutés : V141, I145, A302, L303, V306, G307 et V456 (Tableau 12, résidus en gras). Pour chacune des sept positions, deux possibilités ont été retenues : le résidu natif, et celui de taille supérieure. Les résidus du site actif situés entre 5 et 6 Å étant plus éloignés du substrat, des modifications avec des acides aminés plus encombrants peuvent être réalisées (partie basse du Tableau 12). Le résidu V141, le plus éloigné de la molécule d'alcane peut donc être muté soit par l'acide aminé d'encombrement stérique supérieur (leucine), soit par un résidu de taille encore supérieure, la phénylalanine (deux propositions de mutations ajoutées à la conservation du résidu natif). Le résidu F455 ne peut pas être muté contre un résidu de plus grande taille. Ainsi, en combinant les mutations proposées, dans le but de détecter d'éventuels effets synergiques entre les mutations, le nombre total de mutants d'élève à 192, ce qui reste tout à fait acceptable.

Parmi ces résidus, I145, L303 et G307 sont parfaitement conservés au sein des CYP153 (Tableau 13).

Résidu A13	Conservation (%)
Ala302	I (35), V(27), L(22), A(14), S(3)
Leu303	L(100)
Val306	V(97), I(3)
Gly307	G(100)
Val141	L(41), VA(8), IMR(5), SDGPYWTNQF(3)
Ile145	I(100)
Val456	V(72), I(22), L(6)

Tableau 13 : Conservation des résidus sélectionnés pour la mutation au sein de la famille des CYP153. Alignement réalisé avec 36 cytochromes P450 de la famille des CYP153 (ANNEXE 9).

L'étude de la conservation des acides aminés a été réalisée par alignement de séquences avec 36 membres de la famille des CYP153 (ANNEXE 9). Même si la fonction de ces résidus reste inconnue à ce jour, les résidus conservés jouent souvent un rôle prépondérant dans l'activité, ou dans la détermination de la nature du substrat accepté. Leur mutation permettra de mieux comprendre leur rôle.

D'après le modèle du site actif de A13, V141 et I145 se situeraient dans l'hélice B', à proximité de l'hème. A302, L303, V306 et G307 composeraient l'hélice centrale I qui borde le canal. V456 serait situé dans le feuillet β5 à l'entrée du site actif (Figure 46).

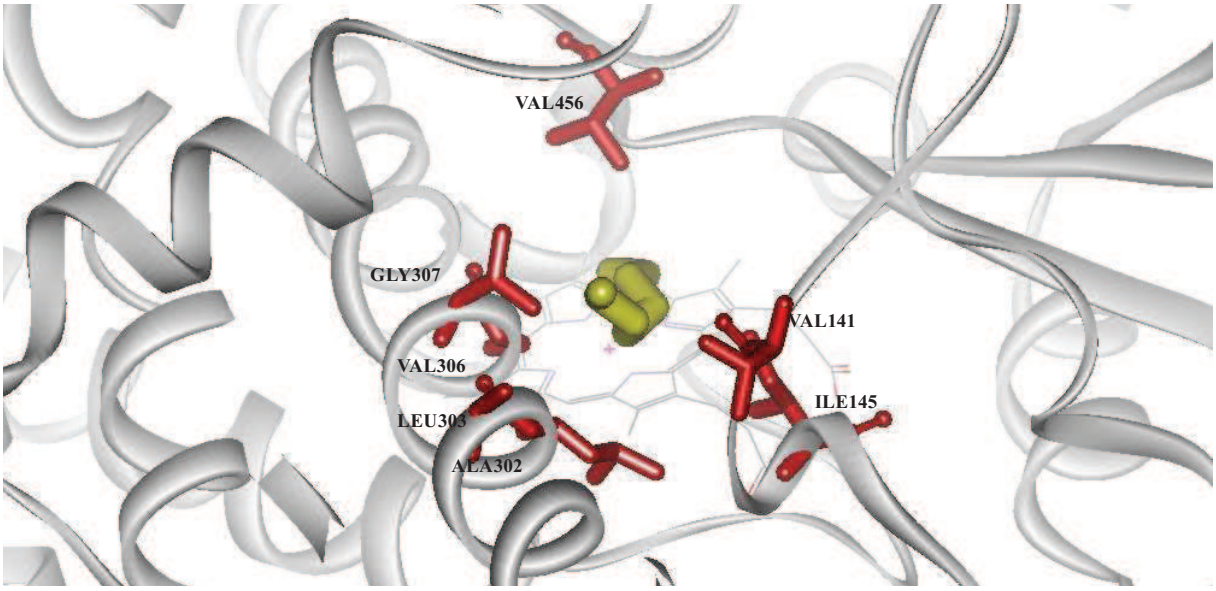


Figure 46 : Représentation tridimensionnelle du site actif de CYP153A13a. La molécule d'octane est représentée en jaune et les résidus sélectionnés pour la mutation en rouge. (Structure 3D de A13a obtenue avec le logiciel Swiss Model, disponible en ligne, et visualisée avec le logiciel Accelrys Discovery Studio Visualizer 2.5).

4.2 Création de la banque de mutants

4.2.1 Constitution de la banque de mutants

Il est communément admis que le nombre de mutants doit être triplé afin de couvrir 95 % de la banque. Si le nombre de mutants est de 192, il faudra donc cribler environ 600 clones pour que la banque soit couverte à 95 %. A ce jour, un total de 279 colonies a été obtenu. Afin d'être certain de couvrir l'ensemble de la variabilité génétique de la banque, il conviendra d'augmenter ce nombre à 600. Les gènes A13red contenant les mutations sont nommés A13m-red (« m » pour « muté »), insérés dans le plasmide pETred pour donner pETA13m-red. Les détails de la méthode de mutagénèse utilisée et de la création de la banque de mutants sont donnés au paragraphe II.16 de la partie expérimentale. Le nombre de clones à cribler reste relativement faible, mais il nécessite tout de même d'établir un système de criblage fiable.

Deux techniques de criblage de la banque ont été envisagées. Le premier criblage (criblage A) met en évidence les mutants capables d'oxyder les alcanes liquides. La deuxième méthode (criblage B), quant à elle, permet de cribler les mutants oxydant à la fois les alcanes liquides et gazeux.

4.3 Criblage A : oxydation terminale des alcanes liquides

Dans cette étude, on se propose de déterminer l'activité de chaque clone sur les alcanes liquides. L'enzyme A13red native étant déjà active sur ce type d'alcane (C_6-C_{12}), ce criblage pourra permettre de sélectionner les mutants avec une plus forte activité que l'enzyme native, ainsi que ceux capables d'oxyder le pentane.
La méthode de criblage doit être à la fois qualitative et quantitative. Elle sera d'autant plus avantageuse qu'elle est à la fois sensible, précise, rapide et faiblement coûteuse. La mesure de l'activité de A13red peut être réalisée par spectrophotométrie, en utilisant des méthodes directes ou indirectes. La méthode directe permet de déterminer en une unique étape l'activité de l'enzyme. Par exemple, ce type de méthode peut être utilisé lorsque le substrat ou le produit absorbe à une certaine longueur d'onde. Dans la réaction étudiée, il est possible de suivre la consommation du cofacteur NADPH par suivi de la densité optique à 340 nm. Ce test donne une première indication de l'activité de l'enzyme mais ne constitue pas à lui seul

un test fiable. En effet, en tenant compte du phénomène de découplage, il convient de lier cette méthode à la quantification de l'alcool formé, afin de connaitre précisément l'activité réelle de l'enzyme. Les alcools ne possédant pas de propriétés physiques particulières, la quantification directe de l'alcool formé par spectrophotométrie est impossible. La méthode utilisée est donc indirecte : elle fait intervenir une autre enzyme qui oxyde l'alcool en aldéhyde, laquelle est capable de réagir par la suite avec un troisième réactif pour former un produit coloré pouvant être suivi par spectrophotométrie. Les enzymes les plus couramment utilisées pour oxyder les alcools en aldéhydes sont l'alcool oxydase (AO), ou l'alcool déshydrogénase de levure (Y-ADH). Deux réactifs peuvent réagir avec les aldéhydes pour former un composé coloré : le MBTH, et le purpald. Les différentes étapes du criblage sont présentées Figure 47.

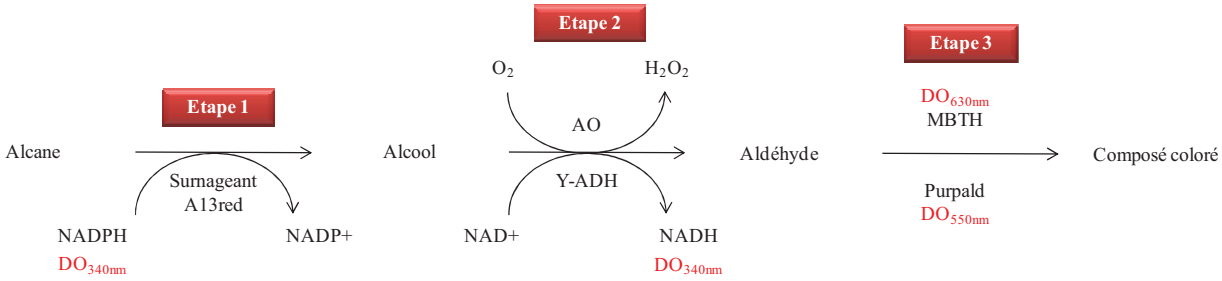


Figure 47 : Méthodes de criblage des clones capables d'oxyder les alcanes liquides.

Avant tout, il convient de tester le criblage sur un témoin positif pour s'assurer de son fonctionnement. Les études préliminaires s'attachent donc à optimiser les différentes étapes de criblage sur l'enzyme A13red native.

4.3.1 Conversion de l'alcane en alcool : suivi de la consommation du NADPH (Etape 1)

4.3.1.1 Principe du test

La première étape du criblage consiste en la mesure directe de la consommation du NADPH par A13red en suivant son absorption à 340 nm. Cette mesure constitue une première indication de l'activité de l'enzyme (Figure 48).

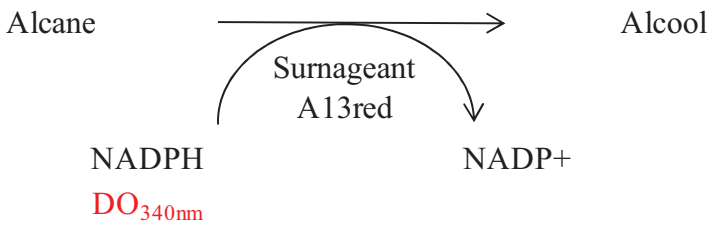


Figure 48 : Criblage A, étape 1 : suivi de la consommation de NADPH lors de l'hydroxylation de l'alcane par A13red.

Les réactions sont réalisées sur le surnageant de lyse (contenant toutes les protéines solubles synthétisées par *E. coli*), auquel sont ajoutés l'alcane à 4 mM dans l'éthanol (1% final), ainsi que le NADPH à 0,5 mM. Chaque test est complété par un témoin négatif, constitué par le surnageant issu des bactéries *E. coli* BL21*(DE3) non transformées. Ce témoin permet de voir si la consommation de NADPH est entièrement due à A13red et non à d'autres protéines synthétisées par *E. coli*, contenues dans le surnageant. Les mesures de disparition de NADPH sont répétées trois fois afin de vérifier la reproductibilité. La diminution de l'absorbance due à l'oxydation spontanée du NADPH en $NADP^+$ est retranchée à chaque test.

4.3.1.2 Influence de la nature du substrat sur la consommation de NADPH

Les premières mesures de disparition du NADPH ont été étudiées en présence de différents substrats. Ainsi, les consommations de NADPH par le surnageant contenant A13red sur un substrat naturel (l'octane), un substrat pour lequel A13red n'a pas montré d'activité (le pentane), et l'absence de substrat ont été comparés (Figure 49).

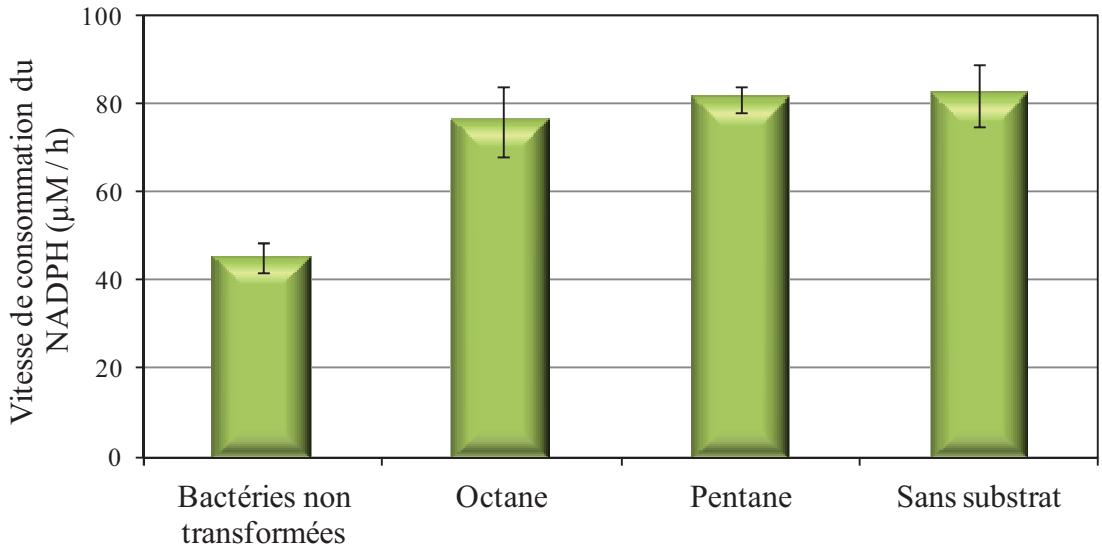


Figure 49 : Test d'activité des surnaeants de lyse des bactéries non transformées en présence d'octane, et transformées par A13red en présence d'octane, de pentane et sans substrat.

La vitesse de disparition du NADPH est 65 % plus rapide lors du test d'activité sur le surnageant contenant A13red, que sur le surnageant issu des bactéries non transformées, avec l'octane comme substrat. Cette différence est significative, malgré un bruit de fond (disparition du NADPH lors du test sur le surnageant des bactéries non transformées) très élevé, qui peut être dû à une ou plusieurs protéines d'*E. coli* qui consomment le NADPH, telle que la NADPH oxydase. Néanmoins, cette consommation de NADPH n'est pas liée à la présence de substrat puisque la différence d'activité entre l'octane, le pentane, et l'absence de

substrat n'est pas significative. Autrement dit, la vitesse de consommation du NADPH est la même quel que soit le substrat.

Ainsi, la comparaison des variations de DO_{340} entre les réactions avec l'octane et en l'absence de substrat montre que le découplage est de l'ordre de 100 %. Dans ces conditions, le taux de découplage lors des réactions avec l'enzyme purifiée étant d'environ 50 %, ceci pourrait confirmer l'hypothèse selon laquelle les électrons sont transférés vers un autre accepteur présent dans le surnageant et qui serait préférentiel. La purification des protéines A13red en microplaque pourrait aider à s'affranchir des protéines acceptrices d'électrons et à mesurer plus précisément la part de NADPH consommé. Il est aussi probable que le rapport de la quantité d'enzyme A13red sur la quantité de NADPH soit trop faible et favorise le phénomène de découplage, conduisant à la consommation d'une molécule de NADPH sans formation de produit. Cette première analyse ne constitue donc pas à elle seule une méthode de criblage fiable, notamment à cause du biais engendré par le découplage. De plus, ce suivi ne permet pas de s'assurer que l'oxydation de l'alcane a lieu en position C-terminale. Il convient donc de coupler ce premier test à un second permettant de quantifier la formation d'alcool.

4.3.2 Oxydation de l'alcool en aldéhyde (Etape 2)

Aucune méthode colorimétrique ne permet de déterminer directement la quantité d'alcool formé. Deux enzymes ont été sélectionnées pour leur capacité à oxyder les alcools en aldéhydes, plus aisément quantifiables par spectrophotométrie : l'alcool oxydase (AO) et l'alcool déshydrogénase de levure (Y-ADH). La première utilise le dioxygène, produit du peroxyde d'hydrogène et travaille à pH 7,5 (Figure 50a). La seconde nécessite l'apport de NAD^+. Son pH optimum est 8,8 (Figure 50b).

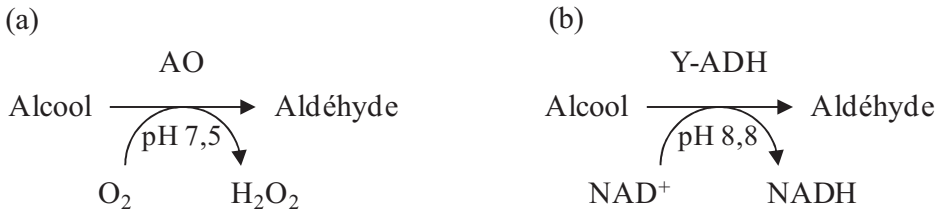


Figure 50 : Criblage A, étape 2 : oxydation de l'alcool en aldéhyde catalysée par l'alcool oxydase (a), et l'alcool désydrogénase (b).

Le recensement des avantages et des inconvénients de chacune des deux enzymes a permis d'orienter le choix.

Pour commencer, plusieurs avantages sont communs aux deux enzymes. Ainsi, toutes deux oxydent les alcools terminaux, et permettent donc un criblage régiosélectif. Aussi, même si leur activité est meilleure sur les alcanes à chaîne courte (méthanol, éthanol), elles agissent toutes les deux sur le pentanol, avec une activité comparable : 20 et 16 U / mL d'enzyme pour l'alcool oxydase et l'Y-ADH, respectivement (une unité oxyde une micromole de substrat en aldéhyde par minute). De la même manière, certains de leurs inconvénients sont comparables. En effet, elles présentent toutes deux une forte activité sur l'éthanol, utilisé comme co-solvant pour augmenter la solubilité de l'alcane dans le milieu réactionnel. Leur utilisation nécessite donc soit la mise en œuvre d'un autre co-solvant, soit de réaliser les réactions avec le substrat pur (réaction en milieu biphasique), ce qui est peu envisageable pour le pentane, dont la température d'ébullition est de 36 °C. De plus, l'une comme l'autre nécessitent la présence d'un second substrat : utilisation du dioxygène pour l'alcool oxydase, et du NAD^+ pour l'Y-ADH. Afin d'éviter d'une part la compétition enzymatique pour l'oxygène et l'inactivation du cytochrome par le peroxyde d'hydrogène formé par l'alcool oxydase, et d'autre part les interférences entre la consommation de NADPH par A13red et la production de NADH avec l'Y-ADH, il est nécessaire dans les deux cas d'attendre la fin de la réaction avec A13red pour commencer la suivante. Aucune des deux enzymes ne permet donc le piégeage de l'alcool en continu.

Certaines de leurs caractéristiques permettent toutefois de les discriminer. Alors que le pH optimal de l'alcool oxydase est le même que celui de A13red (7,5), celui de l'Y-ADH est de 8,8, nécessitant d'augmenter le pH du milieu réactionnel pour son fonctionnement. Par contre, la production de NADH par Y-ADH constitue un avantage, puisque son activité peut être suivie par spectrophotométrie à 340 nm. Enfin, le coût de l'alcool oxydase est 100 fois plus élevé que celui de l'Y-ADH.

La possibilité du double suivi de l'activité de l'Y-ADH par spectrophotométrie, ainsi que son faible coût par rapport à l'alcool oxydase ont orienté le choix vers son utilisation, malgré la contrainte de changement de pH. Le passage du milieu réactionnel de pH 7,5 à pH 8,8 peut être réalisé par l'ajout de soude. L'activité relative de l'Y-ADH à pH 7,5 est de 50 %. Il est donc aussi envisageable de ne pas modifier le pH et de doubler la concentration d'enzyme. Les premiers tests ont visé la conversion du pentanol en pentanal, en évaluant la quantité de pentanal formé.

4.3.3 Quantification de l'aldéhyde (Etape 3)

Les aldéhydes formés sont quantifiables par deux tests colorimétriques qui mettent en œuvre des réactifs différents : le MBTH et le purpald. Quelque soit la méthode choisie, le réactif interagit avec l'aldéhyde et forme un composé coloré, qui absorbe à 630 nm pour le MBTH et à 550 nm pour le purpald (les deux méthodes sont détaillées Figure 74 et Figure 75 dans la partie expérimentale).

4.3.3.1 Test de la méthode de criblage utilisant l'Y-ADH et le MBTH

Une comparaison entre le purpald et le MBTH montre que ce dernier est plus sensible pour la détection des aldéhydes.[195] Ce réactif a donc été choisi pour la quantification du pentanal. La méthode de criblage utilisant l'Y-ADH et le MBTH (Figure 51) a été évaluée en comparant les valeurs d'absorbance à 630 nm entre une première gamme de concentration en pentanal (Figure 52a) et une seconde gamme de concentration en pentanol, convertit en pentanal par l'Y-ADH (Figure 52c).

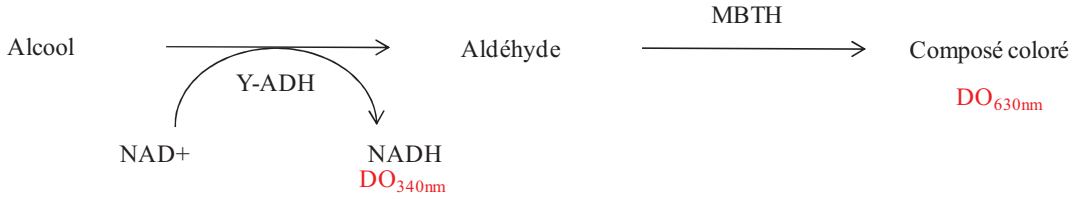


Figure 51 : Méthode de criblage utilisant l'Y-ADH et le MBTH.

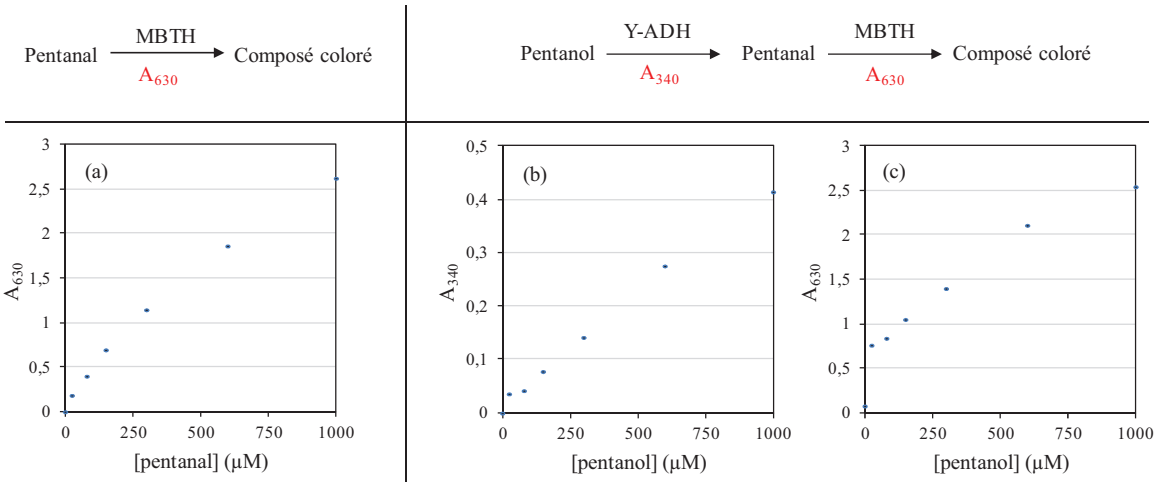


Figure 52 : Méthode de criblage utilisant l'Y-ADH et le MBTH : (a) Coefficient de réponse du MBTH en fonction de la concentration en pentanal. (b) Mesure de l'activité de Y-ADH sur le pentanol par suivi de la variation d'absorbance à 340 nm en 20 min (c) Coefficient de réponse du MBTH en fonction de la concentration en pentanol convertit en pentanal par l'Y-ADH.

La limite de détection du pentanal par la méthode avec le MBTH est de 1,6 µM, ce qui correspond à l'échelle de concentration d'alcool synthétisé par A13red lors des tests d'activité sur l'octane. Pour des concentrations en pentanol de 0 à 1000 µM, la quantité d'Y-ADH ajoutée dans le milieu est suffisante pour convertir la totalité de pentanol en 20 minutes.
D'autre part, le suivi de l'apparition du NADH à 340 nm en 20 minutes montre qu'il est possible de suivre l'activité de l'Y-ADH d'une seconde manière (Figure 52b). Les deux méthodes (mesure de la quantité d'aldéhyde formé et mesure de l'activité de l'Y-ADH) peuvent être utilisées ensemble et se compléter.

4.3.4 Conclusion sur la méthode criblage A

Le criblage A permet de quantifier le pentanol formé de manière tout à fait satisfaisante (la limite de détection est de 1,6 µM). La conversion de l'alcool en aldéhyde constitue l'étape sensible. En effet, il faut veiller à l'ajout d'Y-ADH en quantité suffisante afin qu'elle convertisse la totalité de l'alcool formé en aldéhyde.
Toutefois, ce criblage présente certains inconvénients, notamment le fait que le MBTH réagisse avec le tampon phosphate et le glycérol utilisés jusqu'à présent lors des tests d'activité. Ainsi, le tampon potassium phosphate contenant 10 % de glycérol a dû être changé contre un tampon Tris-HCl sans glycérol, ne permettant pas de garantir une aussi bonne stabilité des protéines au cours du temps. De plus, le MBTH réagit beaucoup mieux avec le formaldéhyde et l'acétaldéhyde qu'avec les aldéhydes de plus grande taille. La moindre trace de l'un ou l'autre de ces composés, ou d'éthanol (très bon substrat pour l'Y-ADH), peut conduire à l'obtention de faux positifs. Enfin, ce criblage n'est pas chimiosélectif : il n'est pas possible de savoir si l'aldéhyde vient d'une suroxydation du substrat par A13red, ou de la conversion de l'alcool par l'Y-ADH.
Ainsi, une deuxième méthode de criblage (criblage B) a été envisagée afin de pallier ces inconvénients. Elle a été développée par l'équipe de F. Arnold,[94] et permet d'éliminer l'étape de conversion de l'alcool en aldéhyde. A la différence du criblage A, cette méthode permet à la fois le criblage des alcanes liquides, ainsi que celui des alcanes gazeux.

4.4 Criblage B : oxydation terminale des alcanes liquides et gazeux

4.4.1 Utilisation d'éthers modèles

Ce test repose sur l'utilisation de substrats de type éthers méthyliques,[94,196] analogues aux alcanes qui, lorsqu'ils sont oxydés en position méthoxy-terminale, se réarrangent pour former du formaldéhyde et l'alcool terminal correspondant. Le formaldéhyde réagit avec le purpald ou le MBTH pour former un composé coloré, quantifiable par spectrométrie UV-visible (Figure 53).

Figure 53 : Criblage par l'utilisation d'un ether modèle (ici propyl methyl ether, mimant le pentane).

Les éthers présentent aussi l'avantage d'être liquides, et facilitent ainsi la réalisation des tests catalytiques en microplaque, en comparaison avec les alcanes gazeux pour lesquels la mise en œuvre de la réaction est plus complexe. Enfin, de la même façon qu'avec les alcanes, il est possible de suivre la disparition du NADPH, qui pourra renseigner du taux de couplage.

4.4.2 Oxydation de l'hexyl methyl ether

Tout d'abord, l'affinité de l'enzyme pour de tels substrats a été vérifiée. Il apparaît que l'hexyl methyl ether (HME, Figure 54), éther utilisé pour mimer l'octane, est bien accepté par l'enzyme native purifiée, avec une constante d'affinité du même ordre que pour l'octane (de l'ordre du micromolaire).

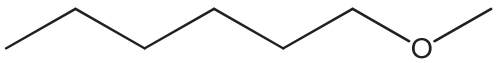


Figure 54 : Hexyl methyl ether (HME), substrat analogue de l'octane.

L'analyse par GC/MS des produits formés au cours de la réaction montre la présence de 1-hexanol, provenant du réarrangement du produit d'oxydation du HME, et traduit ainsi son oxydation par A13red avec une constante catalytique de 23 min^{-1}. Enfin, le suivi en parallèle de la consommation de NADPH montre que le taux de couplage est du même ordre que pour l'octane (50 %). Ces résultats préliminaires laissent donc envisager l'utilisation des éthers comme substrats analogues des différents alcanes.

Ces essais ont ensuite été reproduits en microplaque avec A13red native dans le surnageant de lyse. Nous avons pour cela étudié différents paramètres de culture et d'expression dans des conditions de volume de culture réduit (2 mL), afin d'assurer une production de protéines solubles et fonctionnelles.

4.4.3 Essais préliminaires de culture et d'expression d'A13red natif en microplaque

Afin d'étudier l'expression de A13red en microplaque, des tests préliminaires ont été effectués avec la souche *E. coli* BL21*(DE3) transformée par pETA13red natif.

4.4.3.1 Effet des paramètres de culture sur la croissance bactérienne

La transposition du protocole de culture établi pour la culture en erlenmayer (200 mL) vers la culture en microplaque (2 mL) n'engendre pas de différence significative au niveau de la croissance bactérienne (Figure 47) : environ 3,5 grammes de bactéries sèches obtenus par litre de culture dans les deux cas.

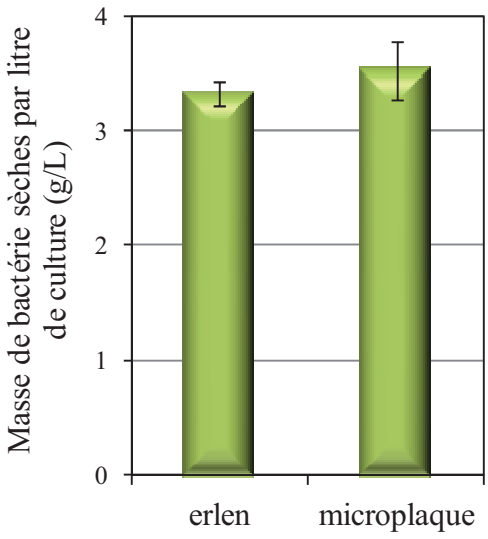


Figure 55 : Comparaison de la croissance bactérienne en erlenmayer (200 mL) et en microplaque (volume de culture de 2 mL) obtenus après 24 h de culture en conditions standards.

De la même manière que pour les cultures en erlenmayer et en fermenteur, la vitesse de croissance bactérienne est modulée par l'aération du milieu. La croissance est plus rapide lorsque l'oxygénation du milieu est meilleure, c'est-à-dire avec une forte agitation (250 rpm correspondant à la vitesse maximale d'agitation de l'incubateur), une inclinaison de la microplaque d'un angle de 30°, et un volume de culture plus petit (250 µL au lieu de 2 mL).
Le respect de ces conditions permet de recueillir une quantité maximale de bactéries, et par conséquent un maximum de protéines en un temps minimal. Toutefois, il est aussi important

de suivre et de contrôler la solubilité des protéines. C'est pourquoi, de la même façon que pour les cultures en flasque et en fermenteur, la solubilité de A13red a été étudiée en parallèle de la croissance bactérienne, pour chacun des paramètres cités.

4.4.3.2 Influence des paramètres de culture sur la solubilité de A13red

Les paramètres standards utilisés pour la culture en erlenmayer ont tout d'abord été mis en œuvre lors de la culture en microplaque. Toutefois, ces essais ont mené à la formation de corps d'inclusion pour la totalité des protéines. Différents paramètres ont donc été étudiés, dans le but de limiter la formation de corps d'inclusion et d'augmenter la fraction soluble. Ces paramètres englobent la culture (volume ensemencé, induction, milieux, température, temps, oxygénation), la production de protéines chaperonnes, et la lyse bactérienne. Pour chaque paramètre testé, la qualité de l'expression a été jugée par SDS-PAGE. L'intensité de la bande correspondant à A13red dans le surnageant comparée à celle dans le culot permet de déterminer l'influence de chaque paramètre sur la solubilité. Celle-ci est notée de – (non soluble) à +++ (très soluble) et reportée Tableau 14. Les protéines chaperonnes sont induites par l'ajout d'acide benzylique.[161]

Paramètres de culture	Solubilité
Erlenmeyer	
Standard (200 mL)	+
Microplaque	
Standard (2 mL)	-
Volume (250 µL à 5 mL)	-
Milieux TB, LB, FB ou Biosilta	-
Augmentation de l'oxygénation (Agitation plus forte et inclinaison de la microplaque)	-
Induction tardive (fin de phase exponentielle de croissance)[a]	-
Induction précoce (début de phase exponentielle de croissance) [b]	-
Concentration d'IPTG (0 à 0,25 mM)	-
Concentration d'ALA (0 à 2 mM)	-
Température de culture (37 ou 20 °C)	-
Induction de protéines chaperonnes	-

Tableau 14 : Effet des paramètres de culture sur la solubilité de A13red. Les conditions standard de culture sont détaillés dans la partie expérimentale, au paragraphe II.16.5.1.[a] Correspond à une DO_{600} = 1. [b] Correspond à une DO_{600} = 0,4.

Aucune des conditions testées en microplaque, une par une ou en combinaison, n'a permis d'augmenter la solubilité de A13red. A chaque fois, la protéine est retrouvée en très forte quantité dans le culot. L'évaluation de son niveau d'expression sous forme soluble est difficile, du fait que la bande relative à A13red en SDS-PAGE (91 kDa) pourrait correspondre à la taille d'une protéine synthétisée par *E. coli* BL21*(DE3), visible sur le contrôle du surnageant de la souche non transformée (Figure 32b, page 67).

Un Western Blot utilisant des anticorps anti-HisTag a été réalisé afin d'évaluer de manière plus précise la quantité de protéines synthétisées sous forme soluble. Quatre conditions ont été évaluées par Western Blot : standard, volume 250 µL, utilisation de protéines chaperonnes, absence d'induction à l'IPTG. Quels que soient les paramètres de culture, seule une infime fraction de A13red est présente sous forme soluble, et le niveau d'expression soluble est sensiblement le même (environ 1/1000). Tous les culots contiennent la protéine surexprimée principalement sous forme de corps d'inclusion, et ce même en absence d'induction à l'IPTG. Ainsi, l'opéron lactose n'est pas complètement réprimé. D'autre part, la présence d'une bande à 66 kDa possédant un HisTag indique qu'une partie de A13red a subit une protéolyse (environ 50 % du total de A13red soluble). Enfin, il n'a pas été possible de connaitre la quantité de cytochrome fonctionnel dans le surnageant par la technique du CO-binding. En effet, la fraction soluble n'étant pas suffisamment concentrée, aucun pic à 420 ou 450 nm n'a pu être observé, du fait d'un intense bruit de fond.

4.4.3.3 Temps d'expression

La variation des temps d'expression permet de vérifier si la formation de corps d'inclusion a lieu à un moment précis pendant l'expression. La culture a été stoppée à 1, 5, 7, et 24 h après l'induction. Les tests montrent qu'à aucun moment la protéine n'est synthétisée de manière soluble.

4.4.3.4 Conclusion

En microplaque, l'expression de A13red sous forme soluble reste problématique. Les variations des conditions de culture n'ont pas permis d'améliorer sa solubilité. De plus, la fuite de l'opéron lactose ne permet pas de contrôler l'expression de manière satisfaisante.

D'autres possibilités peuvent être envisagées pour augmenter la solubilité de la protéine. Il est possible de changer le système d'expression, et d'utiliser par exemple une autre souche bactérienne, ou la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Enfin, la co-expression de protéines chaperonnes[160] pourrait aider au repliement correct des protéines et par conséquent limiter la

formation de corps d'inclusion. Une autre solution pourrait être de limiter la protéolyse et de récupérer ainsi 50 % de protéines en plus. Pour cela, il convient d'utiliser des inhibiteurs de protéases. Des tests ont été réalisés avec le PMSF mais n'ont pas eu l'effet escompté. Un cocktail d'inhibiteurs pourrait augmenter le spectre d'action.

4.5 Conclusion

Par la mutagénèse dirigée du site actif de A13red, nous avions pour but de lui faire accepter des alcanes à chaîne plus courte que ses substrats naturels. En utilisant un modèle de la structure tridimensionnelle de A13, sept résidus ont été sélectionnés en fonction de leurs interactions avec l'hème et le substrat. Les mutations proposées concernent l'acide aminé hydrophobe de taille supérieure au résidu natif. Une banque de mutants a été créée. Toutefois, la production de A13red en microplaque se fait en grande partie sous forme insoluble et la quantité de protéines solubles est trop faible pour des résultats significatifs en test d'activité. En effet, une forte consommation de NADPH est observée, même en l'absence de substrat. La présence dans le surnageant de protéines acceptrices d'électrons, endogènes à *E. coli*, pourrait expliquer ce constat. Afin de s'en affranchir, il serait donc envisageable de purifier les protéines A13red par chromatographie d'affinité en microplaque. Une autre hypothèse serait un mauvais repliement de la protéine de fusion conduisant à la consommation du NADPH par la partie réductase, non couplée avec la formation de produit par le cytochrome. La purification en microplaque pourrait dans ce cas aussi éliminer cette consommation parallèle, puisque les protéines mal repliées ne seraient pas retenues sur la colonne.

Deux méthodes de criblage ont été présentées. N'ayant pas été décrite dans la littérature pour l'oxydation des alcanes, la première (criblage A) a été mise en œuvre dans un souci d'originalité. Toutefois, elle nécessite de multiples étapes et présente l'inconvénient de ne pas s'adapter au criblage des mutants capables d'oxyder les alcanes gazeux. Le deuxième criblage met en œuvre des éthers analogues aux alcanes. Il présente l'avantage de sélectionner les mutants permettant l'oxydation des alcanes gazeux, et limite les étapes nécessaires à la détection du produit. Enfin, la sensibilité du purpald et du MBTH est considérablement plus élevée sur le formaldéhyde que sur les aldéhydes à plus longue chaîne. Même s'il ne permet pas de cribler les mutants capables d'oxyder le méthane (pas d'éther mimant le méthane), le second test est donc plus convenable, puisqu'il mène à la formation de formaldéhyde quelque

soit le substrat utilisé, alors que le premier nécessite la quantification d'aldéhydes à plus longue chaîne carbonée.

En résumé, la faible solubilité des protéines produites en microplaque, ainsi que l'importance du bruit de fond mesuré lors de la quantification des produits formés n'ont pas permis de commencer le criblage de la banque de mutants. De plus, la publication début 2012 de la structure tridimensionnelle de A7[182] nous a permis de remodéliser A13. La comparaison des deux structures tridimensionnelles, la première obtenue à partir du cytochrome CYP108 (28 % d'identité avec A13) et la seconde à partir de la structure de CYP153A7 (51 % d'identité avec A13) montre que les résidus sélectionnés à partir du premier modèle ne sont pas tous pertinents (Figure 56). En effet, la chaîne latérale des résidus V141 et V456 ne pointent pas vers l'intérieur du site actif, et les résidus V141, A302 et V456 sont éloignés de plus de 6 Å de la molécule de substrat. Il est donc probable qu'ils ne soient pas impliqués dans l'ancrage du substrat dans le site actif. De plus, dans le nouveau modèle, les résidus I145, L303 et G307 sont situés à moins de 4 Å de l'hème. Ainsi, seul V306 correspondrait aux critères établis pour le choix des mutations. En l'absence de modèle cristallographique de A13 disponible, il paraît donc plus judicieux de sélectionner de nouveau les résidus potentiels à la mutation pour la création d'une nouvelle banque, à partir du second modèle.

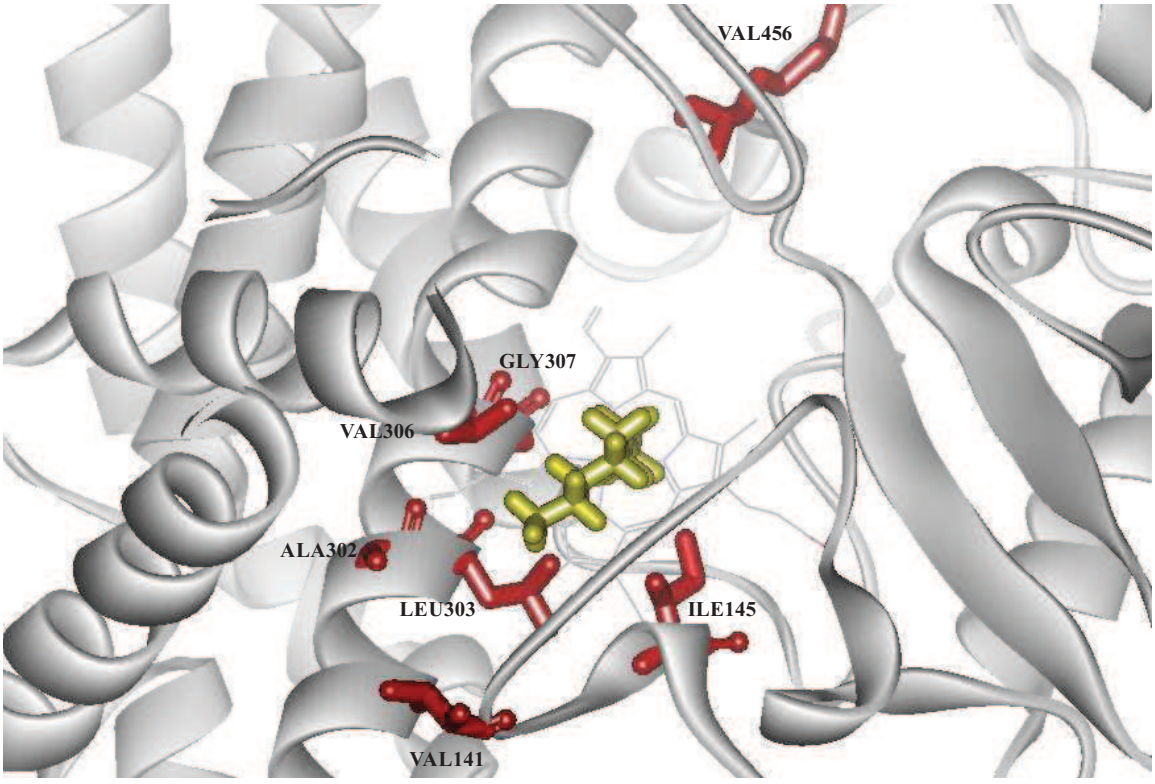


Figure 56 : Situation spatiale des résidus sélectionnés pour la mutation dans le deuxième modèle de A13. Visualisation réalisée avec le logiciel Accelrys Discovery Studio Visualizer 2.5.

CHAPITRE 5. INFLUENCE DES CONDITIONS REACTIONNELLES SUR L'ACTIVITE DE A13RED

Lors des tests catalytiques réalisés *in vitro*, l'activité de A13red a été limitée par plusieurs facteurs. Tout d'abord, le phénomène de découplage provoque la consommation non productive de NADPH et donc la perte d'électrons. La réaction s'arrête précocement car tout le cofacteur a été consommé. La conséquence de ce découplage est la production de peroxyde d'hydrogène, qui affecte la stabilité de l'enzyme. Sa stabilité est aussi affectée dans le temps : lors des réactions à 25 °C, A13red commence à précipiter au bout de 2 h. Enfin, l'activité est modérée par la faible solubilité des substrats en milieu aqueux, du fait de leur nature hydrophobe. Ceci a pour conséquence directe la limitation de leur diffusion dans le milieu, et donc de leur disponibilité. Ce chapitre détaille les stratégies mises en place pour remédier à ces limites. Les conditions ont été comparées entre elles par la mesure du nombre de turnover effectués par l'enzyme (TON) au bout d'un certain temps, indiqué pour chaque expérience.

5.1 Stabilisation de A13red

De par leurs propriétés physiques et/ou chimiques, certains composés peuvent interagir avec les protéines pour les stabiliser. Ils n'interviennent pas directement dans le mécanisme de la réaction d'oxydation, mais ils influencent la stabilité de l'enzyme, qui se répercute sur son activité. Par exemple, le glycérol et l'albumine de sérum bovin (BSA) sont des agents stabilisants couramment utilisés pour augmenter la stabilité des protéines lors de leur conservation, ou lorsqu'elles sont soumises à des conditions environnementales défavorables, comme de fortes températures, ou l'utilisation de solvants organiques.[149] L'influence de ces deux composés sur l'activité de A13red a été étudiée, ainsi que celle de la catalase, qui possède la propriété d'éliminer le peroxyde d'hydrogène produit lors du découplage. Le détail des conditions réactionnelles est indiqué au paragraphe II.11.3 de la partie expérimentale.

5.1.1 Effet du glycérol

Le glycérol est communément utilisé pour éviter la précipitation des protéines, et donc augmenter leur stabilité. L'ajout de 10 % de glycérol dans le tampon réactionnel double le nombre de turnover, qui passe de 45 à 95 au bout de 15 minutes de réaction (Figure 57).

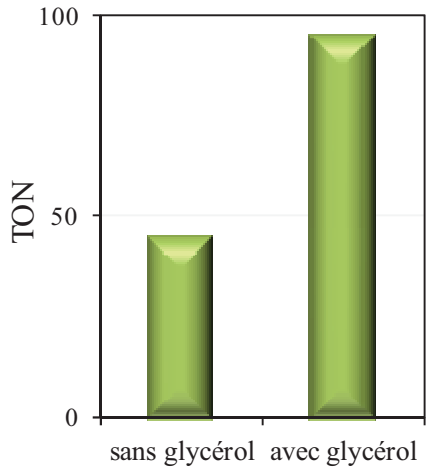


Figure 57 : Effet du glycérol (10 % dans le tampon réactionnel) sur l'activité de A13red. Les TON sont mesurés au bout de 15 minutes de réaction en système monophasique (voir paragraphe II.11.1 de la partie expérimentale).

La présence de glycérol dans le milieu réactionnel joue un double rôle.[197] Premièrement, il interagit au niveau des zones hydrophobes de la protéine qui deviennent exposées à la suite d'une dénaturation partielle. Il se comporte comme une molécule amphiphile à l'interface entre la zone hydrophobe et le milieu aqueux, et prévient ainsi leur agrégation. Deuxièmement, les caractéristiques électrostatiques du glycérol font qu'il s'oriente à la surface de la protéine de telle manière qu'il favorise son hydratation. Ceci influence une conformation plus compacte et stabilise la protéine.

5.1.2 Influence de l'albumine de sérum bovin

Les solutions protéiques diluées (< 1mg/mL) sont plus sujettes à la dénaturation et à l'inactivation que les solutions concentrées. En effet, les protéines ont tendance à se lier aux surfaces de verre et de plastique, qui composent la vaisselle utilisée pour les réactions catalytiques, par des interactions non spécifiques (hydrophobes et ioniques). L'ajout de protéines, qui n'interviennent pas dans la réaction, permet de diminuer ce phénomène : elles interagissent au niveau de ces surfaces et prennent la place des enzymes d'intérêt, dont la concentration dans le milieu est augmentée (Figure 58a). La protéine la plus couramment utilisée est l'albumine de sérum bovin (BSA).[149] L'influence de l'ajout de BSA, et de sa concentration (2 et 10 g/L), sur l'activité de A13red sont présentés en Figure 58b.

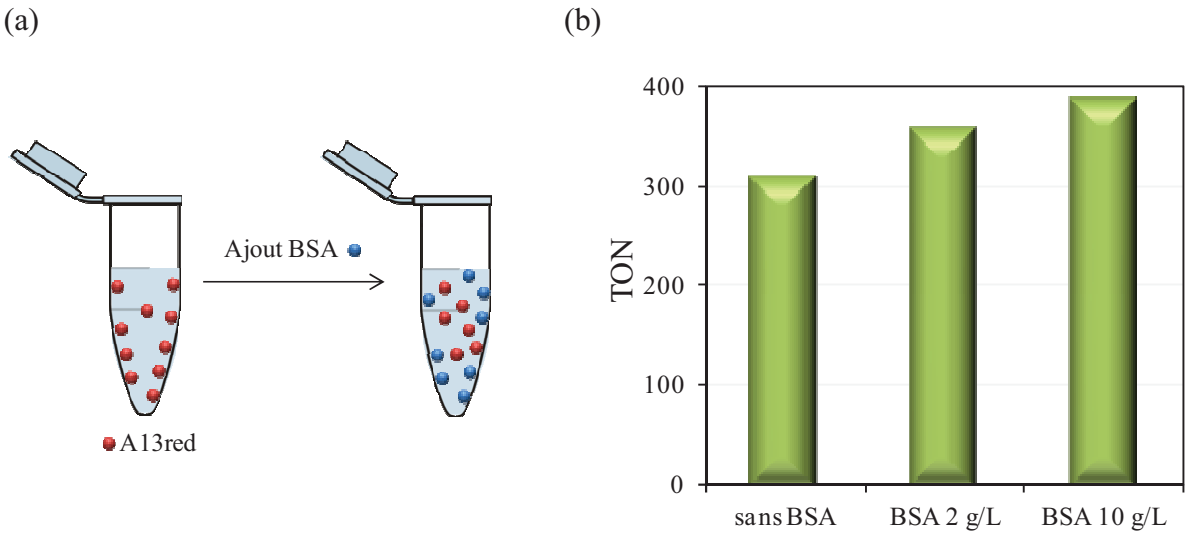


Figure 58: Effet de la BSA sur l'activité de A13red. (a) Schéma montrant les interactions des protéines avec la surface en polystyrène du microtube utilisé pour les tests catalytiques : la BSA prend la place des enzymes A13red, ce qui a pour effet d'augmenter la concentration de cette dernière en solution. (b) Nombre de turnover de A13red sur l'octane en fonction de différentes concentration en BSA dans le milieu réactionnel (TON calculés au bout de 2 h de réaction). Le milieu réactionnel est de type monophasique et contient 10 % de glycérol.

L'addition de BSA dans le milieu a un effet positif sur l'activité. Au bout de deux heures de réaction, le nombre de turnover est augmenté de 14 % avec 2 g/L de BSA et de 25 % avec 10 g/L. En empêchant A13red d'interagir avec les surfaces des récipients utilisés pour les réactions (en polystyrène dans notre cas), la BSA a permis d'augmenter la concentration de A13red dans le milieu réactionnel. Le nombre d'enzymes disponibles et actives est donc plus important et la probabilité de rencontre entre A13red et son substrat est améliorée.

5.1.3 Catalase

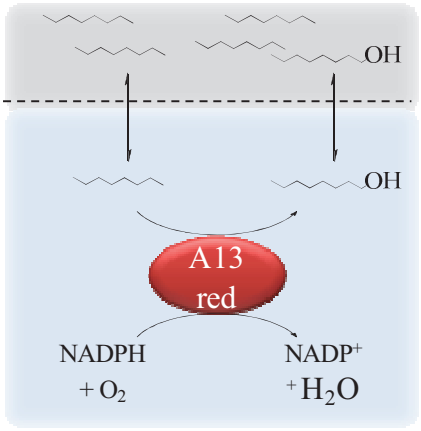
Lors des réactions sur l'octane, le pourcentage de couplage entre la consommation de NADPH et la production d'octanol est de 54 %. Ce pourcentage est inférieur pour les autres substrats testés. La voie principale de découplage mène à la production de peroxyde d'hydrogène, et l'accumulation de ce dernier dans le milieu conduit rapidement à l'inactivation de A13red (environ 2 h). Un système enzymatique de capture a donc été mis en place afin de l'éliminer en continu. La catalase convertit le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène, et son activité est maximale à pH 7 et à 25 °C, ce qui correspond aux conditions réactionnelles de A13red. Les effets combinés de la catalase (capture du peroxyde d'hydrogène et production de dioxygène dans le milieu) augmentent le nombre total de turnover effectués par A13red d'un facteur 1,5.

5.2 Disponibilité du substrat

De nature hydrophobe, les substrats de A13red sont peu, voire non solubles dans l'eau. A titre d'exemple, la solubilité de l'octane dans l'eau est de 10 µM, et la solubilité décroît avec la taille de la chaîne carbonée (8 µM pour le décane et 1 µM pour le dodécane, à 20 °C).[198] Cette faible solubilité est l'un des facteurs qui explique la fréquence de turnover relativement lente et les nombres de turnover totaux souvent bas fréquemment observés pour les P450 lors de réactions en milieu aqueux.[127] Afin d'augmenter la disponibilité du substrat, il est possible d'utiliser des co-solvants. Des études ont montré que les P450 sont relativement stables en leur présence.[199] L'éthanol a été choisi comme co-solvant (1 % v/v), et a permis d'augmenter la concentration de l'octane à 4 mM (contre 10 µM sans co-solvant). L'éthanol étant lui-même soluble dans l'eau, une seule phase est présente lors de cette réaction.

Cette réaction monophasique a été comparée à un système biphasique, dans lequel la phase aqueuse constitue le milieu réactionnel, et la phase organique forme à la fois un réservoir de substrat et un système de piégeage du produit (Figure 59a). La phase organique peut être composée d'un solvant dans lequel est dissout le substrat, ou du substrat lui-même. Ce type de système a permis d'atteindre des nombres de turnover totaux inégalés pour P450 BM-3 (TTN de 12850 avec le cyclohexane comme substrat, qui constitue également la phase organique).[149] Ryan *et al.* ont par ailleurs montré que la stabilisation des émulsions par l'ajout d'agents tensioactifs augmente l'activité de P450cam.[127] L'aire interfaciale est augmentée, et par conséquent le transfert de masse entre les deux phases est plus important. En plus des systèmes monophasique et biphasique, nous avons donc mis en œuvre un troisième système de type « biphasique émulsionné » (Figure 59b), dont les émulsions sont stabilisées à l'aide de tensioactifs de types anionique (sodium bis(2-éthylhéxyl) sulfosuccinate : AOT) et non ionique (Triton-X100).

(a) Système biphasique



(b) Système biphasique émulsionné

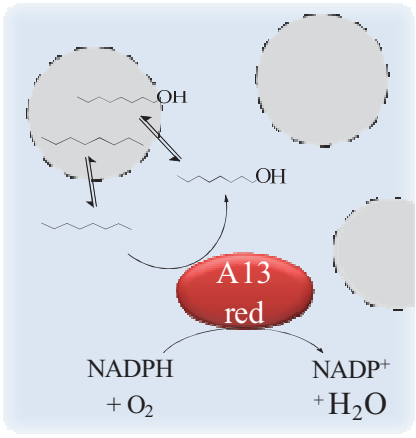


Figure 59 : Réactions en milieu biphasique (a) et biphasique émulsionné dont les émulsions sont stabilisés avec l'AOT ou le Triton X-100 (b). Inspiré de Maurer *et al.*, 2005[149]

Le passage du milieu réactionnel monophasique à biphasique, dont la phase organique est constituée d'octane pur, double le TON, qui passe de 95 à 184 au bout de 15 minutes de réaction (Figure 60). Ce résultat traduit d'une part que l'enzyme A13red semble relativement stable en présence d'octane, et d'autre part que l'augmentation de la quantité de substrat a un effet positif sur son activité. Il est possible que A13red se place à l'interface des deux phases, où le transfert de masse y est le plus important. De plus, certaines enzymes subissent une réorganisation structurale lorsqu'elles sont placées dans des solvants organiques apolaires et hydrophobes, qui peut conduire à un réarrangement du site actif, et par conséquent à un changement au niveau de leur activité ou de leur spécificité de substrat.[200] Dans le cas d'A13red, il se peut que le contact de l'octane induise ce type de réorganisation, et facilite l'entrée, ou l'ancrage du substrat au sein du site actif. La détermination des constantes de dissociation dans ce solvant permettrait de le déterminer.

Les réactions en milieu biphasique ont lieu sous une forte agitation afin de créer une émulsion. Cette émulsion a ensuite été stabilisée en ajoutant deux types d'agents tensioactifs : l'AOT et le Triton X-100. Dans les deux cas, l'activité de A13red est diminuée. Le TON (déterminé au bout de 15 minutes de réaction) passe de 184 à 5 avec l'AOT (5 % m/v) et à 56 avec le Triton X-100 (5 % v/v) (Figure 60). La présence de l'un ou l'autre de ces additifs semble donc déstabiliser A13red.

Des études ont montré que les agents tensioactifs peuvent interagir avec les protéines.[201,202] L'influence des ces agents sur l'activité peut être positif ou négatif, en fonction de la nature, ainsi que de la concentration de l'agent tensioactif. Dans le cas de A13red, un des postulats serait que la concentration des agents utilisés serait trop forte, ce qui induirait la formation de

micelles qui emprisonneraient l'enzyme et rendraient les sites actifs inaccessibles.[202] Il serait intéressant de faire varier la concentration de ces agents, ainsi que d'étudier l'influence d'un agent tensioactif cationique, comme le DoTAB sur l'activité de A13red.

Enfin, nous avons voulu tester l'influence d'un cosolvant apolaire sur l'activité de A13red. Nous avons pour cela choisi le diisopropyl éther, qui permet de solubiliser l'octane. La concentration finale en éther dans le mélange réactionnel est de 1 % (v/v). L'éther étant non soluble dans l'eau, le milieu réactionnel est biphasique. A13red semble être moins stable dans l'éther que dans l'éthanol, puisque le TON est de 45 contre 95 avec l'éthanol comme cosolvant. Il est aussi probable que la différence de TON soit due à la plus faible disponibilité de l'octane dans le milieu réactionnel lors de l'utilisation d'un cosolvant apolaire.

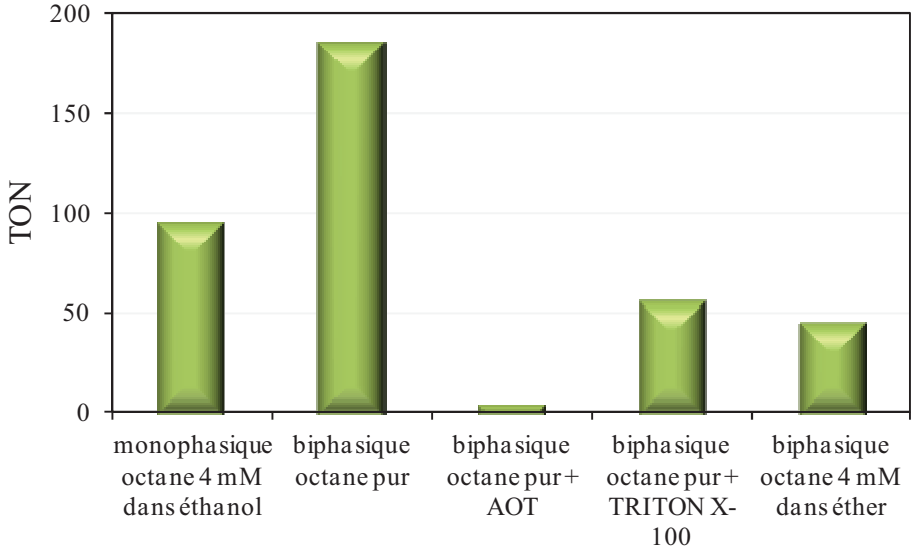


Figure 60 : Comparaison de l'activité de A13red en fonction du type de milieu réactionnel. La concentration en octane dans les milieux « monophasique » et « biphasique octane dans éther » est de 4 mM. Pour les milieux biphasiques, un rapport 1:1 est appliqué entre les volumes de la phase aqueuse et de la phase organique, sauf pour le milieu « biphasique octane dans éther » pour lequel l'éther représente 1 % (v/v) du volume total. En milieu monophasique, l'octane est dilué dans l'éthanol qui représente 1 % du volume total. Les TON sont calculés au bout de 15 minutes de réaction. Le milieu réactionnel contient 10 % de glycérol et 10 g/L de BSA.

5.3 Recyclage du cofacteur

Les réactions catalytiques réalisées *in vitro* présentent l'inconvénient majeur d'être limitées par l'apport du NADPH. Ce cofacteur est coûteux, et doit être apporté en quantités stoechiométriques si le taux de couplage est de 100 %. Dans le cas de A13red, qui possède un taux de couplage de 54 % avec l'octane, 1,85 mol de cofacteur seront nécessaires pour former 1 mol d'octanol. De nombreux systèmes sont capables de régénérer le NADPH à partir du $NADP^+$. Quelques exemples ont été donnés au Tableau 5 (page 40). Parmi eux, l'isocitrate

déshydrogénase (ICDH) est une enzyme peu coûteuse, qui travaille dans la même gamme de pH et de température que A13red et qui reste relativement stable dans le temps. Ces deux enzymes peuvent donc être utilisées en combinaison. De plus, le substrat sacrificiel demandé (l'acide isocitrique) est lui aussi peu coûteux et le produit formé (l'α-cétoglutarate) est non toxique. Le choix s'est donc porté sur celle-ci, même si d'autres enzymes de recyclage, de part leurs conditions de réactions proches de celles de A13red, auraient aussi été de bonnes candidates (par exemple la phosphite déshydrogénase). L'influence du système de recyclage sur le TON a été étudiée en comparaison avec deux réactions contenant des concentrations initiales en NADPH de 0,5 mM et 1 mM (Figure 61a). La concentration initiale de NADPH dans la réaction avec l'enzyme de recyclage est de 0,5 mM.

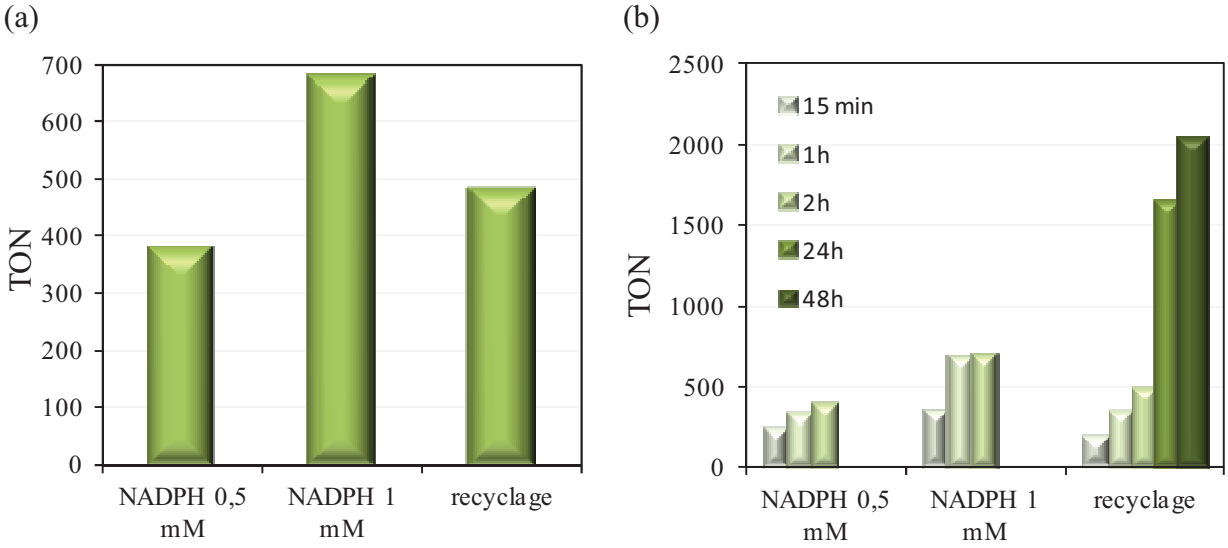


Figure 61 : Effet du système de recyclage sur l'activité de A13red. (a) Comparaison du nombre de turn over en 2 h de réaction. (b) Etude cinétique de l'influence de la concentration en cofacteur. Les réactions ont été effectuées en système biphasique octane pur, en présence de glycérol (10 %) et de BSA (10 g/L).

Jusqu'à 2 h de réaction, le nombre de turnover réalisé par l'enzyme est plus important lorsque la concentration initiale en NADPH est la plus haute (680 pour la réaction avec 1 mM) (Figure 61a). Sa plus forte disponibilité explique la meilleure activité. En présence de l'ICDH, le nombre de turnover s'élève à 485. La concentration initiale étant de 0,5 mM, le NADPH était moins disponible en début de réaction et le système de recyclage s'est mis en marche après qu'un minimum de $NADP^+$ ait été accumulé dans le milieu. Il est donc logique qu'en début de réaction (2 h), le nombre de turnover effectué par l'enzyme en présence de l'ICDH soit à la fois plus élevé qu'avec 0,5 mM de NADPH et plus faible qu'avec 1 mM.

La poursuite de la réaction sur un temps plus long (jusqu'à 48 h, Figure 61b) met en évidence l'effet de l'ICDH sur l'activité de A13red : alors que le nombre maximal de turnover est obtenu après 2 h dans le cas de la réaction avec 1 mM de NADPH, il continue d'augmenter

jusqu'à 48 h lors de l'utilisation du système de recyclage. De plus, le NADPH est relativement instable à température ambiante (la réaction se déroule à 25 °C). Son recyclage en continu évite donc son oxydation spontanée en $NADP^+$. En outre, ce test met en évidence que la limitation du nombre de réactions effectuées par A13red n'était pas seulement due à sa désactivation précoce par H_2O_2, mais aussi à un apport insuffisant de cofacteur.

La mise en commun des résultats de chaque test nous a permis de déterminer les conditions réactionnelles optimales, et a aboutit a un nombre de turnover d'environ 3000 en 48 h. Ce milieu est de type biphasique avec une phase aqueuse (contenant A13red, 10 % de glycérol, 10 g/L de BSA, la catalase, l'enzyme de recyclage ICDH, et son substrat) et une phase organique d'octane pur. L'agitation permet de créer une émulsion entre les deux phases. Dans ces conditions, il serait intéressant de poursuivre la réaction après 48 h afin de déterminer le nombre maximal de turnover (TTN) que peut effectuer l'enzyme jusqu'à sa désactivation.

5.4 Biocatalyse hétérogène

Dans le cadre de la stabilisation des enzymes, leur immobilisation sur un support peut être très favorable car il offre une protection face à des conditions parfois agressives du milieu réactionnel. Par exemple, l'encapsulation de P450 BM-3 dans une matrice sol-gel a permis d'augmenter son temps de demi-vie de 5 à 29 jours, à température ambiante.[121] En plus de l'encapsulation, deux autres méthodes d'immobilisation peuvent être employées : le "cross-linking", qui établit des liaisons entre les protéines afin de les agréger, et la liaison à un support, par adsorption physique, ou par liaisons ioniques ou covalentes.[131] Les supports siliciques poreux présentent des propriétés avantageuses : une grande surface spécifique, une forte stabilité physico-chimique, ils sont insolubles dans l'eau, recyclables et non toxiques. De plus, le diamètre de leurs pores est compatible avec la taille des enzymes.
Au-delà de l'augmentation de la stabilité des enzymes, l'immobilisation offre tous les avantages de la catalyse hétérogène : simplification de la séparation des produits, possibilité de réaliser la réaction en continu, recyclage du biocatalyseur.

5.4.1 Immobilisation sur monolithe silicique poreux

Il existe de nombreux matériaux poreux à base de silice.[203–205] L'immobilisation d'enzymes sur ce type de matériaux a été largement décrite du fait de leur compatibilité avec les conditions de réaction requises par les enzymes.

Les microréacteurs catalytiques en flux continu sont une approche permettant des procédés efficaces et viables, à la fois sûrs et écocompatibles. Trois types de réacteurs à flux ont été mis au point : les réacteurs à microcanaux parallèles, les réacteurs à lit fixe, et les monolithes. L'utilisation des monolithes permet de résoudre un certain nombre d'inconvénients physico chimiques tels que la dynamique des fluides, les chutes de pression, les transferts de masse et de chaleur, ainsi que la faible efficacité de contact, associés à l'utilisation de réacteurs conventionnels à lit fixe.[206] Les réacteurs monolithiques sont composés de canaux parallèles d'un diamètre compris entre 1 et 5 mm qui sont interconnectés par des pores entre 0,1 et 1 mm et sont utilisés principalement dans les réactions en phase gazeuse ou de combustion catalytique. Ils présentent donc une bonne stabilité thermique et mécanique.[206]

Des microréacteurs monolithiques originaux à base de silice ont récemment été développés au sein du laboratoire. Ils permettent des applications en synthèse chimique puisqu'ils présentent des caractéristiques plus adaptées. Ils sont constitués de macropores de convection d'environ 6 µm, interconnectés par des mésopores de 10 nm. La taille des pores est donc adéquate pour l'immobilisation d'enzymes. L'homogénéité et l'isotropicité du matériau permettent une diffusion rapide et minimisent la perte de masse au sein du monolithe (Figure 62). Ces monolithes ont été appelés « MonoSil ».[207]

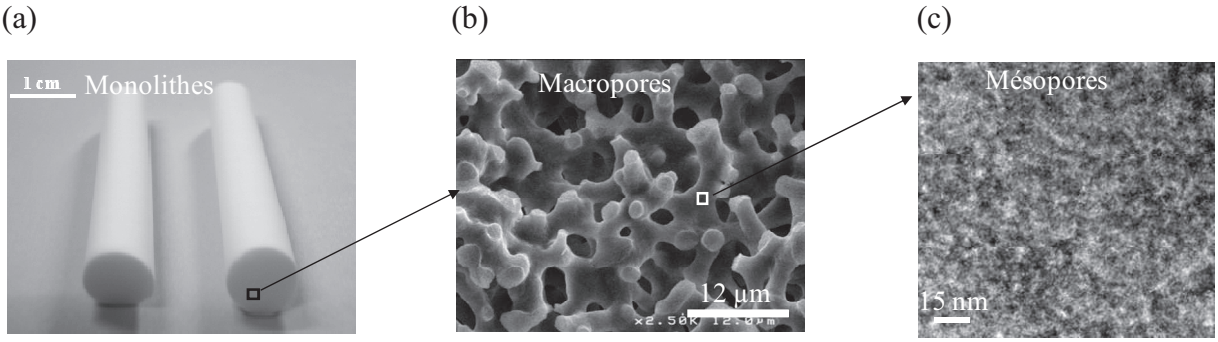


Figure 62 : Réacteur monolithique (MonoSil) macro/mésoporeux. (a) Photographie de deux monolithes (b, c) Images MEB à différentes échelles montrant les macropores (b) et les mésopores (c) de la structure. Adapté de Sachse *et al.*, 2010.[208]

La nature hydrophile des monolithes siliciques nous a permis d'immobiliser simplement A13red par adsorption. Les zones hydrophiles de la surface de A13red vont pouvoir interagir avec le matériau. De plus, la surface de A13red étant hydrophobe au niveau de l'entrée du canal du site actif, son accessibilité ne devrait donc pas être entravée par l'immobilisation.

L'analyse par spectrométrie UV visible des fractions récupérées après immobilisation et lavage du monolithe montre que 80 % de A13red ont été immobilisés. Le détachement de l'enzyme après application d'un flux de tampon dans le monolithe a été étudié par quantification de A13red en sortie du monolithe. La technique spectroscopique employée n'a

pas montré de trace de A13red, mais ce résultat reste peu précis du fait de la forte dilution de l'enzyme dans le tampon. Une analyse élémentaire permettrait de déterminer de manière plus rigoureuse la quantité de A13red toujours immobilisé dans le monolithe en fin de réaction. Cette analyse est nécessaire pour déterminer si la force de la liaison par adsorption est suffisante pour empêcher le détachement de l'enzyme (leaching) lors de l'application du flux.

5.4.2 Biocatalyse supportée en flux continu

Les microréacteurs monolithiques présentent l'intérêt de pouvoir être mis en œuvre pour des réactions en flux continu. Les produits peuvent alors être séparés des réactifs au cours de la réaction. Dans le cas de l'octane et de l'octanol, par exemple, il est possible de les séparer simplement par distillation. Des tests biocatalytiques ont été réalisés avec le monolithe contenant A13red immobilisée à 4 mg/g de monolithe. Le schéma du montage est présenté en Figure 63.

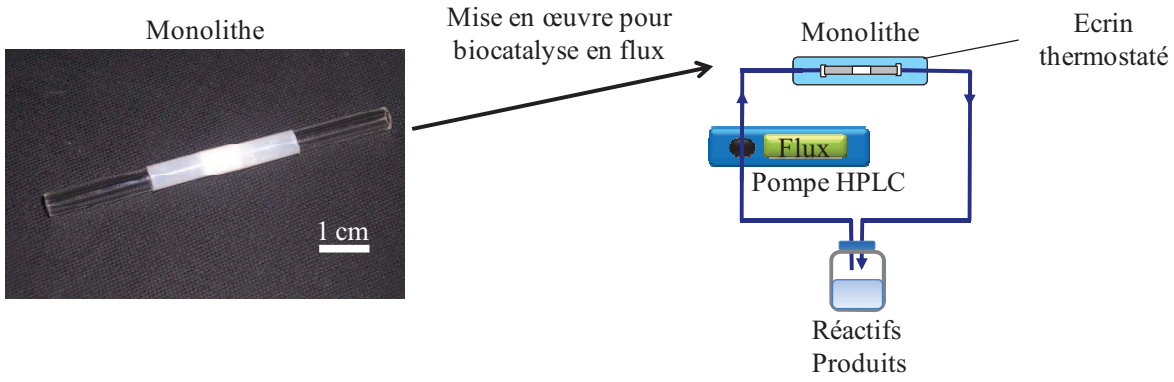


Figure 63 : Schéma de la mise en œuvre des tests biocatalytiques en flux continu. Les enzymes A13red sont immobilisées sur le monolithe, placé dans un écrin thermostaté.[206] Le flux de la pompe est de 0,1 mL.min^{-1}.

Aucun des tests n'a mené à la production d'octanol en quantité suffisante pour être détecté. Une des causes pourrait être la quantité trop importante de protéines dans le milieu (BSA, ICDH, catalase), dont l'ensemble bouche les pores du monolithe. A13red étant immobilisée, la BSA n'est plus nécessaire et son élimination du mélange réactionnel pourrait en améliorer la diffusion. De la même façon, il conviendrait d'immobiliser l'ICDH et la catalase sur le monolithe afin d'éviter leur agglomération à l'entrée du monolithe qui conduit au bouchage des pores.

De plus, la diminution du flux de la pompe permettrait de ralentir le passage du mélange réactionnel, et permettrait une meilleure diffusion des différents constituants à travers le monolithe. La diffusion pourrait aussi être améliorée en diminuant la viscosité du milieu, par la modification de la concentration en glycérol.

5.5 Conclusion

Le nombre de turnovers effectués par A13red en condition monophasique a été limité par différents facteurs, tels que sa faible stabilité, la disponibilité du substrat en milieu aqueux, ou encore un apport insuffisant de NADPH. Dans le but d'augmenter l'activité de A13red, nous avons tout d'abord comparé l'effet de différents agents stabilisants. Les ajouts de glycérol et de BSA ont eu pour conséquence une nette augmentation de l'activité (doublement de l'activité avec le glycérol et augmentation de 25 % avec la BSA). Afin d'augmenter la disponibilité du substrat, un système biphasique a ensuite été mis en place. La phase organique (octane) constitue un réservoir de substrat, et permet d'extraire le produit en continu. L'augmentation du nombre de turnover (TON) déterminé en un temps donné (ici en 15 minutes), quasiment le double de celui obtenu en système monophasique, témoigne que la présence de ce solvant ne semble pas impacter la stabilité de A13red.
Les ultimes modifications du système ont eu pour but d'augmenter le nombre total de turn over (TTN), effectué par A13red jusqu'à sa désactivation. Le système de recyclage (ICDH) et la catalase ont eu l'effet escompté puisqu'ils ont permis d'étendre la réaction à 48 h (les tests n'ont pas été continués au-delà), pour atteindre un nombre de turnover d'environ 3200. La poursuite des tests sera orientée vers de l'étude de la stabilité de l'ICDH dans le temps. Il aurait par ailleurs été intéressant de tester une deuxième enzyme de recyclage, la phosphite désydrogénase qui utilise comme substrat sacrificiel le phosphite et produit du phosphate.[123] En utilisant un tampon phosphite (au lieu du tampon potassium phosphate), ce système présenterait l'intérêt de limiter le nombre de produits à séparer en fin de réaction.

Les monolithes siliciques poreux sont des supports prometteurs pour l'immobilisation de A13red. Les premiers résultats d'adsorption physique montrent un rendement d'immobilisation de 80 % (correspondant à 4 mg/g de monolithe). Le procédé biocatalytique en flux continu doit être optimisé, notamment en diminuant la complexité du mélange réactionnel par élimination de la BSA et par co-immobilisation de l'ICDH (ou de la phosphite déshydrogénase) et de la catalase. Une concentration plus faible en glycérol devrait diminuer la viscosité du mélange réactionnel et favoriser sa diffusion à travers les pores du monolithe.
D'autre part, une analyse plus précise de la quantité d'enzyme se détachant du support lors de l'application d'un flux devra être effectuée. Dans le cas où ce phénomène serait mis en évidence, la présence de l'étiquette histidine pourrait être exploitée pour l'immobilisation de A13red sur des supports poreux échangés au nickel. Ce type d'immobilisation par liaison

covalente permettrait d'augmenter la force de la liaison de l'enzyme à son support par rapport à l'adsorption, et d'éviter la perte d'enzyme par leaching. De nombreux matériaux poreux peuvent être échangés au nickel (monolithe silicique, MCM-41, etc), ce qui multiplie considérablement le choix du support.

Une autre technique d'immobilisation d'enzyme par liaison covalente est le greffage par le glutaraldéhyde. Celui-ci nécessite la fonctionnalisation du support par une fonction amine. Le glutaraldéhyde réagit avec la fonction amine du support et la fonction amine du résidu N-terminal de l'enzyme, et crée ainsi un lien covalent (Figure 64). Cette technique a l'avantage d'éloigner l'enzyme du support, ce qui assure l'accessibilité du site actif.

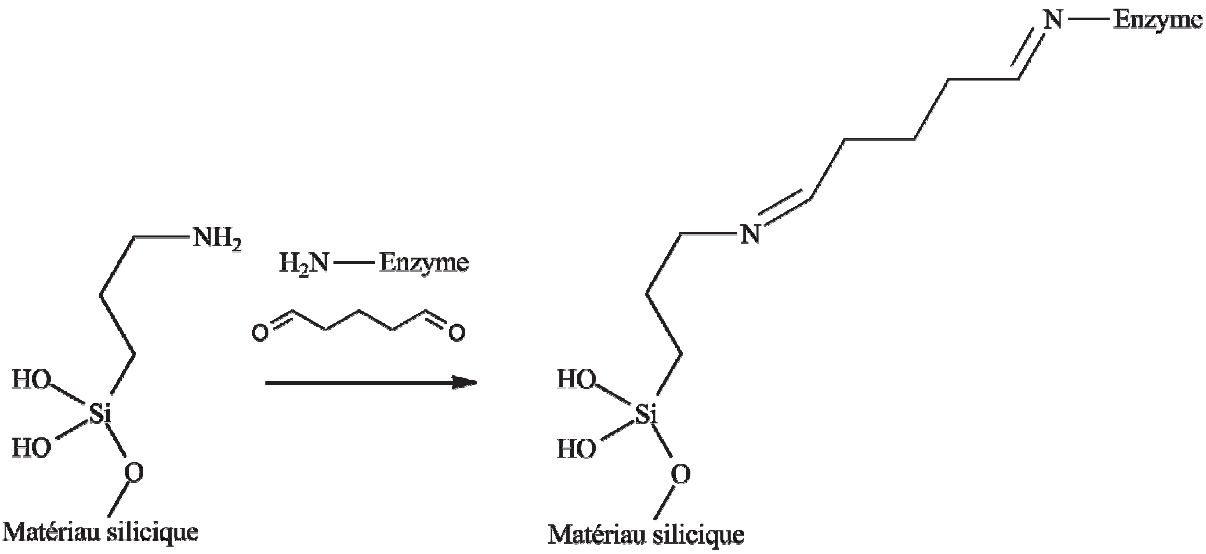


Figure 64 : Greffage d'une enzyme sur un support silicique par le glutaraldéhyde.

Enfin, il serait possible d'optimiser l'orientation des enzymes lors de leur adsorption, de telle manière que l'entrée du site actif soit dirigée vers l'opposé du support, donc vers le milieu réactionnel, pour maximiser son accessibilité. En effet, en tirant parti de la nature hydrophobe des résidus situés à l'entrée du canal, on pourrait pratiquer l'immobilisation en présence d'un solvant hydrophobe. Ainsi, les enzymes s'orienteront de telle manière que la zone hydrophobe soit située vers le solvant, et les zones hydrophiles vers le support.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La valorisation des hydrocarbures intéresse un nombre toujours plus important d'équipes scientifiques, autant au niveau fondamental pour l'intérêt que représente la rupture catalytique de la liaison C-H, qu'industriel pour la production de composés de plus haute valeur ajoutée.

Pour l'oxydation des alcanes en alcools, nous avons choisi de privilégier l'oxydation douce en utilisant l'oxygène moléculaire, et d'élaborer un procédé respectant les principes de la chimie verte. Nous avons pour cela exploité la voie enzymatique, qui a l'avantage de fonctionner en condition aqueuse, à température ambiante et à pression atmosphérique.

Le biocatalyseur développé présente une fusion artificielle entre un cytochrome CYP153, choisi pour ses propriétés naturelles d'hydroxylation des alcanes, et la partie réductase du cytochrome P450RhF. La fusion a été réalisée au niveau génétique pour trois cytochromes de la famille CYP153 : A1 d'*Acinetobacter* sp. EB104, A6 de *Mycobacterium* sp. HXN-1500 et A13 issu d'*Alcanivorax borkumensis*. Les gènes de fusion ont été insérés dans le plasmide pET28b. Après transformation, *E. coli* BL21*(DE3) est capable d'exprimer les enzymes de fusion A1red, et A13red à des niveaux de solubilité différents : alors que la totalité de A1red est synthétisée sous forme insoluble, l'expression de A13red sous forme soluble est restée faible mais suffisante pour nous avoir permis de la caractériser et d'étudier son activité *in vitro*. Nous avons tenté d'augmenter la solubilité de ces deux enzymes en étudiant l'influence de différents paramètres de culture et d'expression tels que le type de milieu, son aération, les paramètres d'induction, etc., mais aucune des conditions testées n'a eu d'effet notable. En ce qui concerne A6red, malgré l'étude de différentes conditions de culture et d'expression, son expression est restée problématique. Face aux résultats catalytiques prometteurs qu'a montré A6 à l'état non fusionné,[78] nous envisageons de poursuivre les études sur l'optimisation des conditions de culture et d'expression d'A6red, voire de changer de système d'expression si nécessaire, en utilisant par exemple la levure.

Le nouveau biocatalyseur A13red a été caractérisé, et il a été montré que la fusion ne change pas l'affinité du CYP153A13 pour les alcanes à chaîne moyenne. Les tests catalytiques *in vivo* et *in vitro* effectués sur les alcanes de C_5 à C_{12} nous ont permis de déterminer ses constantes catalytiques et son activité : cette enzyme est active sur les alcanes de C_6 à C_{12} avec une meilleure activité sur l'octane. Viennent ensuite, par ordre d'activité décroissante, le décane, le cyclohexane, l'hexane, et le dodécane. Une propriété remarquable de cette enzyme est sa sélectivité : l'hydroxylation a lieu en position terminale à plus de 99 %

et aucun produit de suroxydation n'a été détecté. La comparaison des activités déterminées par l'équipe de Funhoff sur A13 non fusionné avec nos résultats avec A13red montre que la fusion a augmenté l'activité : la fréquence de turnover d'hydroxylation de l'octane passe de 0,01 à 57 min^{-1}.[12,209] L'impact de la fusion peut être expliqué par deux phénomènes : (i) une meilleure stabilité de A13red comparé à A13 non fusionné, et (ii) un transfert d'électrons plus rapide entre la réductase et le cytochrome. Malgré la fusion, il persiste un taux de découplage (consommation de NADPH sans formation de produit) non négligeable : 54 % du NADPH consommé mène à la formation d'octanol, et seulement 1 % à la production de dodécanol. Ceci met en évidence un transfert d'électron non optimal entre les deux partenaires. Ce phénomène de découplage pourrait être diminué en optimisant la longueur du lien peptidique qui relie la réductase au cytochrome. L'activité sur le pentane, le butane, le propane et l'éthane n'a pas été suffisante pour permettre leur détection. Nous avons par contre pu remarquer une activité sur le méthane, mais les résultats ne sont pas reproductibles. Ceci pourrait s'expliquer par un changement du lot d'enzyme entre les différents tests : les activités de chaque lot diffèrent considérablement, et ce problème de reproductibilité a été attribué à l'absence de maîtrise des paramètres de culture et d'expression lors de la production d'A13red en flasque. La production de A13red par un procédé de culture haute densité en fermenteur est d'ores et déjà en cours, et permet la maîtrise de ces paramètres. Nous espérons ainsi, d'une part, nous affranchir de la variabilité entre les lots d'enzymes, et d'autre part produire des quantités suffisantes d'enzymes pour pouvoir reproduire les tests sans changement de lot. Ceci devrait nous permettre de pallier les problèmes de reproductibilité.

Encouragés par les résultats obtenus sur les alcanes à chaîne moyenne, nous avons poursuivi ce travail par l'ingénierie de A13red afin de changer sa spécificité de substrat vers les alcanes à chaîne plus courtes. Pour cela, nous avons modifié son site actif par mutagénèse dirigée en vue de réduire son volume, pour permettre l'ancrage de plus petites molécules d'alcanes. Nous avons conservé la nature hydrophobe des acides aminés composant la poche catalytique, et nous avons sélectionné les résidus qui interagissent potentiellement avec la molécule d'alcane pour permettre son ancrage. Nous n'avons pas touché aux acides aminés proches du carbone terminal (moins de 5 Å), pour conserver la régioselectivité de l'enzyme, ni aux résidus situés à proximité du noyau hème (moins de 4 Å), afin de ne pas modifier la stabilité du centre hémique dans la structure protéique. Une banque d'environ 200 mutants a ainsi été créée. Les résidus ont été sélectionnés grâce à un modèle de A13 basé sur la structure cristallographique du CYP108, possédant 28 % d'identité avec A13. Au moment de ces

travaux, ce cytochrome était celui possédant le plus fort pourcentage d'identité avec A13, dont la structure cristallographique était disponible. La publication plus tardive de la structure de CYP153A7 (51 % d'identité avec A13) nous a permis de comparer les deux modèles de A13, le premier basé sur l'alignement avec CYP108 et le deuxième avec CYP153A7. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que sur les sept résidus sélectionnés à partir du premier modèle, six n'étaient pas pertinents selon le second modèle (trop loin de la molécule d'alcane pour pouvoir intervenir dans son ancrage, trop proche du noyau hème…). Le criblage de la banque n'a donc pas été réalisé. Bien que la composition en acides aminés des sites actifs des différents membres de la famille des CYP153 reste relativement proche,[12] nous avons choisi d'attendre la structure issue de la cristallographie de A13 pour créer une nouvelle banque, afin d'éviter de sélectionner des résidus inappropriés. La cristallisation de A13 est actuellement en cours.

Dans l'attente du modèle et de la création de la nouvelle banque de mutants, deux cribles ont été mis au point. La première méthode procède en deux étapes : l'alcool est tout d'abord convertit en aldéhyde par l'action de l'alcool déshydrogénase de levure, et l'aldéhyde est quantifié par colorimétrie après réaction avec le MBTH. Le deuxième criblage utilise des éthers méthyliques analogues des alcanes. Leur oxydation terminale forme un hémiacétal qui se réarrange pour former du formaldéhyde et l'alcool correspondant. Le formaldéhyde réagit avec le MBTH ou le purpald pour former un composé coloré, quantifiable par spectrophotométrie. Ces deux cribles sont capables de renseigner sur le taux de couplage puisqu'il est possible de suivre en parallèle la consommation du NADPH.
L'efficacité de ces méthodes a été évaluée avec l'enzyme A13red native, en utilisant l'octane comme substrat. La faible solubilité de l'enzyme dans le surnageant de lyse des bactéries n'a pas permis de détecter l'activité avec les méthodes mises au point : le suivi du NADPH s'est avéré impossible car il est oxydé par une autre enzyme présente dans le surnageant et/ou tranféré à un autre accepteur, et la faible solubilité de A13red lors de son expression en microplaque n'a pas permis de détecter l'activité. Nous envisageons de poursuivre les études de culture en microplaque pour augmenter le niveau d'expression et la solubilité, ou de purifier les protéines directement en microplaque pour pouvoir suivre la consommation de NADPH uniquement due à l'activité de A13red.

Parallèlement au travail de mutagénèse dirigée, nous avons mis en évidence les facteurs réactionnels qui limitaient l'activité de A13red : faible stabilité dans le temps,

problème de disponibilité du substrat dû à sa faible solubilité dans l'eau, inactivation précoce du cytochrome par le peroxyde d'hydrogène produit lors du phénomène de découpage, et concentration limitante en cofacteur.
Nous avons cherché à nous affranchir de ces limites, ou à les empêcher d'impacter l'activité. Pour cela, nous avons mis en place un nouveau système réactionnel de type biphasique afin d'augmenter la disponibilité du substrat, et utilisé un système de recyclage du cofacteur afin que la réaction ne soit pas stoppée par l'entière consommation du NADPH. L'ajout de glycérol et de BSA dans le milieu a contribué à augmenter la stabilité de l'enzyme, tout comme l'introduction de la catalase qui convertit le peroxyde d'hydrogène en oxygène, et évite ainsi l'inactivation précoce du cytochrome.
Finalement, la combinaison de ces différentes stratégies a permis d'atteindre un nombre de turnover d'environ 3200 pour l'oxydation de l'octane en octanol.

Face à ces résultats intéressants, nous envisageons de poursuivre le développement de biocatalyseurs pour l'oxydation des alcanes avec de nouvelles fusions entre d'autres cytochromes de la famille CYP153 (A3, A4, A9 et A11) et la partie réductase de P450RhF. De cette façon, nous espérons créer une boîte à outil permettant de couvrir une large gamme d'alcane en vue de leur hydroxylation. D'un point de vue fondamental, la comparaison des activités de ces cytochromes, mis en parallèle avec la structure de leur site actif, permettra en outre de mieux comprendre leur fonctionnement et les facteurs qui influencent leur spécificité, leur sélectivité, ainsi que leur activité. Enfin, il serait intéressant d'élargir le concept de A13red en créant une triple fusion avec une enzyme de recyclage du NADPH, et créer ainsi un système complètement autonome.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Matériel

I.1 Produits et réactifs

Tous les produits et réactifs ont été fournis par Sigma-Aldrich, tous les gaz par Air Liquide, sauf indication contraire (liste ci-dessous).

Produit / Réactif	Fournisseur
TAE 50X	Bio-Rad
Marqueur de poids moléculaire (SDS PAGE)	Fermentas
Marqueur de poids moléculaire (gel d'agarose)	Bio-Rad

I.2 Solutions et tampons

I.2.1 *Tampons*

- Tampon de bioconversion pH 7,4
  - KPi 50 mM
  - Glycérol 10 %

- Tampons pour la purification à l'imidazole

  Tous les tampons sont prérefroidis dans la glace.

  - Solution de nickel : $NiSO_4$ 400 mM
  - Binding Buffer pH 7,4 : Imidazole 10 mM ; NaCl 500 mM ; KPi 50 mM
  - Washing Buffer pH 7,4 : Imidazole 60 mM ; NaCl 500 mM ; KPi 50 mM
  - Elute Buffer pH 7,4 : Imidazole 1 M ; NaCl 500 mM ; KPi 50 mM

- Tampons pour la purification à l'histidine (adapté de Maurer *et al.* , 2003)[121]
  Tous les tampons sont prérefroidis dans la glace.

- Solution de nickel	$NiSO_4$	400 mM
- Binding Buffer pH 7,4	NaCl	800 mM
	KPi	50 mM
- Lavage A pH 6,2	NaCl	800 mM
	KPi	50 mM
- Lavage B pH 7,4	Glycine	250 mM
	NaCl	800 mM
	KPi	50 mM
- Elution A pH 7,4	L-Histidine	80 mM
	NaCl	800 mM
	KPi	50 mM
- Elution B pH 7,4	L-Histidine	Saturé (~2 M)
	NaCl	800 mM
	KPi	50 mM
• Tampon de lyse pH 7,4	KPi	50 mM
	NaCl	500 mM
	Glycérol	10 %
	Triton X-100	1 %
	PMSF	1 mM
	Lysozyme	0,25 mg/mL
	DNase I	0,5 mg/mL
• Tampon de conservation pH 7,4	KPi	50 mM
	Glycérol	10 %

I.2.2 *Solutions pour gel de polyacrylamide*

- Gel de migration 12 %	H_2O	5,1 mL
	Tris HCl 1,5 M pH 8,8	3,75 mL
	SDS 10 % (m/v)	150 µL
	Acrylamide/bis (30 % / 0,8% m/v)	6 mL
	Persulfate d'ammonium	75 µL

		TEMED	15µL
-	Gel de concentration 5%	H_2O	5,7 mL
		Tris HCl 0,5 M pH 6,8	2,5 mL
		SDS 10 % (m/v)	1,7 mL
		Acrylamide/bis (30 % / 0,8% m/v)	100 µL
		Ammonium persulfate	50 µL
		TEMED	10 µL
-	Tampon de migration 5X	Tris-HCl pH 8,5	15 g /L
		Glycine	72 g /L
		SDS	5g /L
-	Solution de coloration	Acide orthophosphorique	2 % (v/v)
		Sulfate d'ammonium	6 % (v/v)
		Bleu de Coomassie	0,1 % (m/v)
		SDS	2 % (m/v)
		β-mercaptoéthanol	5 % (v/v)
-	Solution de décoloration	H_2O	50 %
		Ethanol	40 %
		Acide acétique	10 %

I.2.3 *Solutions pour gel d'agarose*

-	TAE (50X) pH 8,3	Tris-HCl 2 M	2M
		Acide acétique 1 M	1M
		EDTA 50 mM	50 mM
-	Agarose (1, 1,2 ou 2%)	Agarose	10, 12 ou 20 g/L
		TAE	1X
		BET	0,0025 % (m/v)
-	Tampon de charge (6x) pH 7,5	Bleu de bromophénol	0,25 %
		Sucrose	40 %

I.3 Milieux de culture

Tous les milieux sont autoclavés 20 minutes à 121 °C, puis conservés à 4 °C.

Afin de les rendre sélectifs, ils sont additionnés d'un antibiotique (kanamycine ou ampicilline, 100 mg. L^{-1}). Les milieux solides sont obtenus par addition de 20 g. L^{-1} d'agar (Fluka).

I.3.1 *Milieu Luria Bertani (LB)*

Ce milieu est utilisé pour les précultures d'*E. coli*. Il contient :

- Tryptone 10 g. L^{-1}
- Extrait de levure 5 g. L^{-1}
- NaCl 10 g. L^{-1}

I.3.2 *Milieu Terrific Broth (TB)*

Ce milieu est utilisé pour la culture et l'expression de protéines recombinantes dans *E. coli*. Il contient :

- Tryptone 12 g. L^{-1}
- Extrait de levure 24 g. L^{-1}
- K_2HPO_4 9,4 g. L^{-1}
- KH_2PO_4 2,2 g. L^{-1}
- Glycérol 8 mL. L^{-1}

Le pH est ajusté à 7,4.

I.3.3 *Milieu SOC*

Ce milieu est utilisé pour la régénération des cellules d'*E. coli* après leur transformation par choc thermique ou par électroporation. Il est fournit par Invitrogen avec les cellules compétentes. Il est composé de :

- Tryptone 20 g. L^{-1}
- Extrait de levure 5 g. L^{-1}
- NaCl 10 mM
- KCl 2,5 mM
- $MgCl_2$ 10 mM
- $MgSO_4$ 10 mM
- Glucose 20 mM

Ce milieu est conservé à – 80 °C.

I.3.4 *Milieu SOB*

Ce milieu est utilisé pour la production de bactéries électrocompétentes. Il contient :

- Tryptone 20 g. L^{-1}
- Extrait de levure 5 g. L^{-1}
- NaCl 10 mM
- KCl 2,5 mM

I.3.5 *Milieu 2YT*

Ce milieu est utilisé pour la culture de C41(DE3). Il contient :

- Tryptone 16 g. L^{-1}
- Extrait de levure 10 g. L^{-1}
- NaCl 5 g. L^{-1}

I.3.6 *Milieu synthétique FB*

Ce milieu est utilisé pour les cultures en fermenteur. Sa composition est la suivante[153] :

- K_2HPO_4 14,6 g. L^{-1}
- $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 4 g. L^{-1}
- $(NH_4)_2SO_4$ 2,5 g. L^{-1}
- Na_2SO_4 2 g. L^{-1}
- Na_2H-citrate$\cdot 1{,}5H_2O$ 1,1 g. L^{-1}
- NH_4Cl 0,5 g. L^{-1}
- $MgSO_4$ (1M) 2 mL
- Thiamine (100 g. L^{-1}) 1 mL
- Glucose / glycérol 5 g. L^{-1}
- Solution stock A 3 mL

La solution stock A contient :

- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 380 mg. L^{-1}
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 180 mg. L^{-1}
- $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 180 mg. L^{-1}
- $CuSO_4 \cdot 6H_2O$ 150 mg. L^{-1}
- $MnSO_4 \cdot H_2O$ 100 mg. L^{-1}
- Na_2-EDTA$\cdot 2H_2O$ 22,2 mg. L^{-1}

- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 16,7 mg. L^{-1}

Cette solution stock A est filtrée à 0,22 µm avant d'être ajoutée au milieu FB.

I.3.7 *Solution stock pour l'induction*

- IPTG 1000X 0,1 M
- 5-ALA 1000X 0,6M

Les solutions stocks sont filtrées à 0,22 µm et stockées à -20 °C.

I.4 Enzymes et kits commerciaux

Produits	Fournisseurs
Kits de biologie moléculaire	Qiagen
Kit de quantification H_2O_2 PeroXOquant	Pierce
Kit de quantification protéique par BCA	Thermo Scientific
Enzymes de restriction	Life Technologies SAS, Promega, Invitrogen
T4 DNA ligase	Promega, Invitrogen
DNase I	Sigma
Lysozyme	Fluka
Alcool oxydase (*Pichia pastoris*)	Sigma
Alcool déshydrogénase (*Saccharomyces cerevisae*)	Sigma
Catalase	Sigma
KOD Hot start DNA polymerase	Novagen

I.5 Souches bactériennes

La souche *E. coli* DH5α chimiocompétente (Invitogen) a été utilisée pour les manipulations génétiques, et les souches *E. coli* BL21 Star™ (DE3) chimiocompétentes et C41(DE3) (Invitrogen) pour l'expression protéique. Les génotypes sont les suivants :

DH5α : F- φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17(r_k^-, m_k^+) *pho*A s*up*E44 *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1 λ^-

BL21 Star™(DE3) : F- *ompT hsdS*B (rB-mB-) *gal dcm rne131*(DE3). Identifiée par la suite BL21*(DE3).

C41(DE3) : Génotype identique que BL21*(DE3) avec les modifications décrites par Miroux et Walker, 1996.[163] La souche contient une mutation non caractérisée qui prévient la mort cellulaire associée à l'expression de protéines recombinantes toxiques.

La souche *Alcanivorax borkumensis* SK2 (DSM 11573) a été obtenue de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ).

I.6 Plasmides

Le vecteur pCom12-$P_{A1}F_{200}R_{1500}$ contenant le gène du cytochrome CYP153A1 a été fournit par le professeur Rachel Austin de l'Université de Caroline du Nord (USA).

Le vecteur pET28b(+)-PikC-RhFRed contenant le gène de la partie réductase de P450 RhF[114] a été fournit par D. Sherman de l'Université du Michigan (USA).

Le vecteur pCom8A6* a été fournit par B. Witholt, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Suisse.

Le plasmide pET-28b(+) a été fournit par Novagen et pGEM-T easy vector par Promega. Les cartes de restriction sont données à la Figure 65.

(a) (b)

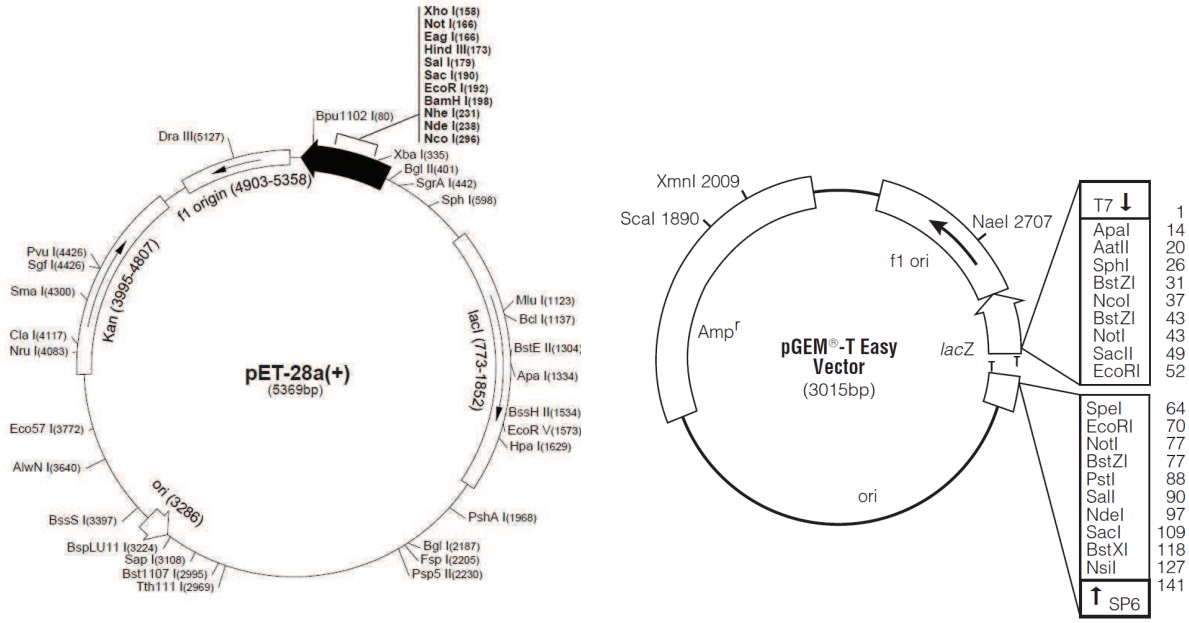


Figure 65 : Carte de restriction des plasmides commerciaux utilisés pour les clonages. (a) Carte du plasmide pET-28a(+) : le plasmide pET-28b(+) (5368 pb), utilisé dans ces travaux, possède une paire de base en moins en position 198 ; (b) Carte du vecteur pGEM-T Easy.

II. Méthodes

II.1 Biologie moléculaire

II.1.1 *Amorces*

Les amorces ont été synthétisées par Invitrogen. Leur séquence est donnée dans le Tableau 15.

n°	Amorce	Séquence (5'→3')	Tm[a] (°C)
1	Eco887 fw	ATCAATCGTCCTTTGGAGTTCATTGGTAATCTC	56
2	Eco887 rv	GAGATTACCAATGAACTCCAAAGGACGATTGAT	56
3	RhFred rv	GAGTGCGGCCGCTCAGAGTCGCAGGGCCAG	67
4	RhFred rv2	TAATGCGGCCGCTCAGAGTCGCA	56
5	RhFred rv3	ATCGTATCTAGATCAGAGTCGCA	48
6	153A1 fw	ATCGCATATGATGAACTCAGTCGCGGAGAT	57
7	153A1 rv	CGATGAATTCCGCTTTGGCAGTCAGTTTGA	57
8	A1LINK fw	ACTGCCAAAGCGGAATTCGTGCTGCACCGG	62
9	A1LINK rv	CCGGTGCAGCACGAATTCCGCTTTGGCAGT	62
10	153A6 fw	ATCGCATATGATGACCGAAATGACGGTGGC	58
11	153A6 rv	CGATGAATTCGGCGTTGATGCGCACGGGCA	62
12	A6LINK fw	CGCATCAACGCCGAATTCGTGCTGCACCGG	63
13	A6LINK rv	CCGGTGCAGCACGAATTCGGCGTTGATGCG	63
14	153A13a fw	GTAGCTCATATGTCAACGAGTTCAGT	52
15	153A13a rv	TACAGCGAATTCTTTTTTAGCCGTCAA	50
16	A13LINK fw	ACGGCTAAAAAAGAATTCGTGCTGCACCGG	58
17	A13LINK rv	CCGGTGCAGCACGAATTCTTTTTTAGCCGT	58
18	141BTC145WTC fw	GCCTGTCGBTCGAAATGTTCWTCGCTATGGATCC	61
19	145GAW141GAV rv	GGATCCATAGCGAWGAACATTTCGAVCGACAGGC	61
20	302GYA303MTA fw	CTGATCAATCGTCCTTTGGAGTTCATTGGTAATCTC GYAMTATTGATT	61
21	303TAK302TRC rv	AATCAATAKTRCGAGATTACCAATGAACTCCAAAG GACGATTGATCAG	61
22	306KTA307GSA fw	TTGATTKTAGSAGGTAATGACACCACGCGTAACTC AATGAGC	62

Tableau 15 : Amorces utilisées pour les différentes amplifications. [a] Tm : Température d'hybridation des amorces données par le logiciel BioMath Calculators disponible en ligne sur le site de Promega (http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm).

n°	Amorce	Séquence (5'→3')	Tm[a] (°C)
23	307TAM306TSC rv	GCTCATTGAGTTACGCGTGGTGTCATTACCTSCTA MAATCAA	62
24	302GYA303MTA306307 fw	TTCATTGGTAATCTCGYAMTATTGATTKTAGSAGG TAATGACACCAC	61
25	307TSC306TAM303302 rv	GTGGTGTCATTACCTSCTAMAATCAATAKTRCGAG ATTACCAATGAA	61
26	456KTA fw	GCGTGCAATCGAACTTTKTACGGGGCTATTCCAAG	61
27	456TAM rv	CTTGGAATAGCCCCGTAMAAAGTTCGATTGCACGC	61

Tableau 15 (suite). Amorces utilisées pour les différentes amplifications.

II.1.2 *Stratégie globale de clonage des gènes d'intérêt*

Cette partie II.1.2 présente la stratégie globale de clonage des différents gènes (RhFred, A13, A1 et A6). Le détail des protocoles utilisés pour chacun d'eux fait l'objet de paragraphes indépendants (respectivement *II.1.3, II.1.4, II.1.5 et II.1.6*).

Le gène d'intérêt a tout d'abord été amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR, matériel : Mastercycler personal, Eppendorf), puis purifié par le kit « QIAquick PCR Purification kit » (Qiagen). Le gène et le vecteur sont ensuite digérés par les enzymes de restrictions adéquates, et purifiés par le kit « QIAquick PCR Purification kit » (Qiagen) et leur concentration déterminée par spectrophotométrie à 260 nm (biophotomètre 6131, Eppendorf). Pour les réactions de ligation, un rapport molaire de 3:1 entre l'insert et le vecteur (typiquement 150 ng d'insert pour 50 ng de vecteur) est respecté.

Après transformation de la souche appropriée, le plasmide est extrait par le kit QIAprep Miniprep ou Midiprep (Qiagen), et la présence du gène est contrôlée par PCR en utilisant les amorces bordant le gène d'intérêt. Le résultat de l'amplification est analysé sur gel d'agarose. Le plasmide est stocké à -20 °C et la construction plasmidique est séquencée chez Eurofins (MWG operon). La souche est stockée à -80 °C dans le milieu de culture contenant 50 % (v/v) de glycérol. Les protocoles des différentes techniques utilisées sont détaillés ci-dessous.

II.1.2.1 Technique d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Le mix réactionnel est composé comme suit :

Réactifs	Quantité finale
Tampon 10 X pour KOD	1 X
$MgSO_4$ 25 mM	1,5 mM
dNTP (2 mM de chaque)	0,2 mM de chaque
H_2O stérile	qsp 50 µL
Amorce sens (10 µM)	0,3 µM
Amorce antisens (10 µM)	0,3 µM
Matrice	10 ng de plasmide ou 100 ng d'ADN génomique
KOD Hot Start DNA Polymerase (1U/µL)	0,02 U/µL

Les conditions de thermocyclisation sont les suivantes :

1. Activation de la polymérase — 95 °C, 2 min
2. Dénaturation — 95 °C, 20 s
3. Hybridation — Tm de l'amorce, 10 s
4. Extention — 70 °C, 30 s

Les étapes 2 à 4 sont répétées 30 fois.

II.1.2.2 Digestion par les enzymes de restriction

Les digestions ont été effectuées conformément aux recommandations du fournisseur. Le mix de réaction contient 1 µL de chaque enzyme de restriction, 2 µL de tampon 10 X, 1 µg de l'ADN à digérer, complété avec de l'eau stérile pour atteindre 20 µL. La réaction de digestion a lieu à 37 °C pendant 4 h, puis les enzymes de restriction sont inactivées à 65 °C pendant 20 minutes.

II.1.2.3 Ligation

Les réactions de ligation ont été effectuées conformément aux recommandations du fournisseur de la T4 DNA ligase (Invitrogen). La composition du milieu réactionnel est la suivante :

Réactifs	Quantité
Tampon de réaction pour la T4 DNA ligase 5 X	4 µL
Plasmide digéré	50 ng
Insert digéré	150 ng
T4 DNA ligase	0,1 u
H_2O stérile	qsp 20 µL

La réaction a lieu pendant 4 h à température ambiante.

II.1.2.4 Analyse de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

La préparation d'ADN est mélangée à du tampon de charge et cette solution est analysée sur gel d'agarose à voltage constant (100 V) dans du tampon TAE (1X). Les fragments d'ADN sont visualisés sous irradiation UV (254 nm) du gel obtenu et les tailles des fragments sont estimées par rapport au marqueur de taille utilisé.

II.1.2.5 Transformation par choc thermique

Les bactéries chimiocompétentes (100 µL) sont décongelées dans la glace puis l'ADN (mélange de ligation, plasmides) est ajouté à la suspension qui est incubée 30 minutes dans la glace puis 1 minute à 42 °C et 2 minutes dans la glace. 900 µL de milieu SOC sont ajoutés puis la suspension est incubée une heure à 37 °C sous agitation (225 rpm). La suspension est ensuite centrifugée 5 min à 2500 x *g*. Le culot est repris dans 200 µL de SOC et étalé sur une gélose du milieu approprié.

II.1.2.6 *E. coli* électrocompétentes (Méthode SEM, Inoue et al., 1990)[210]

Les souches BL21*(DE3) et DH5α chimiocompétentes ont été rendues électrocompétentes selon le protocole suivant :

La souche est striée sur gélose LB et incubée une nuit à 37 °C. Trois à cinq colonies isolées sont inoculées dans 100 mL de milieu SOB liquide sans magnésium et incubées sous agitation pendant 15 h à 37 °C. Un litre de milieu SOB est inoculé par un volume correspondant à 5-7 unités de DO à 550 nm de cette préculture, et incubé à température ambiante jusqu'à obtenir une DO à 550 nm de 0,8. La culture est refroidie à 4 °C pendant 30 min, centrifugée à 2500 *g* pendant 15 minutes à 4 °C. Le culot est resuspendu dans de l'eau stérile froide (200 mL à 4 °C), et de nouveau centrifugé à 2500 *g* pendant 15 minutes à 4 °C. Cette opération est répétée deux fois. Le culot est resuspendu dans une solution aqueuse stérile et froide (200 mL, 4 °C) contenant 15 % (v/v) de glycérol et 2,5 % (m/v) de D-sorbitol. Cette suspension est aliquotée

par fractions de 100 µL qui sont directement congelées à –80 °C. Les bactéries sont ensuite transformées par électroporation (voir paragraphe suivant).

II.1.2.7 Transformation par électroporation

Les bactéries électrocompétentes sont décongelées dans la glace et l'ADN y est ajouté. La suspension subit une décharge électrique à 1800 V grâce à un électroporateur. Un volume de 900 µL de milieu SOC est ajouté et la suspension est transférée dans un tube à centrifuger et incubée 1 h à 37 °C sous agitation (225 rpm), puis centrifugée 5 minutes à 2500 *g*. Le culot est repris avec 100 à 200 µL de milieu SOC et étalé sur gélose LB supplémenté en antibiotique si besoin.

II.1.3 *Clonage du gène P450Rhred*

Le gène de la partie réductase du P450RhF, provenant du vecteur pET28b(+)-PikC-RhFred a tout d'abord été isolé du vecteur par digestion par NdeI et EcoRI, puis amplifié par PCR avec les amorces A13LINK fw et RhFred rv2 contenant les sites de restriction EcoRI (extrémité 5') et NotI (extrémité 3'). Ce gène a ensuite été digéré par EcoRI et NotI et inséré dans le vecteur pET28b(+) (Novagen) digéré par les mêmes enzymes pour créer le vecteur pETred.
La souche DH5α est transformée par le plasmide pETred est stockée à -80 °C.

II.1.4 *Création du gène de fusion A13red*

L'ADN génomique de la souche *Alcanivorax borkumensis* SK2 a été extrait par le kit " puregene yeast/bact. Kit A " de Qiagen. Le gène de CYP153A13a a été amplifié par PCR en utilisant les amorces 153A13a fw et 153A13a rv et une température d'hydridation de 50 °C. Les sites de restriction NdeI (côté 5') et EcoRI (côté 3'), contenus dans les amorces, ont été insérés lors de la PCR. Le gène CYP153A13a possède la séquence GAATTC reconnue par l'enzyme EcoRI, ce qui gène le clonage puisque le gène doit être digéré par cette même enzyme pour être inséré dans le vecteur au niveau de ce site. Ce site de restriction indésirable a donc été éliminé par overlap extension par mutation de l'adénine en position 887 en guanine pour donner GAGTTC, non reconnu par EcoRI. La première étape de l'overlap extension a consisté en l'amplification des deux fragments par PCR, le premier avec les amorces 153A13a fw et Eco887 rv, et le deuxième avec les amorces Eco887 fw et 153A13a rv. L'overlap extension a ensuite été menée comme suit :

Réactifs	Volume	Concentration finale
Tampon 10 X pour KOD	5 µL	1X
$MgSO_4$ 25 mM	3 µL	1,5 mM
dNTP (2 mM de chaque)	5 µL	0,2 mM de chaque
H_2O stérile	qsp 50 µL	-
Amorce 153A13a fw (10 µM)	1,5 µL	0,3 µM
Amorce 153A13a rv (10 µM)	1,5 µL	0,3 µM
Fragment 1	1 µL	
Fragment 2	1 µL	
KOD Hot Start DNA Polymerase (1U/µL)	1 µL	0,02 U/µL

Conditions de thermocyclisation :

1. Activation de la polymérase 95 °C, 2 min
2. Dénaturation 95 °C, 20 s
3. Hybridation 50, 10 s
4. Elongation 70 °C, 30 s

Les étapes 2 à 4 sont répétées 30 fois.

Le gène a ensuite été digéré par NdeI et EcoRI et introduit dans le vecteur pETred digéré par les mêmes enzymes, pour générer le vecteur pETA13red dont la construction est présentée en Figure 66.

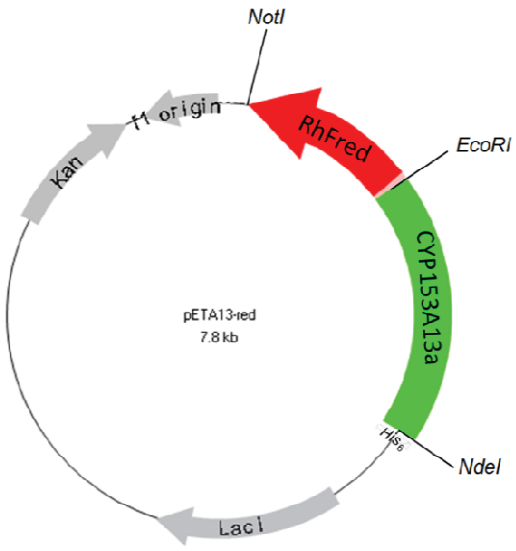


Figure 66 : Construction du plasmide pETA13red.

Ce plasmide a été inséré par choc thermique dans la bactérie *E. coli* DH5α pour le clonage, et *E.coli* BL21*(DE3) pour l'expression de la protéine placée sous le contrôle du promoteur fort T7, inductible à l'IPTG (le principe de l'induction à l'IPTG est indiqué en Figure 68).

II.1.5 *Création du gène de fusion A1red*

Un autre gène de la famille des CYP153 (le gène CYP153A1) a été amplifié à partir du plasmide pCom12-$P_{A1}F_{200}R_{1500}$, dans le but de le fusionner avec la partie réductase. Pour cela, la même technique de clonage que pour CYP153A13a a été utilisée : l'utilisation d'amorces 153A1 fw et 153A1 rv a permis d'amplifier CYP153A1 et d'insérer les sites de restriction EcoRI en 5' et NdeI en 3'. Le gène a ensuite été digéré par EcoRI et NdeI et cloné dans le vecteur pETred digéré par les mêmes enzymes, puis purifié. Le plasmide pETA1red a ainsi été créé.

La souche d'*E. coli* DH5α a été transformée par pETA1red pour le clonage, et *E.coli* BL21*(DE3) pour l'expression de la protéine. Le séquençage du gène de fusion A1red a révélé 4 mutations dans la séquence protéique de A1, dont deux situées dans le site actif (A168V et F482L). Les deux autres mutations G208E et K281R sont situées hors du site actif.

II.1.6 *Création du gène de fusion A6red*

La méthodologie utilisée pour créer le gène de fusion A6red a été différente que celle mise en œuvre pour A1red et A13red. En effet, les tentatives de digestion par EcoRI et NdeI du fragment amplifié grâce aux amorces 153A6 fw et 153A6 rv se sont révélées infructueuses, et le cytochrome n'a pas pu être inséré dans pETred. Ce phénomène peut être dû à la localisation des sites de restriction trop proches des extrémités 5' et 3' (à 4 paires de base). Afin de contourner ce problème, le gène CYP153A6 a tout d'abord été précloné dans le vecteur pGEM-T et la digestion a été effective. Pour la PCR, l'utilisation de la Taq polymérase permet d'ajouter la base adénine aux extrémités du gène amplifié, qui pourra ainsi être inséré dans le vecteur pGEM-T par complémentarité avec les thymines situées aux extréminées 5' et 3' du plasmide ouvert. Les conditions d'amplification de CYP153A6 par la Taq polymérase sont les suivantes :

Réactifs	Volume	Concentration finale
Tampon 5X pour GoTaq polymérase	10 µL	1X
$MgCl_2$ 25 mM	3 µL	1,5 mM
dNTP 20 mM	2 µL	0,8 mM de chaque
H_2O stérile	qsp 50 µL	
Amorce 153A6a fw (10 µM)	1,5 µL	0,3 µM
Amorce 153A6a rv (10 µM)	1,5 µL	0,3 µM
Matrice pCom8A6*	1 µL	
GoTaq DNA Polymerase (5U/µL)	0,5 µL	2,5 U

Conditions de thermocyclisation :

1. Activation de la polymérase 95 °C, 2 min
2. Dénaturation 95 °C, 45 s
3. Hybridation 56 °C, 30 s
4. Elongation 72 °C, 1,5 min
5. Elongation finale 72 °C, 5 min

Les étapes 2 à 4 sont répétées 30 fois.

Après avoir été purifié, le plasmide pGEM-A6* a été digéré par EcoRI et NdeI avec succès. Le fragment A6* a pu être inséré dans pETred pour donner pETA6red. Les bactéries DH5α et BL21*(DE3) ont été transformées par pETA6red.
La construction a été séquencée et une mutation a été mise en évidence dans la partie A6 : P421L. Cette mutation est situé à 20 résidus du lien peptidique entre A6 et la partie réductase.

II.2 Expression des enzymes de fusion

La souche *E.coli* BL21*(DE3) transformée par les plasmides pETA13red, pETA1red ou pETA6red a été utilisée pour l'expression des protéines recombinantes A13red, A1red ou A6red.

II.2.1 *Phases de croissance bactérienne*

La croissance des bactéries suit une courbe type présentant quatre phases : (i) phase de latence : les bactéries s'adaptent à leur environnement et commencent à synthétiser les enzymes nécessaires à leur métabolisme, (ii) phase exponentielle de croissance : la vitesse de croissance augmente et le taux de doublement des bactéries est le plus court, (iii) phase

stationnaire : le taux de croissance devient nul, le nombre de bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent, et (iv) phase de déclin : le taux de croissance est négatif. Dans cette dernière phase, toutes les ressources nutritives sont épuisées et les métabolites toxiques s'accumulent dans le milieu. Les bactéries s'autolysent et le nombre de cellules décroit (Figure 67). L'expression est induite au cours de la phase exponentielle de croissance, qui correspond à une DO_{600} entre 0,2 et 1.

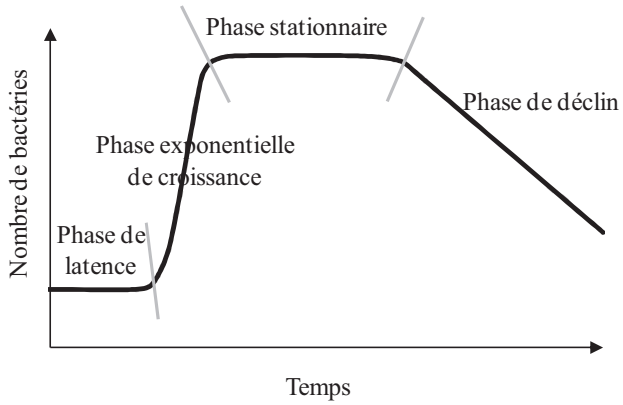


Figure 67 : Phases de croissance bactérienne.

II.2.2 *Culture et expression en flasques*

Le protocole standard de culture des cellules d'*E.coli* est le suivant : une gélose LB contenant de la kanamycine est tout d'abord ensemencée par la souche bactérienne, et incubée à 37 °C jusqu'à l'apparition de colonies (environ une nuit). Une dizaine de colonies est reprise dans 5 mL de bouillon LB contenant la kanamycine (préculture) et incubé 12 h à 37 °C sous agitation (225 rpm). 2 mL de la préculture sont ensuite ajoutés à 200 mL de milieu TB supplémenté en kanamycine (culture) et incubés à 37 °C sous agitation modérée (180 rpm). La turbidité du milieu est contrôlée régulièrement par suivi de la densité optique (DO) à 600 nm jusqu'à ce qu'elle atteigne 0,6 à 0,8 (voir paragraphe II.3). La répression de l'opéron lactose est ensuite levée par l'ajout d'IPTG (0,1 mM), ce qui induit l'expression de la protéine recombinante (Figure 68). Enfin, de l'acide 5-aminolévulinique (précurseur du noyau hème) est ajouté (1 mM), et la culture est incubée 20 à 24 h à 25 °C sous agitation (90 rpm).

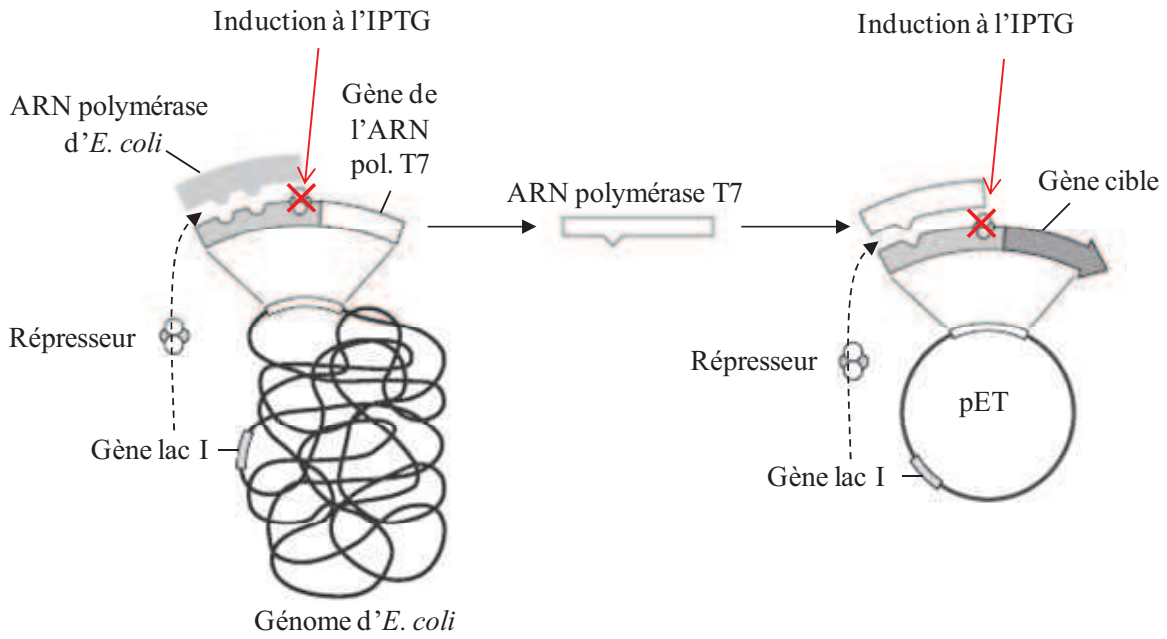


Figure 68 : Fonctionnement du système pET dans la souche *E. coli* BL21(DE3). Le gène cible est placé sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase T7 (dans le vecteur pET). La polymérase T7 est elle-même placée sous le contrôle du promoteur lac UV5 (dans le génome d'*E.coli* BL21*(DE3)). Ces deux promoteurs sont contrôlés par une petite séquence située en aval : l'opérateur lac o, sur lequel peut se fixer un répresseur. En absence d'IPTG, ce répresseur est exprimé. Il se fixe sur l'opérateur lac o et l'ARN polymérase ne peut pas s'y fixer. La transcription n'a donc pas lieu. Par contre, en présence d'IPTG, le répresseur ne peut plus se fixer au niveau de l'opérateur lac o. Le promoteur n'est plus réprimé. Au niveau du génome d'*E. coli*, l'ARN polymérase se lie au promoteur lac UV5, la transcription et la traduction de l'ARN polymérase T7 sont assurées. Celle-ci peut se fixer au niveau de son promoteur T7 dans le plasmide pET et transcrire le gène cible. Schéma modifié de la fiche technique Novagen « pET system manual ».

II.2.3 *Culture et expression en fermenteurs*

Les milieux utilisés sont les milieux TB, 2YT et FB. Ils sont autoclavés 30 minutes à 121 °C dans la cuve du fermenteur la veille de la culture. Les conditions de culture sont identiques dans les trois cas.

La veille, une préculture est réalisée : une colonie est inoculée dans 20 mL de milieu LB/Kan à partir d'une gélose fraichement préparée. Ce milieu est incubé une nuit à 37 °C sous agitation (180 rpm).

Le jour de la culture, 50 µg / mL de kanamycine et 0,1 mg/L de $FeCl_3$ sont ajoutés au milieu de culture dans le fermenteur. Le pH est ajusté à 7,5, et le milieu est inoculé au 1/100 par la préculture et incubé à 37 °C, 300 rpm jusqu'à ce que la DO à 600 nm atteigne 0,7. Le pH est contrôlé à 7,5 par ajout d'une solution d'hydroxyde d'ammonium si nécessaire, et le volume d'air fixé à 1 volume par volume de culture et par minute. Lorsque la DO à 600 nm atteint 0,7, l'expression de la protéine recombinante est induite par l'ajout d'IPTG (0,1 mM final). De l'acide 5-aminolévulinique (0,5 mM final), précurseur du noyau hème du cytochrome, est aussi ajouté. La température est baissée à 25 °C et la durée d'expression fixée à 21 h après l'induction.

II.3 Quantification des bactéries

La quantité de bactéries présentes dans le milieu est déterminée par la mesure de la turbidité du milieu. La diffusion de la lumière incidente due à la présence de bactéries en suspension provoque la turbidité. Celle-ci est donnée par la densité optique à 600 nm, longueur d'onde à laquelle le phénomène d'absorption du milieu de culture est négligeable, afin que seule la diffusion des particules en suspension intervienne dans la mesure. Une gamme étalon étudiant la variation de la quantité de cellules sèches présentes dans le milieu en fonction de la densité optique à 600 nm a été réalisée. Pour cela, 50 mL de milieu de culture sont prélevés à cinq DO_{600} différentes, rincés à l'eau et centrifugés à 2500 *g* pendant 15 minutes. Le culot est séché à l'étuve à 100 °C pendant 48 h, la masse de bactéries sèches est alors mesurée. L'évolution suit une régression linéaire donnée par la relation :

$$\text{Masse de cellules sèches (g / L de culture)} \approx 3 \times DO_{600}$$

Cette relation sera utilisée dans les mesures d'activité, pour lesquelles la quantité de produit formé dans le milieu sera ramenée à la masse de cellules sèches pour plus d'homogénéité dans les résultats.

II.4 Purification

La purification de la protéine recombinante est réalisée par chromatographie d'affinité sur colonne chargée au nickel. Le tag histidine situé en N-terminal de la protéine de fusion crée des liaisons covalentes avec le nickel, et permet de retenir la protéine A13red sur la colonne (Figure 69). Après lavage des protéines non retenues, la protéine est ensuite éluée par une solution d'imidazole, qui déplace la protéine de l'ion métallique par compétition.

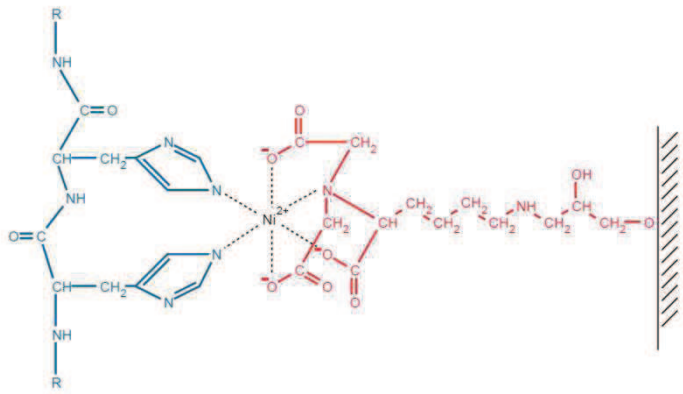


Figure 69 : Interaction entre les résidus histidines de l'étiquette située en N-terminal de la protéine (en bleu) et le nickel chélaté à la matrice de la colonne HisTrap. (Figure tirée de "The QIAexpressionist, a handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins", Qiagen).

II.4.1 *Lyse des bactéries*

Les cultures sont centrifugées 15 minutes à 5000 rpm à 20 °C. Les culots sont repris dans le tampon de lyse (0,5 mL de tampon de lyse / mL de culture) et incubés pendant 30 minutes à 37 °C pour permettre l'action du lysozyme. La solution est ensuite centrifugés pendant 30 minutes à 10 000 rpm et 4 °C, et le surnageant est filtré à 0,45 µm pour ensuite être purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel.

II.4.2 *Purification à l'imidazole*

La purification à l'imidazole est réalisée sur colonne HisTrap (GE Healthcare) chargée au nickel. Pour commencer, 5 mL de la solution de nickel à 400 mM sont passés sur la colonne. Celle-ci est ensuite équilibrée avec 20 mL de tampon « binding buffer ». Le surnageant est ensuite chargé et la colonne est rincée avec 10 mL de « binding buffer ». Les effluents collectés constituent la fraction « non retenue ». La colonne est ensuite lavée avec la solution « washing buffer » (10 mL) et la protéine de fusion est éluée avec le tampon d'élution « elute buffer » (5 mL) contenant de l'imidazole, qui va entrer en compétition avec le tag histidine et décrocher la protéine de fusion.

II.4.3 *Purification à l'histidine*

La purification à l'histidine est réalisée sur colonne HisTrap chargée au nickel selon le protocole de Maurer *et al.*, 2003[121] avec les modifications indiquées dans le texte qui suit. Pour commencer, 5 mL de la solution de nickel à 400 mM sont passés sur la colonne. Celle-ci est ensuite équilibrée avec 20 mL de tampon « binding buffer ». Le surnageant est ensuite chargé et la colonne est rincée avec 10 mL de « binding buffer ». Les effluents collectés constituent la fraction « non retenue ». La colonne est ensuite lavée avec les solutions « lavage A » (10 mL) et « lavage B » (10 mL), puis les protéines immobilisées sont éluées avec les tampons d'élution A (10 mL) et B (10 mL) contenant de l'histidine, qui va entrer en compétition avec le tag histidine et décrocher la protéine de fusion.

II.4.4 *Changement de tampon et dessalage*

Après purification, les fractions enzymatiques les plus concentrées sont dessalées et changées de tampon par gel filtration sur colonne HiTrap Desalting (GE Healthcare). Le tampon utilisé pour le stockage est le tampon de conservation. Les fractions les plus concentrées sont aliquotées et stockées à −20°C. Le changement de tampon sur colonne HiTrap Desalting provoque une dilution de la fraction enzymatique, qui peut être reconcentrée par ultracentrifugation sur filtre à centrifuger (10 kDa, Amicon Ultra, Millipore).

II.5 Quantification protéique

La quantification protéique des différentes fractions est réalisée par le test de Bradford[174], qui permet de déterminer la quantité de protéines totales dans l'échantillon par mesure colorimétrique. Le réactif de Bradford est composé de bleu de Coomassie (60 mg), d'acide perchlorique (3g), de chlorure de sodium (2,92g), pour 100 mL d'eau distillée. Il réagit avec les arginines, les histidines, et les lysines des protéines, et dans une moindre mesure avec les acides aminés aromatiques, pour former un composé coloré qui absorbe à 595 nm. Les valeurs d'absorbance à 595 nm sont comparées avec une gamme étalon de concentration croissante en BSA.

NB : La quantification par la méthode de Bradford n'est pas possible lors de l'ajout de lysozyme dans le tampon de lyse. Dans ce cas, la quantification des enzymes de fusion dans les différentes fractions a été réalisée par la méthode du CO-Binding (voir paragraphe II.8)

II.6 Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les étapes de purification et la pureté des échantillons sont contrôlées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE).[211] En conditions dénaturantes, les protéines se dissocient en leurs sous-unités et le SDS leur confère une charge négative. Elles vont ensuite être séparées sous l'action d'un champ électrique, qui les fait migrer dans les mailles du gel de polyacrylamide en fonction de leur poids moléculaire.

Les échantillons à analyser sont dilués dans le tampon de charge au ½, à l'exception des culots pour lesquels une pointe de cône de culot est mélangée avec 15 µL de tampon de charge. Les solutions sont chauffées à 95 °C pendant 5 min, et 15 µL du mélange échantillon / tampon de charge sont chargés dans les puits et soumis à un voltage constant (120 V) dans du tampon de migration (1X). Le gel est coloré 1 h par la solution de coloration puis les protéines sont visualisées après que le gel ait été placé dans la solution de décoloration pendant une journée. Les poids moléculaires des protéines sont estimés par rapport au marqueur de taille utilisé.

II.7 Western Blot

Pour le western blot, les anticorps utilisés sont les anticorps monoclonaux anti-polyhistidine de souris (Clone HIS-1, Sigma aldrich) dilués au 1:1000.

II.8 Spectres CO-binding

Les spectres CO-binding permettent de déterminer la concentration en P450 fonctionnels dans l'échantillon. Le principe de cet essai repose sur le fait que la forme ferreuse Fe^{2+} de l'hémoprotéine, lorsqu'elle est réduite, réagit avec le monoxyde de carbone pour former un complexe dont le spectre d'absorbance présente un maximum d'absorption à 450 nm.[61,62] La perte d'activité du cytochrome P450 induit sa conversion en une forme dont le maximum d'absorption est décalé à 420 nm. La différence d'absorbance à 450 nm entre la forme ferreuse réduite, et la forme ferreuse réduite et complexée au monoxyde de carbone permet de calculer la concentration en P450 actifs, grâce au coefficient d'extinction molaire déterminé par Omura et Sato (91 000 M^{-1} cm^{-1} à 450 nm).[61,62]

Les essais sont menés comme suit : 200 µL de l'échantillon à doser sont dilués dans le tampon de conservation / tampon de lyse pour les tests sur les surnageant, pour donner un volume final de 2 mL, et séparés en deux cuvettes contenant chacune 1 mL (une des cuves constitue la cuve de référence et la seconde la cuve « échantillon »). La ligne de base entre 400 et 500 nm est enregistrée avec le spectrophotomètre Uvikon XL (Bio-Tek). Le monoxyde de carbone est ensuite ajouté dans la cuve « échantillon » (environ 60 bulles). Une pointe de spatule du réducteur $Na_2S_2O_4$ (~ 1 mg) est ensuite ajouté dans chacune des cuvettes et dissous par renversement des cuves. Le spectre différentiel entre les deux cuvettes est alors enregistré (Figure 70).

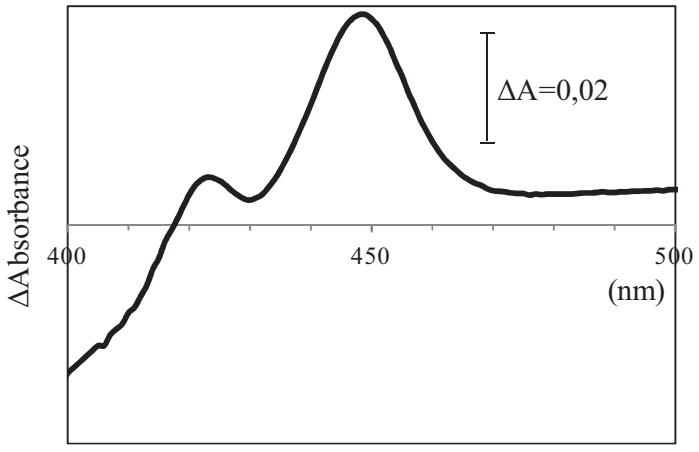


Figure 70 : Spectre différentiel de CO-binding.

La concentration en P450 fonctionnel dans la cuve est donnée par la relation :

$[(A_{450}-A_{490})_{\text{spectre différentiel}} - (A_{450}-A_{490})_{\text{ligne de base}}] / 0{,}091$ = nmol de P450 / mL.

La concentration obtenue doit être corrigée par le facteur de dilution, soit 1:10.

II.9 Test de la partie réductase

Pour tester la fonctionnalité de la partie réductase, le cytochrome c est utilisé comme accepteur final d'électrons car il possède des propriétés d'absorbance à 550 nm lorsqu'il est réduit.[179] Concrètement, si la partie réductase est active, le transfert d'électrons du NADPH vers le cytochrome c est effectif et la réduction du cytochrome c peut être suivi par spectrophotométrie à 550 nm (Figure 71). Dans le cas du système fusionné A13red, la partie CYP153A13a peut aussi jouer le rôle d'accepteur d'électrons. Afin de mesurer l'activité de la partie réductase, il a été nécessaire de s'affranchir du transport d'électrons vers A13. Pour cela, il a suffit de réaliser les tests en l'absence de substrat : en effet, la consommation du NADPH est liée à l'entrée du substrat dans le site actif. Sans substrat, le transport d'électrons du NADPH vers A13 est négligeable, et la réduction du cytochrome c reflète l'activité de la réductase de manière plus précise.

En pratique, 80 µL d'une solution à 0,5 mM de cytochrome c ont été mélangés à 0,05 µM de A13red purifié, pour un volume final de 990 µL. L'absorbance à 550 nm a été enregistrée pendant 2 minutes, afin de s'assurer de sa stabilité. 10 µL d'une solution à 17 mM de NADPH ont ensuite été ajoutés, et l'absorbance à 550 nm a été suivie pendant 20 minutes. La mesure de la vitesse initiale permet de déterminer l'activité de la partie réductase pour la réduction du cytochrome c (mais ne renseigne pas sur son activité pour la réduction de A13).

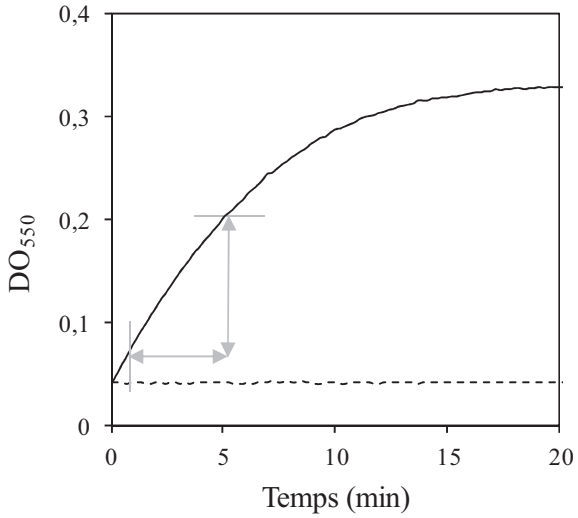


Figure 71 : Test de réduction du cytochrome c. Le NADPH est ajouté à t_0, et l'absorbance est suivi à 550 nm. La portion de droite utilisée pour calculer la vitesse de réduction du cytochrome c est indiquée par les flêches. La droite en pointillés représente le témoin sans réductase.

La vitesse de réduction du cytochrome c (dont le coefficient d'absorption molaire de sa forme réduite est 28 $mM.cm^{-1}$) est calculée selon la formule suivante :

$$(\Delta A550/min)/0,028 = \text{nmol de cytochrome c réduit par minute.}$$ [179]

II.10 Constantes de dissociation

Les constantes de dissociation ont été déterminées selon le protocole de Funhoff *et al*., 2006.[78] Les spectres UV-visible de A13red purifié ont été enregistrés. Les essais ont été menés dans le tampon de conservation à 20 °C, auquel ont été ajoutés 0,25 à 2 µL de substrat (à partir de solutions concentrées de 0,25 à 50 mM dans l'éthanol), de manière à ce que le volume final d'éthanol n'excède pas 2 %. Les différences entre les valeurs des densités optiques à 392 et 418 nm ont été déterminées pour des gammes de substrats de 0,5 à 150 µM (auxquelles est soustraite la différence d'absorbance entre 392 et 418 nm du témoin sans substrat), et reportées en fonction de la concentration. Les courbes de tendance ont été déterminées par la fonction « onesite fit » du logiciel KaleidaGraph pour obtenir les constantes de dissociation k_D.

II.11 Réactions d'oxydation des alcanes *in vitro*

II.11.1 *Mesure de l'activité catalytique*

Le TOF (fréquence de turn over), représente le nombre de réactions que l'enzyme est capable d'assurer par minute. Il est donné par mole de produit formé par mole de A13red par unité de temps. Le TON (nombre de turn over), indique le nombre total de réactions effectuées par l'enzyme en un temps donné. Les valeurs sont données en mole de produit formé par mole de A13red en un temps donné, spécifié pour chaque réaction. Le TTN (nombre total de turn over) donne le nombre de réactions effectuées par l'enzyme jusqu'à sa désactivation. En d'autres termes, le TTN est atteint lorsque la concentration en produit n'augmente plus. Il est donné en mole de produit formé par mole de catalyseur. Etant donné qu'une mole d'enzyme A13red contient un seul et unique site catalytique, les valeurs des TOF, TON et TTN sont identiques qu'ils soient donnés par mole de A13red ou par mole de centre actif. Les expériences ont été reéalisés en triplicat et l'écart type varie entre 10 et 25 %.

II.11.2 *Système monophasique*

Les réactions *in vitro* en système monophasique ont été menés en présence d'un co-solvant, afin d'augmenter la solubilité des alcanes dans le milieu aqueux. Pour cela, les différents substrats (octane, décane, dodécane et cyclohexane) ont été dilués dans l'éthanol pour donner des solutions stock de 400 mM. Pour déterminer les TOF, les TON, et les TTN, 150 nM de A13red purifiée ont été incubés avec le substrat (4 mM final à partir des solutions stock à 400 mM dans l'éthanol) dans le tampon de conservation. L'ajout de NADPH (0,5 mM final) constitue le t_0 de la réaction. La concentration finale en éthanol est 1 % (v/v). La réaction est

effectuée sous agitation (barreau aimanté) afin d'amener l'oxygène en continu, et à température ambiante (environ 25 °C).

Pour déterminer les TOF, 1 mL de la réaction est prélevé au bout de 10 minutes, et les produits sont extraits par l'acétate de butyle (100 µL) contenant l'étalon interne à 4 mM. Le tube est vortexé pendant 1 minute puis centrifugé à 8000 rpm pendant 10 min. 50 µL de la phase organique sont collectés dans un flacon avec adaptateur pour être analysés directement en GC/MS, ou congelés à - 20 °C pour une analyse ultérieure.

Pour déterminer les TON et les TTN, 1 mL de la réaction est prélevé à différents temps, et les produits sont extraits par l'acétate de butyle (100 µL) contenant l'étalon interne à 4 mM : le tube est vortexé pendant 1 minute puis centrifugé à 8000 rpm pendant 10 min. 50 µL de la phase organique sont collectés dans un vial avec adaptateur pour être analysés directement en GC/MS, ou congelés à -20 °C pour une analyse ultérieure.

Pour les déterminations des TON et en fonction de l'ajout de différents additifs, les concentrations finales en sont les suivantes :

	Additif	Concentration finale
Stabilité	Glycérol	10 % (v/v)
	BSA	2 et 10 g/L
	Catalase	500 µM

II.11.3 *Système biphasique*

Les conditions de réaction sont les mêmes qu'en système monophasique excepté que le substrat est ajouté directement dans le flacon, et non plus à partir des solutions stock dans l'éthanol. Le volume de substrat ajouté est le même que celui du milieu réactionnel : pour 1 mL de réaction, 1 mL d'alcane pur est ajouté. Les extractions se font directement à partir de la phase organique constituée par le substrat, et les analyses sont réalisées par GC/MS après ajout de 4 mM d'étalon interne.

Pour les réactions utilisant l'éther comme co-solvant, l'alcane est dilué dans l'éther pour donner une solution stock à 400 mM d'alcane. L'alcane est ajouté dans le milieu réactionnel à partir de cette solution stock, pour donner une concentration finale en alcane de 4 mM et en éther de 1 % (v/v). L'extraction se fait selon le même protocole que pour les réactions monophasiques (extraction à l'acétate de butyle).

Les déterminations des TON eont été réalisées en fonction de l'ajout de différents additifs, dont les concentrations finales sont les suivantes :

	Additif	Concentration finale
Stabilité	Glycérol	10 % (v/v)
	BSA	2 et 10 g/L
	Catalase	500 µM
Système de recyclage	Isocitrate désydrogénase	5 U/mL
	D/L isocitrate	20 mM
	$MgCl_2$	5 mM
Emulsion	Triton X-100	5 % (v/v)
	AOT	5 % (v/v)

II.11.4 *Réactions sur les alcanes gazeux*

Le mélange réactionnel est réalisé dans un vial en verre de 25 mL disposé dans un autoclave. Les conditions de réaction sont les suivantes :

Réactifs	Concentration finale
Tampon de conservation	qsp 1 mL
BSA	10 g/L
A13red	1 µM
D/L isocitrate	20 mM
ICDH	10 U/mL
$MgCl_2$	5 mM
Catalase	1 U/mL
NADPH	1 mM
Etalon interne	4 mM

L'autoclave est fermé hermétiquement et l'ajout du gaz (0,7 bar d'alcane, complété à 10 bars avec le mélange dioxygène/Azote 10:90) constitue le t_0 de la réaction. La réaction est réalisée sous agitation (barreau aimanté), et l'autoclave est placé dans un bain marie dont la température est maintenue à 25 °C.

Les prélèvements sont réalisés à différents temps après dépressurisation et ouverture de l'autoclave. Un volume d'1 µL est injecté directement en GC/FID. L'autoclave est ensuite refermé et remis sous pression avec le mélange alcane/0_2/N.

II.12 Bioconversions

Le protocole de bioconversions est tiré de Agematu *et al*., 2006,[212] avec les modifications suivantes. Les bactéries *E. coli* BL21*(DE3) transformées par le plasmide pA13red sont cultivées jusqu'à une DO à 600 nm d'environ 2,5, qui correspond à environ 7,5 g de cellules sèches par litre de culture. Un volume de 50 ml est prélevé et centrifugé à 6000 *g* pendant 10 minutes à 25 °C. Le culot est resuspendu dans 5 mL de tampon de bioconversion et les 5 mL sont transférés dans un flacon en verre de 25 mL. L'alcane pur est ajouté (1,25 mL), et le tout est incubé à 25 °C sous agitation (200 rpm) afin de créer une émulsion entre les phases aqueuse et organique.

Les prélèvements ont lieu à différents temps de la manière suivante : 1 mL de la mixture de bioconversion est prélevé et inséré dans un tube à centrifuger de 1,5 mL contenant 200 µL d'HCl 1M et vortexé pendant 30 secondes. Les produits son extraits avec 100 µL d'acétate de butyle contenant l'étalon interne à 4 mM : le tube est vortexé pendant 1 min puis centrifugé à 8000 rpm pendant 10 min. 50 µL de la phase organique sont collectés dans un flacon avec adaptateur pour être analysés directement en GC/MS, ou congelés à -20 °C pour une analyse ultérieure.

II.13 Analyses GC/MS

Les méthodes utilisées diffèrent en fonction des produits recherchés. Chaque méthode permet de détecter les différents produits d'oxydation ainsi que leurs isomères, afin d'étudier à la fois la régiosélectivité et la chimiosélectivité des biocatalyseurs.

L'appareil GC/MS (Shimadzu GC-2010 instrument) est équipé de la colonne SLB-5MS (longueur 30 m, diamètre 0,25 mm, Supelco). Les températures d'injection et de détection sont de 250 °C. Pour les réactions avec l'octane, la méthode commence par un isotherme à 35 °C pendant 5 min, puis la température est augmentée jusqu'à 190 °C (à 10 °C / min). Pour le décane, la température est gardée constante (35 °C) pendant 5 min, puis augmentée jusqu'à 280 °C à une vitesse de 10 °C / min. Pour le dodécane, l'isotherme de départ est de 80 °C pendant 5 minutes, puis la température est augmentée de 10 °C/min jusqu'à atteindre 260 °C. Enfin, pour les réactions avec le cyclohexane, la température initiale de la colonne gardée à 35

°C pendant 5 min, puis augmentée progressivement jusqu'à 140 °C à 10 °C/min. Les produits sont quantifiés par le programme SIM (selected ion monotoring), et les concentrations déterminées à partir de l'aire des pics, en utilisant le dodécane comme standard interne (le dibutyl ether a été utilisé pour les réactions avec le dodécane).
L'injection de standards des produits potentiellement attendus montre que les méthodes permettent de séparer les différents isomères des alcools, ainsi que les produits de suroxydation (aldéhydes, cétones, acides carboxyliques).

II.14 Analyses GC/FID

L'appareil GC Varian 3900 est équipé d'une colonne capillaire DB-1 non polaire (60 m de longueur, 0,32 mm de diamètre interne, Agilent J&W). L'injection est réalisée avec un split ratio de 2. La température du détecteur est de 200 °C. La méthode débute par un isotherme de 3 min à 50 °C, puis la température est augmentée jusqu'à 250 °C à 20 °C/min. Les produits sont quantifiés par comparaison de leur aire à celle de l'étalon interne, à partir de gammes étalon réalisées avec les standards des produits attendus.

II.15 Quantification et effet du peroxyde d'hydrogène

Les concentrations en peroxyde d'hydrogène dans le milieu ont été mesurées avec le kit PeroXOquant quantitative assay kit (Pierce). De plus, afin d'étudier le comportement de A13red en présence de H_2O_2, des spectres UV-visible de l'enzyme ont été effectués entre 400 et 500 nm en fonction différentes concentrations en H_2O_2. Le mélange a été effectué directement en cuvette de 1 cm, en mettant en présence 72 nM de A13red avec 0, 0,5, 1 et 5 mM de H_2O_2 dans le tampon de conservation pendant 15 min.

II.16 Création d'une banque de mutants vers l'oxydation des alcanes légers

II.16.1 *Mutagénèse dirigée*

La stratégie de sélection des résidus et le choix des mutations a été réalisé en collaboration avec le docteur Anders Sandström, de l'école polytechnique de l'université de Lund (Suède).
Les résidus candidats à la mutation ont été sélectionnés grâce au modèle de CYP153A13a contenant la molécule d'octane dans son site actif. Ce modèle a été obtenu par le logiciel Swiss model par homologie de séquence avec le cytochrome CYP108 (n° PDB 1CPT). Le pourcentage d'identité entre ces deux cytochromes est de 28 %. Au total, sept résidus ont été sélectionnés : V141, I145, A302, L303, V306, G307 et V456. Pour chaque résidu, 2 possibilités sont introduites dans l'amorce : le résidu natif et le résidu muté, excepté pour le

résidu V141 où deux possibilités de mutations sont proposées. Le nombre de mutants s'élève donc à 2x2x2x2x2x2x3=192. Les codons dégénérés ont été déterminés en utilisant le logiciel minilibdesign fournit par A. Sandström. Pour chaque mutation à insérer, une première paire d'amorce est utilisée pour amplifier la séquence d'ADN qui contient la mutation ainsi que la séquence en amont. La seconde paire d'amorce sert à amplifier la séquence d'ADN qui contient la mutation et la séquence en aval. Ces deux paires d'amorces servent à amplifier des fragments d'ADN qui se recouvrent dans deux réactions PCR séparées. La mutation se trouve dans la région de recouvrement et est donc présente dans les deux fragments amplifiés. Ici, le but est d'introduire sept mutations dans le gène. Certaines mutations étant très proches, on a choisi de ne créer qu'une seule amorce contenant chacune un maximum de mutations à introduire (141 et 145 ; 302, 303, 306 et 307), afin de diminuer le nombre de PCR et ainsi le nombre de fragments de chevauchement. Ces amorces permettent d'obtenir quatre fragments de chevauchement (Figure 72).

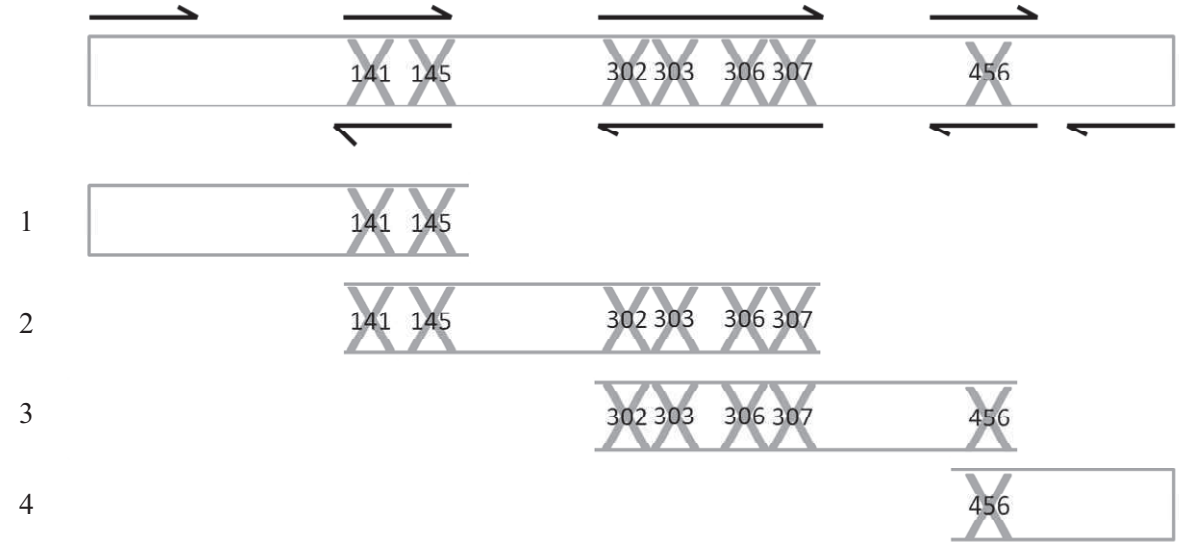


Figure 72 : Amplification des 4 fragments en vue de l'overlap extension.

Les couples d'amorces utilisés sont présentés dans le Tableau 16.

Fragments	Amorce sens [a]	Amorce Antisens [a]	Taille fragment (pb)	MW (µg/µmol)
1	14	19	455	281164
2	18	25	523	323210
3	24	27	492	304050
4	26	17	80	49465

Tableau 16 : Couple d'amorces utilisées pour l'amplification des 4 fragments permettant d'introduire les mutations dans A13red. [a] les n° correspondent aux amorces données Tableau 15.

Pour commencer, le gène CYP153A13a a été amplifié avec les amorces 153A13 fw et 153A13 rv. Des essais préliminaires ont montré que le rendement d'amplification du gène est meilleur à partir de l'ADNg d'*Alcanivorax borkumensis*, il a donc servi de matrice pour l'amplification de tous les fragments sauf du fragment n° 2 puisque l'ADNg contient le site de restriction EcoRI à la position 889 pb dans A13, qu'il faudra donc éliminer puisque la gène est inséré dans le vecteur grâce à l'enzyme de restriction EcoRI. Pour ce fragment, le plasmide pETA13red a donc été utilisé comme matrice, puisqu'il contient le gène de A13 dont la séquence EcoRI a préalablement été éliminée (voir paragraphe II.1.4), et un nombre plus important de cycles PCR a été réalisé afin d'obtenir une quantité suffisante de matrice pour l'amplification du fragment n°2. Les différentes amplifications ont été réalisées selon le protocole détaillé Tableau 17.

Réactifs	Volume	Concentration finale
Tampon de réaction 10X	5 µL	1 X
$MgSO_4$ 25mM	3 µL	1,5 mM
dNTPs (2mM de chaque)	5 µL	0,2 mM (de chaque)
H_2O stérile	qsp 50 µL	
Amorce sens 10µM [a]	1.5 µL	0,3 µM
Amorce antisens 10µM [a]	1.5 µL	0,3 µM
Matrice (plasmide pETA13red ou ADNg *Alcanivorax borkumensis*)	2µL	10 ng plasmide ou 100 ng ADNg
KOD DNA polymerase (1U/µL)	1 µL	0,02 U/µL

Tableau 17 : Protocole PCR pour l'amplification des 4 fragments. [a] Les amorces utilisées pour l'amplification des différents fragments sont données Tableau 16.

Le programme du thermocycleur a été modifié selon la longueur du fragment à amplifier. Il est détaillé ci-dessous pour chacun des fragments :

Fragment	1	2	3	4
1. Activation	95 °C, 2 min			
2. Dénaturation	95 °C, 20 s			
3. Hybridation	50 °C, 10 s	50 °C, 10 s	50 °C, 10 s	68 °C, 5 s
4. Elongation	70 °C, 7 s	70 °C, 7 s	70 °C, 7 s	70 °C, 5 s
Nombre de cycles	30	40	30	40
Matrice	ADNg	pETA13red	ADNg	ADNg

La matrice est ensuite digérée par DpnI pendant 1h30 à 37 °C et les fragments amplifiés sont purifiés avec le kit de purification « Qiaquick PCR purification kit » (Qiagen), quantifiés par spectrophotométrie à 260 nm puis analysés sur gel d'agarose à 2 %.

Le fragment 4 est trop petit (80 pb) pour être purifié par le même kit (longueur minimale des fragments à purifier : 100 pb). Nous avons donc procédé comme suit : les produits de PCR sont tout d'abord déposés sur la colonne du kit Qiagen de purification des produits de PCR. La première élution contient les fragments d'intérêts, trop petits pour être retenus dans la colonne. Cette première élution est donc conservée pour lui faire subir une précipitation à l'éthanol, et contrôlée sur gel d'agarose à 3 %.

II.16.2 *Précipitation de l'ADN à l'éthanol*

L'ADN a été concentré par précipitation à l'éthanol selon le protocole suivant. A un volume V_1 de la solution contenant l'ADN a précipiter est ajouté un volume $V_2 = V_1/10$ d'une solution aqueuse d'acétate de sodium à 3 M, pH 5,2 et un volume $V_3 = 10 \times (V_1 + V_2)$ d'éthanol absolu prérefroidi à –20 °C. La solution est refroidie à –80 °C pendant 30 min, centrifugée à 18 000 *g* pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant est éliminé puis 1 mL d'éthanol à 70 % (v/v) prérefroidi à –20 °C est ajouté. La solution est centrifugée à 18 000 *g* pendant 5 min à 4 °C. Le surnageant est éliminé, les traces d'éthanol présentes au niveau du culot sont évaporées à l'air. Enfin, le culot séché est repris dans 5 µL d'eau stérile.

II.16.3 *Overlap extension*

Les fragments de chevauchements sont ensuite assemblés par une PCR overlap-extension selon le protocole suivant :

Réactifs	Concentration finale
Tampon de réaction 10X	1 X
$MgSO_4$ 25mM	1,5 mM
dNTPs (2mM chacun)	0,2 mM (de chaque)
H_2O milliQ	qsp 100 µL
Fragments 1,2, 3 et 4	0,3 nM de chaque
Amorces 153A13 fw	0,3 µM
Amorces 153A13 rv	0,3 µM
KOD Hot start DNA polymerase	0,02 U/µL

Le programme suivant a été utilisé (protocole Novagen de l'ADN polymérase KOD Hot Start) :

1. Activation de la polymérase 95 °C, 2 min
2. Dénaturation 95 °C, 20 s
3. Hybridation 61 °C, 10 s
4. Elongation 70 °C, 30 s
5. Elongation finale 70 °C, 10 min

Les étapes 2 à 4 sont répétées 30 fois.

Les gènes sont ensuite purifiés par le kit de purification des produits de PCR, et quantifiés par spectrophotométrie à 260 nm. L'amplification globale est contrôlée par gel d'agarose à 1%.

II.16.4 *Création de la banque*

II.16.4.1 Préparation du vecteur d'expression

La banque de gène est tout d'abord digérée par NdeI et EcoRI, pour pouvoir être introduite dans le vecteur pETred. La composition du milieu est la suivante :

Réactifs	Quantité finale
Produits de PCR purifiés	300 ng
Tampon 10X O Invitrogen	1 X
Nde I (5U/µL) Invitrogen	5 U
EcoRI (10U/µL) Invitrogen	5 U
H_2O filtrée	qsp 50 µL

En parallèle, le plasmide pETred est digéré par les mêmes enzymes :

Réactifs	Quantité finale
Plasmide pETred	329 ng
Tampon 10X O	1 X
Nde I (5U/µL) Invitrogen	5 U
EcoRI (10U/µL) Invitrogen	5 U
H_2O stérile	qsp 50 µL

La digestion est menée pendant 4 h à 37 °C puis 10 min à 65 °C afin de désactiver les enzymes de restriction. Les produits de digestion sont purifiés par le kit de purification des produits de PCR (PCR Purification Kit de Qiagen), repris dans 50 µL de tampon EB et quantifiés par spectrophotométrie à 260 nm afin d'effectuer la ligation en respectant un rapport molaire de 1:3 (plasmide : insert). En général, pour un volume de réaction de ligation de 10 µL, 100 ng de vecteur sont utilisés.

La formule suivante est utilisée pour passer du ratio molaire au ratio massique :
[(100 ng vecteur x kb insert) / (kb vecteur)] x (ratio insert : vecteur) = ng insert

La taille de l'insert est de 1,4 kb tandis que celle du plasmide pETred est de 6,4 kb. La masse calculée d'insert à ajouter est donc 66 ng. La ligation est effectuée dans un microtube de 200 µL selon le protocole suivant :

Réactifs	Quantité finale
Gènes A13 dig E/N	66 ng
Plasmide pETred dig E/N	100 ng
T4 DNA ligase (1U/µL)	1U
Tampon 5X Invitrogen	1X
H_2O stérile	qsp 10 µL

Le tube est incubé à température ambiante pendant 1 h. Les plasmides obtenus sont nommés pETA13m-red.

II.16.4.2 Transformation dans *E. coli* BL21*DE3 électrocompétentes

Les produits de ligation (pETA13m-red) ont servit à transformer *E. coli* BL21*DE3 électrocompétente. Au total, 279 colonies isolées ont été obtenues et repiquées en microplaque 96 puits dans 500 µL de milieu LB supplémenté en kanamycine. Après 12 h de préculture à 37 °C sous agitation (225 rpm), du glycérol pur (500 µL) a été ajouté dans chaque puits et les microplaques ont été directement congelées à – 80 °C.

II.16.5 *Criblage de la banque*

II.16.5.1 Culture en microplaque

Tout d'abord, une gélose LB-Agar contenant de la kanamycine est striée à partir de la solution stock de bactéries et incubée une nuit à 37 °C. Une colonie est reprise dans 2 mL de milieu LB. Cette préculture est incubée 12 h à 37 °C sous agitation (180 rpm).

Le protocole standard de culture en microplaque est le suivant : le milieu de culture (2 mL de TB) est ensemencé au centième avec la préculture réalisée en milieu LB. La solution est incubée à 37 °C sous agitation (180 rpm), jusqu'à atteindre une DO à 600 nm de 0,6. 0,1 mM d'IPTG et 1 mM d'ALA sont alors ajoutés, la température est baissée à 25 °C et l'agitation à 90 rpm. La culture est incubée pendant 20 à 24 h et centrifugée à 3700 rpm à 25 °C pendant 15 minutes.

II.16.5.2 Préparation des surnageants pour les tests d'activité

Les culots bactériens sont resuspendus dans 500 µL de tampon de lyse et incubés 30 min à 37 °C. Trois cycles de congélation / décongélation (azote liquide, bain marie à 37°C) sont ensuite réalisés. Les suspensions sont centrifugées (4°C, 3700 rpm, 20 min) et le surnageant est récupéré pour les tests d'activité.

II.16.5.3 Principe des tests d'activité

Le principe des tests d'activité consiste à mettre le surnageant en présence d'un substrat non naturel et du co-facteur NADPH. Le suivi de la disparition du co-facteur par spectrophotométrie à 340 nm donne une première indication de l'activité de l'enzyme, mais ne renseigne pas sur son efficacité de couplage. Le plus simple serait de quantifier directement la production d'alcool, mais aucune technique spectrophotométrique ne le permet. Par contre, il est possible de déterminer par mesure colorimétrique la quantité d'aldéhyde, qui réagit avec le 3-methyl-2-benzothiazolonhydrazone (MBTH) ou le purpald pour former un composé coloré. Pour cela, une seconde enzyme est nécessaire. Plusieurs enzymes appartenant à la famille des alcools oxydase, ou des alcool déshydrogénases,

permettent de convertir les alcools terminaux en aldéhydes. L'alcool oxidase et l'Y-ADH (pour yeast alcohol dehydrogenase) sont couramment utilisées. La première utilise le peroxyde d'hydrogène, produit de l'oxygène et travaille à pH 7,5. Le pH optimal de Y-ADH est 8,8 et elle nécessite l'apport de NAD^+, ce qui permet donc de suivre son activité par spectrophotométrie à 340 nm (Figure 73).

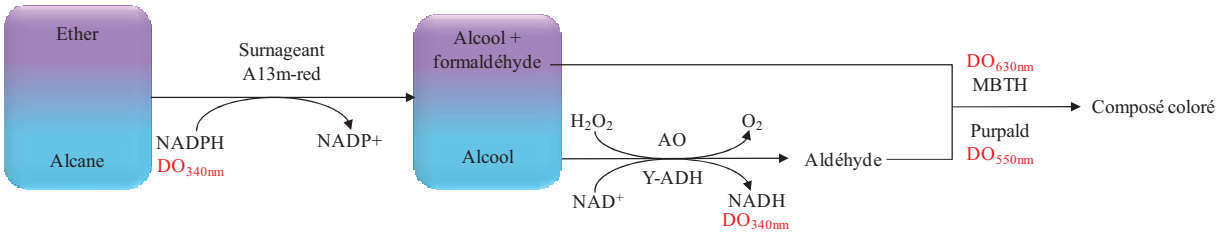


Figure 73 : Schéma global des différentes stratégies envisagées pour le criblage de la banque.

Les tests préliminaires ont été effectués avec un témoin positif (A13red sur l'octane), afin de s'assurer du fonctionnement de l'enzyme dans des conditions en microplaque.

II.16.5.4 Suivi spectrophotométrique de consommation du NADPH en microplaque

Ces tests sont réalisés sur les surnageants de lyse, selon le protocole publié par Peters *et al.*, 2003.[94] Pour cela, 300 µL de surnageant de lyse ont été mis en présence du substrat (4 mM final à partir d'une solution stock à 400 mM dans l'éthanol), et de 0,5 mM de NADPH. La concentration finale en éthanol est de 1 % (v/v). La disparition du NADPH est suivie par spectrophotométrie à 340 nm.

II.16.5.5 Oxydation de l'alcool en aldéhyde par l'alcool oxydase

Pour la conversion de l'alcool formé en aldéhyde avec l'alcool oxydase, il suffit d'ajouter au milieu réactionnel 0,1 U d'alcool oxydase / mL de milieu réactionnel. L'utilisation de L'AO n'est possible que sur des alcools de longueur de chaîne inférieure à C_5 (C_5 compris) car elle n'est pas active sur les alcools à chaîne plus longue.

II.16.5.6 Oxydation de l'alcool en aldéhyde par l'alcool déshydrogénase de levure

Les conditions de réaction de l'alcool déshydrogénase de levure (Y-ADH) sont celles décrites dans le protocole du fournisseur (Sigma) : cette enzyme fonctionne à 25 °C et pH 8,8. Comme le pH optimum de A13red est pH 7,4, nous avons choisi de doubler la concentration en Y-ADH qui présente 50 % d'activité à pH 7,4, afin de ne pas changer le pH du milieu (12 U de Y-ADH au lieu de 6 U).

II.16.5.7 Détection de l'aldéhyde en continu par test colorimétrique au MBTH

Le principe de détection de l'aldéhyde par le MBTH est basé sur l'article de Anthon et Barrett, 2004[195] et fonctionne de la manière suivante : le MBTH réagit avec l'aldéhyde pour former un premier composé (A). L'excès de MBTH qui n'a pas réagit est ensuite oxydé par la solution acide de fer en un composé (B). Les composés (A) et (B) réagissent ensemble pour former un composé (C) de couleur bleue, dont le pic d'absorption se situe à 628 nm (Figure 74).

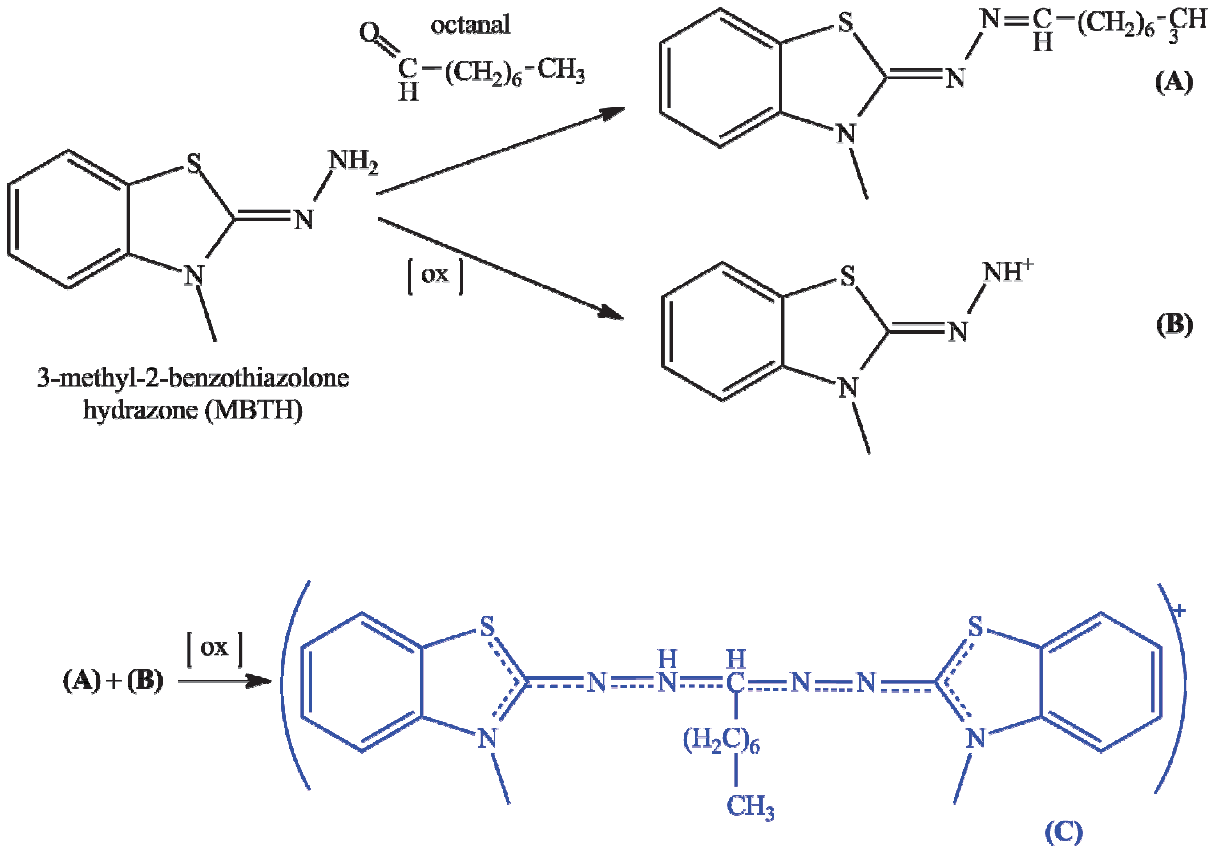


Figure 74 : Réaction du MBTH avec l'octanal en condition oxydante pour former un composé coloré qui absorbe à 628 nm.

La réaction se déroule de la manière suivante : 100 µL du mélange réactionnel (conditions standards de réaction en système monophasique entre A13red et l'alcane à étudier) sont prélevés en fin de réaction et introduits en microplaque 96 puits. Y sont ajoutés les réactifs suivants :

	Volume	Concentration finale
Mélange réactionnel A13red + substrat à étudier	100 µL	
MBTH (0,05 % dans H_2O)	100 µL	0,02 %
NAD^+ (0,1 M dans H_2O)	5 µL	2,2 mM
Y-ADH (339 U/mL)	36 µL	12 U
- *Incubation 30 min à 30 °C* -		
Solution oxydante (1,6 % acide sulfamique, 1 % chlorure de fer(III), dans H_2O)	40 µL	
- *Incubation 20 min à température ambiante* -		
- *Lecture de la densité optique à 630 nm* -		

II.16.5.8 Utilisation de substrats analogues : test colorimétrique au purpald

Ce test utilise un éther analogue de l'alcane, qui possède les mêmes caractéristiques au niveau de sa taille, de son hydrophobie, et de la force de sa liaison C-H. Il présente l'avantage de rester liquide même lorsque la chaîne est courte, ce qui permet d'éviter les difficultés liées à l'utilisation des gaz. L'hydroxylation de l'éther forme un hémiacétal instable qui se dissocie pour former l'alcool correspondant et le formaldéhyde (Figure 75a). Le formaldéhyde réagit avec le purpald pour former un composé violet, qui peut être suivi par spectrophotométrie à 550 nm (Figure 75b). Il est possible d'utiliser différents éthers, en fonction de la longueur de la chaîne du substrat que l'on souhaite étudier.

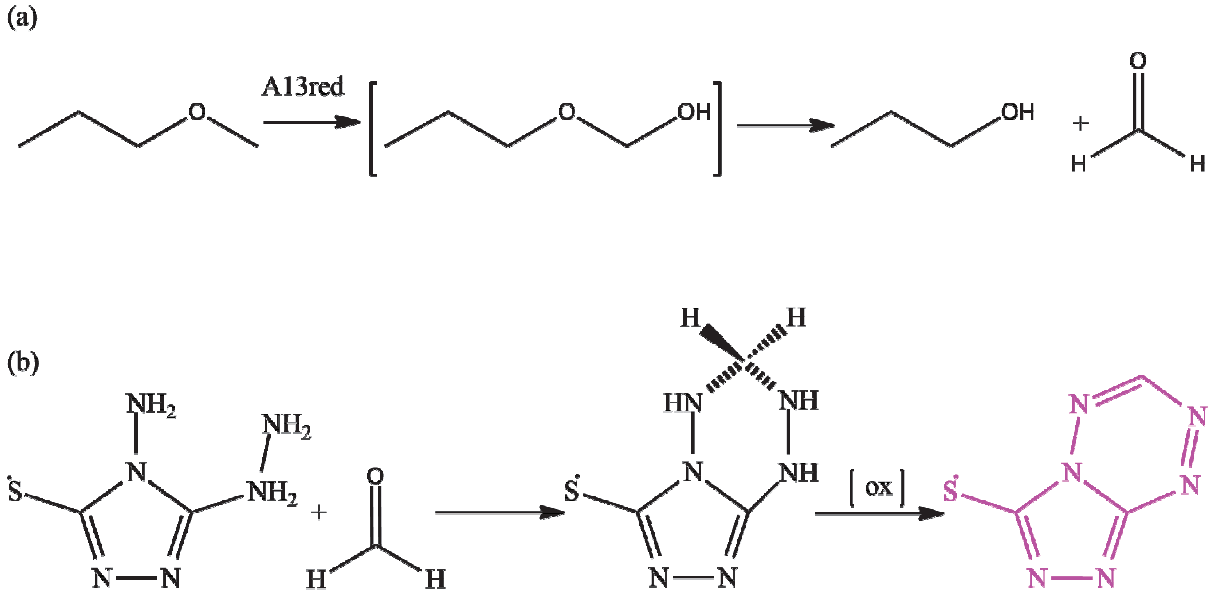


Figure 75 : Criblage pour l'hydroxylation des alcanes en position terminale par l'utilisation de substrats analogues aux alcanes, combiné avec le purpald : exemple du méthyl propyl éther. (a) Formation du formaldéhyde par A13red. (b) Détection du formaldéhyde par mesure colorimétrique après réaction avec le purpald. D'après Peters *et al.*, 2003.[94]

Pour les tests avec les éthers, la composition du mélange réactionnel est la même que pour les tests d'activité avec les alcanes. Ce protocole a été tiré de Meinhold *et al.*, 2006.[196] La DO à 550 nm est lue 15 minutes après l'ajout du purpald.

Réactifs	Volume
Surnageant de lyse	30 µL
Tampon de conservation	qsp 150 µL
HME (4 mM final) solution mère 400 mM dans l'éthanol	1,5 µL
- *Incubation 2 min à 25 °C* -	
NADPH (1 mM final) solution mère 25 mM	6 µL
- *Suivi de la disparition à 340 nm pendant 15 min* -	
Purpald (168 mM dans 2M NaOH)	15 µL
- *Lecture de la densité optique à 550 nm* -	

II.17 Immobilisation de A13red sur monolithe silicique

II.17.1 *Synthèse des monolithes*

Le monolithe « MonoSil » est synthétisé par la méthode suivante : 46,3 g d'eau distillée et 4,6 g de HNO_3 (68 %) sont mélangés pendant 15 min à 0 °C. Une masse de 4,79 g d'oxyde de polyéthylène (PEO, 20 a 35 kDa) est ensuite ajoutée et le tout est mis sous agitation pendant 1 h à 700 rpm, avant d'introduire 37,7 g de Tétraéthoxysilane (TEOS) et de poursuivre l'agitation pendant 1 h. Le mélange est versé dans des tubes en PVC d'une longueur de 10 cm et d'un diamètre interne de 7 mm. Ils sont maintenus dans un bain marie à 40 °C pendant 3 jours afin de permettre la séparation des phases. Les monolithes sont ensuite lavés à l'eau distillée et traités avec une solution d'ammoniaque à 0,1 M à 40 °C pendant 20 h. Ils sont ensuite séchés à 40 °C à l'air pendant 24 h et calcinés à 550°C pendant 8 h. Des monolithes à porosité hiérarchique de l'ordre des macropores (2-10 µm) et des mésopores (7-20 nm) sont obtenus. Pour les tests catalytiques en mode continu, le monolithe est coupé à une longueur de 1 cm, et fixé à deux tubes en verre par l'intermédiaire d'une gaine thermorétractable (chauffée pendant 2 h à 280 °C). Ces deux tubes en verre assurent les connections vers les tuyaux d'arrivée et de sortie pour les réactions en continu (Figure 76).

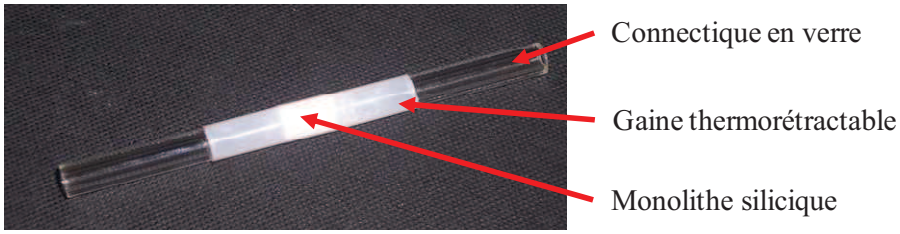


Figure 76 : Photographie d'un monolithe "MonoSil", équipé de sa connectique pour les réactions en continu (photographie issue de la thèse d'Alexander Sachse, 2011).

II.17.2 *Immobilisation*

L'immobilisation de A13red sur le monolithe « MonoSil » (~ 40 mg) est réalisée en continu. L'enzyme A13red purifiée est diluée dans du tampon de conservation de telle manière que la concentration finale en enzyme soit de 0,85 µM dans un volume de 2 mL. La solution enzymatique est introduite dans un tube à centrifuger placé dans la glace, et raccordé au monolithe et à une pompe péristaltique par l'intermédiaire de tuyaux en plastique (Figure 77). Le débit de la pompe est réglé à 0,1 mL / min et la durée d'immobilisation fixée à 15 h.

Le monolithe est ensuite lavé deux fois avec le tampon de conservation pendant 2 h à 4 °C. Les effluents sont récupérés pour être analysés en spectroscopie UV-visible et par le test de Bradford, afin de déterminer le rendement d'immobilisation.

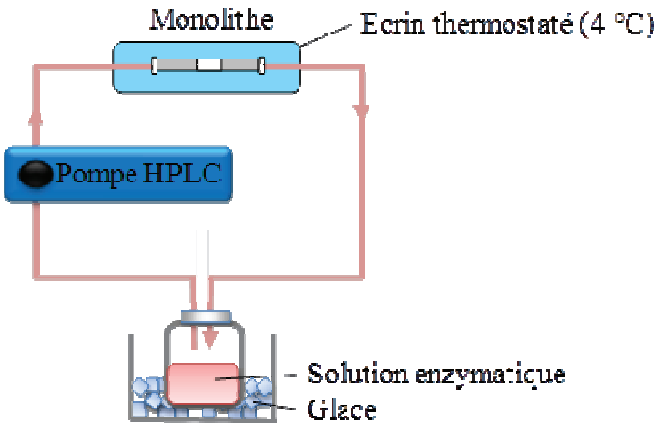


Figure 77 : Schéma du montage pour l'immobilisation de A13red sur le monolithe « MonoSil ». Adapté de la thèse d'Alexander Sachse, 2011.

II.17.3 *Biocatalyse en flux continu*

Le montage du système pour la biocatalyse en flux continu est le même que celui décrit pour l'immobilisation et présenté en Figure 77. Les concentrations finales des réactifs sont listées ci-dessous, et placé dans le récipient à la place de la solution enzymatique. Le volume final est de 8 mL, et le débit de la pompe est maintenu à 0,1 mL / min.

Réactifs	Concentration finale
Tampon de conservation	qsp 8 mL
BSA	10 g/L
D/L isocitrate	20 mM
ICDH	1 U/mL
$MgCl_2$	5 mM
Catalase	1 U/mL
NADPH	500 µM
Etalon interne (méthyl butyl éther)	4 mM
Substrat : Octane pur	4 mL

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Kerr, J. A. Bond dissociation energies by kinetic methods. *Chemical reviews* **66**, 456–500 (1966).

2. Chen, H., Schlecht, S., Semple, T. C. & Hartwig, J. F. Thermal, Catalytic, Regiospecific Functionalization of Alkanes. *Science* **287**, 1995–1997 (2000).

3. Friedrich, H. B., Govender, N. & Mathebula, M. R. The effect of voids and dilution on n-hexane oxidation over a VMgO catalyst. *Applied Catalysis A: General* **297**, 81–89 (2006).

4. Li, Y. & Armor, J. N. Ammoxidation of ethane to acetonitrile over Co-beta zeolite. *Chemical Communications* 2013–2014 (1997).

5. Periana, R. *et al.* Platinum catalysts for the high-yield oxidation of methane to a methanol derivative. *Science* **280**, 560–4 (1998).

6. Palkovits, R., Antonietti, M., Kuhn, P., Thomas, A. & Schüth, F. Solid catalysts for the selective low-temperature oxidation of methane to methanol. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **48**, 6909–12 (2009).

7. Bordeaux, M., Galarneau, A. & Drone, J. On the callenges of achieving catalytic, mild and selective oxyfunctionalization of linear alkanes. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* (2012).doi:10.1002/anie.201203280

8. Groothaert, M. H., Smeets, P. J., Sels, B. F., Jacobs, P. A. & Schoonheydt, R. A. Selective oxidation of methane by the bis(mu-oxo)dicopper core stabilized on ZSM-5 and mordenite zeolites. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 1394–5 (2005).

9. Thomas, J. M., Raja, R., Sankar, G. & Bell, R. G. Molecular-sieve catalysts for the selective oxidation of linear alkanes by molecular oxygen. *Nature* **398**, 227–230 (1999).

10. Cardini, G. & Jurtshuk, P. The Enzymatic Corynebacterium Hydroxylation of n-Octane by. *The Journal of biological chemistry* **245**, 2789–2796 (1970).

11. Maier, T., Förster, H. H., Asperger, O. & Hahn, U. Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from Acinetobacter sp. EB104. *Biochemical and biophysical research communications* **286**, 652–8 (2001).

12. Funhoff, E. G., Salzmann, J., Bauer, U., Witholt, B. & van Beilen, J. B. Hydroxylation and epoxidation reactions catalyzed by CYP153 enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 806–812 (2007).

13. Noble, M. a *et al.* Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450 BM3. *The Biochemical journal* **339**, 371–9 (1999).

14. Munro, A. W. *et al.* P450 BM3: the very model of a modern flavocytochrome. *Trends in biochemical sciences* **27**, 250–7 (2002).

15. Roberts, G. A., Grogan, G., Greter, A., Flitsch, S. L. & Turner, N. J. Identification of a New Class of Cytochrome P450 from a Rhodococcus sp. *Journal of Bacteriology* **184**, 3898–3908 (2002).

16. Roberts, G. A. *et al.* A self-sufficient cytochrome p450 with a primary structural organization that includes a flavin domain and a [2Fe-2S] redox center. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 48914–20 (2003).

17. De Mot, R. & Parret, A. H. A. A novel class of self-sufficient cytochrome P450 monooxygenases in prokaryotes. *Trends in Microbiology* **10**, 502–508 (2002).

18. Fujii, T., Narikawa, T., Takeda, K. & Kato, J. Biotransformation of various alkanes using the Escherichia coli expressing an alkane hydroxylase system from Gordonia sp. TF6. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **68**, 2171–7 (2004).

19. Kubota, M. *et al.* Isolation and functional analysis of cytochrome P450 CYP153A genes from various environments. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **69**, 2421–30 (2005).

20. Nodate, M., Kubota, M. & Misawa, N. Functional expression system for cytochrome P450 genes using the reductase domain of self-sufficient P450RhF from Rhodococcus sp. NCIMB 9784. *Applied microbiology and biotechnology* **71**, 455–62 (2006).

21. Fox, B. G., Froland, W. A., Jollie, D. R. & Lipscomb, J. D. Methane Monooxygenase from Methylosinus trichosporium OB3b. *Methods in enzymology* **188**, 191 (1990).

22. Balasubramanian, R. *et al.* Oxidation of methane by a biological dicopper centre. *Nature* **465**, 115–9 (2010).

23. Shanklin, J., Achim, C., Schmidt, H., Fox, B. G. & Münck, E. Mössbauer studies of alkane omega-hydroxylase: evidence for a diiron cluster in an integral-membrane enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 2981–6 (1997).

24. Fisher, M. B., Zheng, Y. & Rettie, A. E. Positional Specificity of Rabbit CYP4B1 Chain Fatty Acids and Hydrocarbons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **355**, 352–355 (1998).

25. Scheller, U., Zimmer, T., Becher, D., Schauer, F. & Schunck, W. H. Oxygenation cascade in conversion of n-alkanes to alpha,omega-dioic acids catalyzed by cytochrome P450 52A3. *The Journal of biological chemistry* **273**, 32528–34 (1998).

26. Peter, S. *et al.* Selective hydroxylation of alkanes by an extracellular fungal peroxygenase. *The FEBS journal* **278**, 3667–75 (2011).

27. Fasan, R., Chen, M. M., Crook, N. C. & Arnold, F. H. Engineered alkane-hydroxylating cytochrome P450(BM3) exhibiting nativelike catalytic properties. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **46**, 8414–8 (2007).

28. Fasan, R., Meharenna, Y. T., Snow, C. D., Poulos, T. L. & Arnold, F. H. Evolutionary history of a specialized p450 propane monooxygenase. *Journal of molecular biology* **383**, 1069–80 (2008).

29. Xu, F. *et al.* The heme monooxygenase cytochrome P450cam can be engineered to oxidize ethane to ethanol. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **44**, 4029–32 (2005).

30. Zilly, F. E. *et al.* Tuning a p450 enzyme for methane oxidation. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **50**, 2720–4 (2011).

31. Kamata, K., Yonehara, K., Nakagawa, Y., Uehara, K. & Mizuno, N. Efficient stereo- and regioselective hydroxylation of alkanes catalysed by a bulky polyoxometalate. *Nature chemistry* **2**, 478–83 (2010).

32. Battioni, P. *et al.* Monooxygenase-like oxidation of hydrocarbons by hydrogen peroxide catalyzed by manganese porphyrins and imidazole: selection of the best catalytic system and nature of the active oxygen species. *Journal of the American Chemical Society* **110**, 8462–8470 (1988).

33. Sorokin, a. B. *et al.* Oxidation of methane and ethylene in water at ambient conditions. *Catalysis Today* **157**, 149–154 (2010).

34. Salanitro, J. P. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil. *Advances in Agronomy* **72**, 53–105 (2001).

35. Yakimov, M. M. *et al.* Alcanivorax borkumensis gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 339–348 (1998).

36. Schneiker, S. *et al.* Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium Alcanivorax borkumensis. *Nature biotechnology* **24**, 997–1004 (2006).

37. Merkx, M. *et al.* Dioxygen Activation and Methane Hydroxylation by Soluble Methane Monooxygenase : A Tale of Two Irons and Three Proteins. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **40**, 2782–2807 (2001).

38. Ayala, M. & Torres, E. Enzymatic activation of alkanes: constraints and prospective. *Applied Catalysis A: General* **272**, 1–13 (2004).

39. Tshuva, E. Y. & Lippard, S. J. Synthetic models for non-heme carboxylate-bridged diiron metalloproteins: strategies and tactics. *Chemical reviews* **104**, 987–1012 (2004).

40. Zahn, J. A. & Dispirito, A. A. Membrane-associated methane monooxygenase from Methylococcus capsulatus (Bath). *Journal of bacteriology* **178**, 1018 (1996).

41. Stainthorpe, A. C., Lees, V., Salmond, G. P. C., Dalton, H. & Murrell, J. C. The methane monooxygenase gene cluster of Methylococcus capsulatus (Bath). *Gene* **91**, 27–34 (1990).

42. Cardy, D. L. N., Laidler, V., Salmond, G. P. C. & Murrell, J. C. Molecular analysis of the methane monooxygenase (MMO) gene cluster of Methylosinus trichosporium OB3b. *Molecular microbiology* **5**, 335–342 (1991).

43. Cardy, D. L., Laidler, V., Salmond, G. P. & Murrell, J. C. The methane monooxygenase gene cluster of Methylosinus trichosporium: cloning and sequencing of the mmoC gene. *Archives of microbiology* **156**, 477–483 (1991).

44. Rosenzweig, A. *et al.* Geometry of the soluble methane monooxygenase catalytic diiron center in two oxidation states. *Chemistry & biology* **2**, 409–18 (1995).

45. Walters, K. J., Gassner, G. T., Lippard, S. J. & Wagner, G. Structure of the soluble methane monooxygenase regulatory protein B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 7877–82 (1999).

46. Lippard, S. J. Hydroxylation of C-H bonds at carboxylate-bridged diiron centres. *Philosophical transactions. Series A* **363**, 861–877 (2005).

47. Kopp, D. a & Lippard, S. J. Soluble methane monooxygenase: activation of dioxygen and methane. *Current opinion in chemical biology* **6**, 568–76 (2002).

48. Merkx, M. & Lippard, S. J. Why OrfY? Characterization of MMOD, a long overlooked component of the soluble methane monooxygenase from Methylococcus capsulatus (Bath). *The Journal of biological chemistry* **277**, 5858–65 (2002).

49. Kotani, T., Yamamoto, T., Yurimoto, H., Sakai, Y. & Kato, N. Propane Monooxygenase and NAD+-Dependent Secondary Alcohol Dehydrogenase in Propane Metabolism by Gordonia sp. strain TY-5. *Journal of bacteriology* **185**, 7120–7128 (2003).

50. Sluis, M. K., Sayavedra-Soto, L. a & Arp, D. J. Molecular analysis of the soluble butane monooxygenase from "Pseudomonas butanovora". *Microbiology* **148**, 3617–29 (2002).

51. Doughty, D. M., Arp, D. J. & Bottomley, P. J. Product Repression of Alkane Monooxygenase Expression in Pseudomonas butanovora. *Journal of bacteriology* **188**, 2586–2592 (2006).

52. Peterson, J., Kusunose, M., Kusunose, E. & Coon, M. J. Enzymatic omega-hydroxylation. *The Journal of biological chemistry* **242**, 4334–4340 (1967).

53. van Beilen, J. B., Eggink, G., Enequist, H., Bos, R. & Witholt, B. DNA sequence determination and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded alkJKL genes of Pseudomonas oleovorans. *Molecular microbiology* **6**, 3121–3163 (1992).

54. van Beilen, J. B., Wubbolts, M. G. & Witholt, B. Genetics of alkane oxidation by Pseudomonas oleovorans. *Biodegradation* **5**, 161–174 (1994).

55. van Beilen, J. B. *et al.* Analysis of Pseudomonas putida alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes. *Microbiology* **147**, 1621–30 (2001).

56. Johnson, E. L. & Hyman, M. R. Propane and n-Butane Oxidation by Pseudomonas putida GPo1. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 950–952 (2006).

57. van Beilen, J. B. *et al.* Identification of an Amino Acid Position That Determines the Substrate Range of Integral Membrane Alkane Hydroxylases. *Journal of bacteriology* **187**, 85–91 (2005).

58. Smits, T. H. M., Balada, S. B., Witholt, B. & van Beilen, J. B. Functional Analysis of Alkane Hydroxylases from Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Journal of bacteriology* **184**, 1733–1742 (2002).

59. van Beilen, J. B. *et al.* Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains. *Environmental microbiology* **4**, 676–82 (2002).

60. Staijen, I. E., Van Beilen, J. B. & Witholt, B. Expression, stability and performance of the three-component alkane mono-oxygenase of Pseudomonas oleovorans in Escherichia coli. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**, 1957–65 (2000).

61. Omura, T. & Sato, R. The Carbon Monoxide-binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. *Journal of Biological Chemistry* **239**, 2370–2378 (1964).

62. Omura, T. & Sato, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes II. *The Journal of Biological Chemistry* **239**, 2379–2385 (1964).

63. Guengerich, F. P. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annual review of pharmacology and toxicology* **39**, 1–17 (1999).

64. Nelson, D. R. *et al.* The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biology* **12**, 1–51 (1993).

65. Nebert, D. W. *et al.* The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA and cell biology* **10**, 1–14 (1991).

66. Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K. M. & Bernhardt, R. Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains. *Biochimica et biophysica acta* **1770**, 330–44 (2007).

67. Bernhardt, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of biotechnology* **124**, 128–45 (2006).

68. Fraústo da Silva, J. J. R. & Williams, R. J. P. *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*. **2001**, 575 (2001).

69. Ravichandran, K., Boddupalli, S., Hasermann, C., Peterson, J. & Deisenhofer, J. Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science* **261**, 731–736 (1993).

70. White, R. E. & Coon, M. J. Oxygen activation by cytochrome P-450. *Annual review of biochemistry* **49**, 315–56 (1980).

71. Poulos, T. L. & Raag, R. Cytochrome P450cam: crystallography, oxygen activation, and electron transfer. *The FASEB Journal* **6**, 674–679 (1992).

72. Gerber, N. C. & Sligar, S. G. Catalytic mechanism of cytochrome P-450: evidence for a distal charge relay. *Journal of the American Chemical Society* **114**, 8742–8743 (1992).

73. Meunier, B., de Visser, S. P. & Shaik, S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chemical reviews* **104**, 3947–80 (2004).

74. Schöneboom, J. C. *et al.* The elusive oxidant species of cytochrome P450 enzymes: characterization by combined quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) calculations. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 8142–51 (2002).

75. Rittle, J. & Green, M. T. Cytochrome P450 compound I: capture, characterization, and C-H bond activation kinetics. *Science* **330**, 933–7 (2010).

76. Asperger, O., Naumann, A. & Kleber, H.-P. Occurrence of cytochrome P-450 in Acinetobacter strains after growth on N-hexadecane. *FEMS Microbiology Letters* **11**, 309–312 (1981).

77. van Beilen, J. B. *et al.* Cytochrome P450 Alkane Hydroxylases of the CYP153 Family Are Common in Alkane-Degrading Eubacteria Lacking Integral Membrane Alkane Hydroxylases. *Society* **72**, 59–65 (2006).

78. Funhoff, E. G., Bauer, U., García-Rubio, I., Witholt, B. & van Beilen, J. B. CYP153A6, a soluble P450 oxygenase catalyzing terminal-alkane hydroxylation. *Journal of bacteriology* **188**, 5220–7 (2006).

79. van Beilen, J. B., Lu, D., Bauer, U., Witholt, B. & Duetz, W. A. Biocatalytic Production of Perillyl Alcohol from Limonene by Using a Novel Mycobacterium sp . Cytochrome P450 Alkane Hydroxylase Expressed in Pseudomonas putida. *Applied and environmental microbiology* **71**, 1737–1744 (2005).

80. Fujita, N. *et al.* Comparison of Two Vectors for Functional Expression of a Bacterial Cytochrome P450 Gene in Escherichia coli Using CYP153 Genes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **73**, 1825–1830 (2009).

81. Chen, M. M., Coelho, P. S. & Arnold, F. H. Utilizing Terminal Oxidants to Achieve P450-Catalyzed Oxidation of Methane. *Advanced Synthesis and Catalysis* **354**, 964–968 (2012).

82. Scheps, D., Honda Malca, S., Hoffmann, H., Nestl, B. M. & Hauer, B. Regioselective ω-hydroxylation of medium-chain n-alkanes and primary alcohols by CYP153 enzymes from Mycobacterium marinum and Polaromonas sp. strain JS666. *Organic and Biomolecular Chemistry* **9**, 6727–33 (2011).

83. Scheller, U., Zimmer, T., Kärgel, E. & Schunck, W. H. Characterization of the n-alkane and fatty acid hydroxylating cytochrome P450 forms 52A3 and 52A4. *Archives of biochemistry and biophysics* **328**, 245–54 (1996).

84. Li, L. *et al.* Crystal structure of long-chain alkane monooxygenase (LadA) in complex with coenzyme FMN: unveiling the long-chain alkane hydroxylase. *Journal of molecular biology* **376**, 453–65 (2008).

85. O'Reilly, E., Köhler, V., Flitsch, S. L. & Turner, N. J. Cytochromes P450 as useful biocatalysts: addressing the limitations. *Chemical Communications* **47**, 2490–501 (2011).

86. Draper, A. J., Madan, A. & Parkinson, A. Inhibition of Coumarin 7-Hydroxylase Activity in Human Liver Microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **341**, 47–61 (1997).

87. Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G. & Schlichting, I. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chemical reviews* **105**, 2253–77 (2005).

88. Kellner, D. G., Maves, S. a & Sligar, S. G. Engineering cytochrome P450s for bioremediation. *Current opinion in biotechnology* **8**, 274–8 (1997).

89. Jahng, D. & Wood, T. K. Trichloroethylene and chloroform degradation by a recombinant pseudomonad expressing soluble methane monooxygenase from Methylosinus trichosporium OB3b. *Applied and environmental microbiology* **60**, 2473–82 (1994).

90. Gillam, E. M. J. Engineering cytochrome p450 enzymes. *Chemical research in toxicology* **21**, 220–31 (2008).

91. Narhi, L. O. & Fulco, J. Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-Dalton Cytochrome P-450 Monooxygenase Induced by Barbiturates in Bacillus megaterium. *The Journal of biological chemistry* **261**, 7160–7169 (1986).

92. Matson, R. S., Hare, R. S. & Fulco, A. J. Characteristics of a cytochrome P-450-dependent fatty acid ω-2 hydroxylase from Bacillus megaterium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **487**, 487–494 (1977).

93. Munro, A. W. *et al.* Flavocytochrome P450 BM3 substrate selectivity and electron transfer in a model cytochrome P450. *Sub-cellular biochemistry* **35**, 297–315 (2000).

94. Peters, M. W., Meinhold, P., Glieder, A. & Arnold, F. H. Regio- and enantioselective alkane hydroxylation with engineered cytochromes P450 BM-3. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 13442–50 (2003).

95. Glieder, A., Farinas, E. T. & Arnold, F. H. Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. *Nature biotechnology* **20**, 1135–9 (2002).

96. Meinhold, P., Peters, M. W., Chen, M. M. Y., Takahashi, K. & Arnold, F. H. Direct conversion of ethane to ethanol by engineered cytochrome P450 BM3. *ChemBioChem* **6**, 1765–8 (2005).

97. Wong, T. S., Arnold, F. H. & Schwaneberg, U. Laboratory evolution of cytochrome p450 BM-3 monooxygenase for organic cosolvents. *Biotechnology and bioengineering* **85**, 351–8 (2004).

98. Poulos, T. L., Finzel, B. C., Gunsalus, I. C., Wagner, G. C. & Kraut, J. The 2.6-A crystal structure of Pseudomonas putida cytochrome P-450. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 16122–16130 (1985).

99. Bell, S. G. *et al.* Butane and propane oxidation by engineered cytochrome P450 cam. *Chemical Communications* 490–491 (2002).

100. Poulos, T. L., Finzel, B. C. & Howard, A. J. High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *Journal of Molecular Biology* **195**, 687–700 (1987).

101. Stevenson, J., Westlake, A. C. G., Whittock, C. & Wong, L. The Catalytic Oxidation of Linear and Branched Alkanes by Cytochrome P450cam. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 12846–12847 (1996).

102. Loida, P. J. & Sligar, S. G. Molecular recognition in cytochrome P-450: mechanism for the control of uncoupling reactions. *Biochemistry* **32**, 11530–8 (1993).

103. Stevenson, J., Bearpark, J. K. & Wong, L. Engineering molecular recognition in alkane oxidation catalysed by cytochrome P450cam. *New Journal of Chemistry* **22**, 551–552 (1998).

104. Bell, S. G. *et al.* Engineering cytochrome P450cam into an alkane hydroxylase. *Dalton Transactions* 2133 (2003).doi:10.1039/b300869j

105. Koch, D. J., Chen, M. M., van Beilen, J. B. & Arnold, F. H. In vivo evolution of butane oxidation by terminal alkane hydroxylases AlkB and CYP153A6. *Applied and environmental microbiology* **75**, 337–44 (2009).

106. Hlavica, P. Assembly of non-natural electron transfer conduits in the cytochrome P450 system: a critical assessment and update of artificial redox constructs amenable to exploitation in biotechnological areas. *Biotechnology advances* **27**, 103–21 (2009).

107. Hunter, D. J. B. *et al.* Analysis of the domain properties of the novel cytochrome P450 RhF. *FEBS letters* **579**, 2215–20 (2005).

108. Sibbesen, O., De Voss, J. J. & Ortiz de Montellano, P. R. Putidaredoxin Reductase-Putidaredoxin-Cytochrome P450 cam Triple. *The Journal of biological chemistry* **271**, 22462–22469 (1996).

109. Hirakawa, H., Kamiya, N., Tanaka, T. & Nagamune, T. Intramolecular electron transfer in a cytochrome P450cam system with a site-specific branched structure. *Protein Engineering, Design & Selection* **20**, 453–9 (2007).

110. Hirakawa, H. & Nagamune, T. Molecular assembly of P450 with ferredoxin and ferredoxin reductase by fusion to PCNA. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **11**, 1517–20 (2010).

111. Fairhead, M., Giannini, S., Gillam, E. M. J. & Gilardi, G. Functional characterisation of an engineered multidomain human P450 2E1 by molecular Lego. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **10**, 842–53 (2005).

112. Dodhia, V. R., Fantuzzi, A. & Gilardi, G. Engineering human cytochrome P450 enzymes into catalytically self-sufficient chimeras using molecular Lego. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **11**, 903–16 (2006).

113. Sabbadin, F. *et al.* LICRED: a versatile drop-in vector for rapid generation of redox-self-sufficient cytochrome P450s. *ChemBioChem* **11**, 987–94 (2010).

114. Li, S., Podust, L. M. & Sherman, D. H. Engineering and analysis of a self-sufficient biosynthetic cytochrome P450 PikC fused to the RhFRED reductase domain. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 12940–1 (2007).

115. Robin, A. *et al.* Engineering and improvement of the efficiency of a chimeric [P450cam-RhFRed reductase domain] enzyme. *Chemical communications* **18**, 2478–80 (2009).

116. Lacour, T. & Ohkawa, H. Engineering and biochemical characterization of the rat microsomal cytochrome P4501A1 fused to ferredoxin and ferredoxin-NADP(+) reductase from plant chloroplasts. *Biochimica et biophysica acta* **1433**, 87–102 (1999).

117. Fuziwara, S. *et al.* Catalytically functional flavocytochrome chimeras of P450 BM3 and nitric oxide synthase. *Journal of inorganic biochemistry* **91**, 515–26 (2002).

118. de Raadt, A. & Griengl, H. The use of substrate engineering in biohydroxylation. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 537–542 (2002).

119. Shoji, O. *et al.* Hydrogen peroxide dependent monooxygenations by tricking the substrate recognition of cytochrome P450BSbeta. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **46**, 3656–9 (2007).

120. Kawakami, N., Shoji, O. & Watanabe, Y. Use of perfluorocarboxylic acids to trick cytochrome P450BM3 into initiating the hydroxylation of gaseous alkanes. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **50**, 5315–8 (2011).

121. Maurer, S. C., Schulze, H., Schmid, R. D. & Urlacher, V. B. Immobilisation of P450 BM-3 and an NADP+ Cofactor Recycling System: Towards a Technical Application of Heme-Containing Monooxygenases in Fine Chemical Synthesis. *Advanced Synthesis & Catalysis* **345**, 802–810 (2003).

122. Ichinose, H., Kamiya, N. & Goto, M. Enzymatic redox cofactor regeneration in organic media: functionalization and application of glycerol dehydrogenase and soluble transhydrogenase in reverse micelles. *Biotechnology progress* **21**, 1192–7 (2005).

123. Zhao, H. & van der Donk, W. A. Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology* **14**, 583–589 (2003).

124. Wong, C.-H. & Whitesides, G. M. Enzyme-catalyzed organic synthesis: NAD(P)H cofactor regeneration by using glucose-6-phosphate and the glucose-5-phosphate dehydrogenase from Leuconostoc mesenteroides. *Journal of the American Chemical Society* **103**, 4890–4899 (1981).

125. Mertens, R., Greiner, L., van den Ban, E. C. ., Haaker, H. B. C. . & Liese, A. Practical applications of hydrogenase I from Pyrococcus furiosus for NADPH generation and regeneration. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **24-25**, 39–52 (2003).

126. Schwaneberg, U., Appel, D., Schmitt, J. & Schmid, R. D. P450 in biotechnology: zinc driven omega-hydroxylation of p-nitrophenoxydodecanoic acid using P450 BM-3 F87A as a catalyst. *Journal of Biotechnology* **84**, 249–257 (2000).

127. Ryan, J. D. & Clark, D. S. P450cam Biocatalysis in Surfactant-Stabilized Two-Phase Emulsions. *Biotechnology* **99**, 1311–1319 (2008).

128. Galarneau, A., Mureseanu, M., Atger, S., Renard, G. & Fajula, F. Immobilization of lipase on silicas. Relevance of textural and interfacial properties on activity and selectivity. *New Journal of Chemistry* **30**, 562 (2006).

129. Laveille, P. *et al.* Hemoglobin immobilized on mesoporous silica as effective material for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons pollutants from water. *New Journal of Chemistry* **34**, 2153 (2010).

130. Hartmann, M. Ordered Mesoporous Materials for Bioadsorption and Biocatalysis. *Chemistry of Materials* **17**, 4577–4593 (2005).

131. Hartmann, M. & Jung, D. Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends. *Journal of Materials Chemistry* **20**, 844–857 (2010).

132. Coker, E. N. & Jansen, J. C. Approaches for the synthesis of ultra-large and ultra small zeolite crystals. *Molecular sieves Vol. 1 Science and Technology Synthesis.* 121–125 (1998).

133. Zhan, B., Moden, B., Dakka, J., Santiesteban, J. & Iglesia, E. Catalytic oxidation of n-hexane on Mn-exchanged zeolites: Turnover rates, regioselectivity, and spatial constraints. *Journal of Catalysis* **245**, 316–325 (2007).

134. Sobolev, V. I., Dubkov, K. A., Panna, O. V. & Panov, G. I. Selective oxidation of methane to methanol on a FeZSM-5 surface. *Catalysis today* **24**, 251–252 (1995).

135. Herron, N. No The selective partial oxidation of alkanes using zeolite based catalysts. A completely inorganic cytochrome P450 mimic. *New Journal of Chemistry* **13**, 761–766 (1989).

136. Thomas, J. M., Raja, R., Sankar, G. & Bell, R. G. Molecular sieve catalysts for the regioselective and shape- selective oxyfunctionalization of alkanes in air. *Accounts of chemical research* **34**, 191–200 (2001).

137. Raja, R. & Thomas, J. M. A manganese-containing molecular sieve catalyst designed for the terminal oxidation of dodecane in air. *Chemical Communications* **17**, 1841–1842 (1998).

138. Modén, B., Zhan, B., Dakka, J., Santiesteban, J. G. & Iglesia, E. Reactant Selectivity and Regiospecificity in the Catalytic Oxidation of Alkanes on. *The Journal of Physical Chemistry C* **111**, 1402–1411 (2007).

139. Starokon, E. V., Parfenov, M. V., Pirutko, L. V., Abornev, S. I. & Panov, G. I. Room-Temperature Oxidation of Methane by α-Oxygen and Extraction of Products from the FeZSM-5 Surface. *The Journal of Physical Chemistry C* **115**, 2155–2161 (2011).

140. Mansuy, D. Activation of alkanes the biomimetic approach. *Coordination Chemistry reviews* **125**, 129 (1993).

141. Kudrik, E. V. & Sorokin, A. B. N-bridged diiron phthalocyanine catalyzes oxidation of benzene with H2O2 via benzene oxide with NIH shift evidenced by using 1,3,5-[D3]benzene as a probe. *Chemistry - A European Journal* **14**, 7123–6 (2008).

142. Mukherjee, A., Martinho, M., Bominaar, E. L., Münck, E. & Que, L. Shape-selective interception by hydrocarbons of the O2-derived oxidant of a biomimetic nonheme iron complex. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **48**, 1780–3 (2009).

143. Kim, S. O., Sastri, C. V., Seo, M. S., Kim, J. & Nam, W. Dioxygen activation and catalytic aerobic oxidation by a mononuclear nonheme iron(II) complex. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 4178–9 (2005).

144. Costas, M., Chen, K. & Que, L. Biomimetic nonheme iron catalysts for alkane hydroxylation. *Coordination Chemistry reviews* **202**, 517–544 (2000).

145. Chen, K. & Que, L. Stereospecific Alkane Hydroxylation by Non-Heme Iron Catalysts: Mechanistic Evidence for an Fe V O Active Species. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 6327–6337 (2001).

146. Bassan, A., Blomberg, M. R. A., Siegbahn, P. E. M. & Que, L. A density functional study on a biomimetic non-heme iron catalyst: insights into alkane hydroxylation by a formally HO-FeV=O oxidant. *Chemistry* **11**, 692–705 (2005).

147. Meunier, B. Metalloporphyrins as versatile catalysts for oxidation reactions and oxidative DNA cleavage. *Chemical Reviews* **92**, 1411–1456 (1992).

148. Fiche toxicologique INRS n°104.

149. Maurer, S. C. *et al.* Catalytic Hydroxylation in Biphasic Systems using CYP102A1 Mutants. *Advanced Synthesis and Catalysis* **347**, 1090–1098 (2005).

150. Goldberg, A. L. & Goff, S. A. The selective degradation of abnormal proteins in bacteria. *Maximizing gene expression.* 287–314 (1986).

151. Barnes, H. J. Maximizing Expression of eukaryotic cytochrome P450s in E. coli. *Methods in enzymology* **272**, 3–14 (1996).

152. Kery, V., Elleder, D. & Kraus, P. Delta-aminolevulinate increases heme saturation and yield of human cystathionine beta-synthase expressed in Escherichia coli. *Archives of biochemistry and biophysics* **316**, 24–29 (1995).

153. Pflug, S., Richter, S. M. & Urlacher, V. B. Development of a fed-batch process for the production of the cytochrome P450 monooxygenase CYP102A1 from Bacillus megaterium in E. coli. *Journal of biotechnology* **129**, 481–8 (2007).

154. Richardson, T. H. *et al.* A universal approach to the expression of human and rabbit cytochrome P450s of the 2C subfamily in Escherichia coli. *Archives of biochemistry and biophysics* **323**, 87–96 (1995).

155. Woodard, S. I. & Dailey, H. A. Regulation of heme biosynthesis in Escherichia coli. *Archives of biochemistry and biophysics* **316**, 110–115 (1995).

156. O'Brian, M. R. & Thöny-Meyer, L. Biochemistry, regulation and genomics of haem biosynthesis in prokaryotes. *Advances in microbial physiology* **46**, 257–318 (2002).

157. Verderber, E. *et al.* Role of the hemA gene product and delta-aminolevulinic acid in regulation of Escherichia coli heme synthesis. *Journal of bacteriology* **179**, 4583–4590 (1997).

158. Kolaj, O., Spada, S., Robin, S. & Wall, J. G. Use of folding modulators to improve heterologous protein production in Escherichia coli. *Microbial cell factories* **8**, 9 (2009).

159. Kyratsous, C. a, Silverstein, S. J., DeLong, C. R. & Panagiotidis, C. a Chaperone-fusion expression plasmid vectors for improved solubility of recombinant proteins in Escherichia coli. *Gene* **440**, 9–15 (2009).

160. de Marco, A., Deuerling, E., Mogk, A., Tomoyasu, T. & Bukau, B. Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in E. coli. *BMC biotechnology* **7**, 32 (2007).

161. de Marco, A., Vigh, L., Diamant, S. & Goloubinoff, P. Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in Escherichia coli by osmolytes, plasmid- or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones. *Cell stress & chaperones* **10**, 329–39 (2005).

162. de Marco, A. & De Marco, V. Bacteria co-transformed with recombinant proteins and chaperones cloned in independent plasmids are suitable for expression tuning. *Journal of biotechnology* **109**, 45–52 (2004).

163. Miroux, B. & Walker, J. E. Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of molecular biology* **260**, 289–98 (1996).

164. Jenkins, C. M., Pikuleva, I. & Waterman, M. R. Expression of eukaryotic cytochromes P450 in E. coli. *Methods in Molecular Biology* **107**, 181–93 (1998).

165. Riesenberg, D. *et al.* High cell density cultivation of Escherichia coli at controlled specific growth rate. *Journal of biotechnology* **20**, 17–27 (1991).

166. Lee, S. Y. High cell-density culture of Escherichia coli. *Trends in biotechnology* **14**, 98–105 (1996).

167. Farinas, E. T., Schwaneberg, U., Glieder, A. & Arnold, F. H. Directed Evolution of a Cytochrome P450 Monooxygenase for Alkane Oxidation. *Advanced Synthesis & Catalysis* **343**, 1–6 (2001).

168. Parikh, a & Guengerich, F. P. Expression, purification, and characterization of a catalytically active human cytochrome P450 1A2:rat NADPH-cytochrome P450 reductase fusion protein. *Protein expression and purification* **9**, 346–54 (1997).

169. Eiteman, M. A. & Altman, E. Overcoming acetate in Escherichia coli recombinant protein fermentations. *Trends in biotechnology* **24**, 530–6 (2006).

170. Liu, M. *et al.* Global transcriptional programs reveal a carbon source foraging strategy by Escherichia coli. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 15921–7 (2005).

171. Bernard, A. & Payton, M. Fermentation and growth of Escherichia coli for optimal protein production. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]* Chapter 5, Unit5.3 (2001).

172. Schwaneberg, U., Schmidt-Dannert, C., Schmitt, J. & Schmid, R. D. A continuous spectrophotometric assay for P450 BM-3, a fatty acid hydroxylating enzyme, and its mutant F87A. *Analytical biochemistry* **269**, 359–66 (1999).

173. Esposito, D. & Chatterjee, D. K. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Current opinion in biotechnology* **17**, 353–8 (2006).

174. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248–54 (1976).

175. Yoshioka, S., Takahashi, S., Hori, H., Ishimori, K. & Morishima, I. Proximal cysteine residue is essential for the enzymatic activities of cytochrome P450cam. *European Journal of Biochemistry* **268**, 252–259 (2001).

176. Kyte, J. & Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology* **157**, 105–32 (1982).

177. Steczko, J., Donoho, G. A., Dixon, J. E., Sugimoto, T. & Axelrod, B. Effect of ethanol and low-temperature culture on expression of soybean lipoxygenase L-1 in Escherichia coli. *Protein Expression and Purification* **2**, 221–227 (1991).

178. LaVallie, E. R. Production of recombinant proteins in Escherichia coli. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]* **Chapter 5**, Unit5.1 (2001).

179. Guengerich, F. P., Martin, M. V., Sohl, C. D. & Cheng, Q. Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Nature protocols* **4**, 1245–51 (2009).

180. Neeli, R. *et al.* The dimeric form of flavocytochrome P450 BM3 is catalytically functional as a fatty acid hydroxylase. *FEBS letters* **579**, 5582–8 (2005).

181. Estabrook, R. W., Shet, M. S., Fisher, C. W., Jenkins, C. M. & Waterman, M. R. The interaction of NADPH-P450 reductase with P450: an electrochemical study of the role of the flavin mononucleotide-binding domain. *Archives of biochemistry and biophysics* **333**, 308–15 (1996).

182. Pham, S. Q., Pompidor, G., Liu, J., Li, X.-D. & Li, Z. Evolving P450pyr hydroxylase for highly enantioselective hydroxylation at non-activated carbon atom. *Chemical communications* **48**, 4618–20 (2012).

183. Peitsch, M. C. Protein Modeling by E-mail. *Nature biotechnology* **13**, 658–660 (1995).

184. Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L. & Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic acids research* **37**, 387–92 (2009).

185. Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. & Schwede, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**, 195–201 (2006).

186. Bridges, a *et al.* Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b5 and cytochrome P450 reductase. *The Journal of biological chemistry* **273**, 17036–49 (1998).

187. www.molinspiration.com.

188. Ramos, J. L. *et al.* Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annual review of microbiology* **56**, 743–68 (2002).

189. Munro, A. W., Girvan, H. M. & McLean, K. J. Variations on a (t)heme - novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. *Natural product reports* **24**, 585–609 (2007).

190. Lentz, O. *et al.* Altering the regioselectivity of cytochrome P450 CYP102A3 of Bacillus subtilis by using a new versatile assay system. *ChemBioChem* **7**, 345–50 (2006).

191. Cirino, P. C., Tang, Y., Takahashi, K., Tirrell, D. A. & Arnold, F. H. Global incorporation of norleucine in place of methionine in cytochrome P450 BM-3 heme domain increases peroxygenase activity. *Biotechnology and bioengineering* **83**, 729–34 (2003).

192. Zilly, F. E. *et al.* Tuning a p450 enzyme for methane oxidation. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **50**, 2720–4 (2011).

193. Nguyen, H. T., Takenaka, N., Bandow, H. & Maeda, Y. Trace level determination of low-molecular-weight alcohols in aqueous samples based on alkyl nitrite formation and gas chromatography. *Analytical sciences* **17**, 639–43 (2001).

194. Chen, M. M. Y., Snow, C. D., Vizcarra, C. L., Mayo, S. L. & Arnold, F. H. Comparison of random mutagenesis and semi-rational designed libraries for improved cytochrome P450 BM3-catalyzed hydroxylation of small alkanes. *Protein Engineering, Design & Selection* **25**, 171–8 (2012).

195. Anthon, G. E. & Barrett, D. M. Comparison of three colorimetric reagents in the determination of methanol with alcohol oxidase. Application to the assay of pectin methylesterase. *Journal of agricultural and food chemistry* **52**, 3749–53 (2004).

196. Meinhold, P., Peters, M. W., Hartwick, A., Hernandez, A. R. & Arnold, F. H. Engineering Cytochrome P450 BM3 for Terminal Alkane Hydroxylation. *Advanced Synthesis & Catalysis* **348**, 763–772 (2006).

197. Vagenende, V., Yap, M. G. S. & Trout, B. L. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry* **48**, 11084–96 (2009).

198. http://www.thegoodscentscompany.com/index.html.

199. Urlacher, V. & Schmid, R. D. Biotransformations using prokaryotic P450 monooxygenases. *Current opinion in biotechnology* **13**, 557–64 (2002).

200. Zaks, a & Klibanov, a M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 3192–6 (1985).

201. Eriksson, T., Börjesson, J. & Tjerneld, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology* **31**, 353–364 (2002).

202. Leung, S. W. & Lai, J. C. K. Differential effects of anionic surfactants on activities of GDH, LDH, and MDH. *Biochemical Engineering Journal* **25**, 79–88 (2005).

203. Hudson, S., Cooney, J. & Magner, E. Proteins in mesoporous silicates. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **47**, 8582–94 (2008).

204. Diaz, J. F. & Balkus Jr, K. J. Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **77**, 115–126 (1996).

205. Yiu, H. H. P. & Wright, P. a. Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic–organic hybrid. *Journal of Materials Chemistry* **15**, 3690 (2005).

206. Sachse, A., Galarneau, A., Coq, B. & Fajula, F. Monolithic flow microreactors improve fine chemicals synthesis. *New Journal of Chemistry* **35**, 259 (2011).

207. El Kadib, A. *et al.* Functionalized inorganic monolithic microreactors for high productivity in fine chemicals catalytic synthesis. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **48**, 4969–72 (2009).

208. Sachse, A., Galarneau, A., Di Renzo, F., Fajula, F. & Coq, B. Synthesis of Zeolite Monoliths for Flow Continuous Processes. The Case of Sodalite as a Basic Catalyst. *Chemistry of Materials* **22**, 4123–4125 (2010).

209. Bordeaux, M., Galarneau, A., Fajula, F. & Drone, J. A regioselective biocatalyst for alkane activation under mild conditions. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **50**, 2075–9 (2011).

210. Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**, 23–28 (1990).

211. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).

212. Agematu, H. *et al.* Hydroxylation of testosterone by bacterial cytochromes P450 using the Escherichia coli expression system. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **70**, 307–11 (2006).

ANNEXES

ANNEXE 1. A13red : séquence nucléotidique

Les n° d'accession GenBank des cytochromes CYP153A13a et P450RhF sont respectivement AY505118 et AF 459424.

```
LOCUS       A13red                  2403 bp
ORIGIN
        1 atgtcaacga gttcaagtac aagtaatgac atccaggcaa aaataattaa cgccacatcc
       61 aaagtcgtgc caatgcatct acagatcaag gcactaaaaa acttgatgaa ggtgaagcgg
      121 aagaccattg gcacttcccg ccctcaggtg cactttgttg aaaccgattt gcctgacgtc
      181 aatgatttgg cgatagaaga tatcgatacg agtaaccctt ttttataccg acaaggtaag
      241 gcgaatgcgt actttaagcg gttgcgtgat gaagcgccgg tgcactacca gaagaacagt
      301 gctttcgggc cgttctggtc ggtaacacgc tacgaagata ttgtcttcgt ggacaagagc
      361 catgatttgt tttccgccga accccaaatt atcttgggtg atcctccgga aggcctgtcg
      421 gttgaaatgt tcatcgctat ggatcctccc aagcacgacg tacagcgtcg ggcagtccag
      481 ggtgttgttg cgcccaagaa cctgaaagaa atggaaggac tgatccgcaa gcgcaccggg
      541 gacgtactcg atagcctgcc gttggacact ccgttcaact gggtgccggt ggtgtcgaaa
      601 gagctgaccg ggcgcatgct cgcctcactg ttagatttcc cgtatgacga acgcgaaaaa
      661 ctggttggct ggtcggatcg attgtccggc gcgtcctcgg caaccggcgg cgagtttacg
      721 aatgaagatg tgtttttga tgatgctgca gatatggcgt gggctttctc caagctttgg
      781 cgtgataaag aagcccgtca aaaagcaggt gaagagccgg gtttcgattt gatcagcatg
      841 cttcagtcca atgaagacac aaaagatctg atcaatcgtc ctttggagtt cattggtaat
      901 ctcgcgttgt tgattgttgg cggtaatgac accacgcgta actcaatgag cgggggggtg
      961 ctggctttaa atcagttccc agagcaattc gagaagctaa aggcgaaccc aaagcttatc
     1021 cccaattggt ctctgaaata ttcgctggca acgccgcttg cgtatatgcg ccgggttgcc
     1081 aagcaggatg tggagctgaa cggacagacc atcaagaagg gtgatcgcgt gctgatgtgg
     1141 tatgcgtcgg gcaaccagga tgagagaaaa tttgagaatc ctgagcaatt catcatcgac
     1201 cgcaaagata cgcgtaacca tgtgtcgttt ggttatgggg ttcaccgttg tatgggcaac
     1261 cgccttgccg aactgcagct gcgtattctg tgggaagagc ttctccctcg ctttgaaaac
     1321 atcgaagtga tcggtgagcc ggagcgcgtg caatcgaact ttgtgcgggg ctattccaag
     1381 atgatggtta agttgacggc taaaaaagaa ttcgtgctgc accggcatca accggtcacc
     1441 atcggagaac ccgccgcccg ggcggtgtcc cgcaccgtca ccgtcgagcg cctggaccgg
     1501 atcgccgacg acgtgctgcg cctcgtcctg cgcgacgccg gcggaaagac attacccacg
     1561 tggactcccg gcgcccatat cgacctcgac ctcggcgcgc tgtcgcgcca gtactccctg
     1621 tgcggcgcgc ccgatgcgcc gagctacgag attgccgtgc acctggatcc cgagagccgc
     1681 ggcggttcgc gctacatcca cgaacagctc gaggtgggaa gcccgctccg gatgcgcggc
     1741 cctcggaacc atttcgcgct cgaccccggc gccgagcact acgtgttcgt cgccggcggc
     1801 atcggcatca ccccagtcct ggccatggcc gaccacgccc gcgcccgggg gtggagctac
     1861 gaactgcact actgcggccg aaaccgttcc ggcatggcct atctcgagcg tgtcgccggg
     1921 cacggtgacc gggccgccct gcacgtgtcc gaggaaggca cccggatcga cctcgccgcc
     1981 ctcctcgccg agcccgcccc cggcgtccag atctacgcgt gcgggcccgg gcggctgctc
     2041 gccggactcg aggacgcgag ccggaactgg cccgacgggg cgctgcacgt cgagcacttc
     2101 acctcgtccc tcgcggcgct cgatccggac gtcgagcacg ccttcgacct cgaactgcgt
     2161 gactcggggc tgaccgtgcg ggtcgaaccc acccagaccg tcctcgacgc gttgcgcgcc
     2221 aacaacatcg acgtgcccag cgactgcgag gaaggcctct gcggctcgtg cgaggtcgcc
     2281 gtcctcgacg gcgaggtcga ccatcgcgac acggtgctga ccaaggccga gcgggcggcg
     2341 aaccggcaga tgatgacctg ctgctcgcgt gcctgtggcg accggctggc cctgcgactc
     2401 tga
```

ANNEXE 2. A13red : séquence protéique

```
LOCUS       A13red                  820 aa
ORIGIN
        1 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MSTSSSTSND IQAKIINATS KVVPMHLQIK ALKNLMKVKR
       61 KTIGTSRPQV HFVETDLPDV NDLAIEDIDT SNPFLYRQGK ANAYFKRLRD EAPVHYQKNS
      121 AFGPFWSVTR YEDIVFVDKS HDLFSAEPQI ILGDPPEGLS VEMFIAMDPP KHDVQRRAVQ
      181 GVVAPKNLKE MEGLIRKRTG DVLDSLPLDT PFNWVPVVSK ELTGRMLASL LDFPYDEREK
      241 LVGWSDRLSG ASSATGGEFT NEDVFFDDAA DMAWAFSKLW RDKEARQKAG EEPGFDLISM
      301 LQSNEDTKDL INRPLEFIGN LALLIVGGND TTRNSMSGGV LALNQFPEQF EKLKANPKLI
      361 PNWSLKYSLA TPLAYMRRVA KQDVELNGQT IKKGDRVLMW YASGNQDERK FENPEQFIID
      421 RKDTRNHVSF GYGVHRCMGN RLAELQLRIL WEELLPRFEN IEVIGEPERV QSNFVRGYSK
      481 MMVKLTAKKE FVLHRHQPVT IGEPAARAVS RTVTVERLDR IADDVLRLVL RDAGGKTLPT
      541 WTPGAHIDLD LGALSRQYSL CGAPDAPSYE IAVHLDPESR GGSRYIHEQL EVGSPLRMRG
      601 PRNHFALDPG AEHYVFVAGG IGITPVLAMA DHARARGWSY ELHYCGRNRS GMAYLERVAG
      661 HGDRAALHVS EEGTRIDLAA LLAEPAPGVQ IYACGPGRLL AGLEDASRNW PDGALHVEHF
      721 TSSLAALDPD VEHAFDLELR DSGLTVRVEP TQTVLDALRA NNIDVPSDCE EGLCGSCEVA
      781 VLDGEVDHRD TVLTKAERAA NRQMMTCCSR ACGDRLALRL *
```

ANNEXE 3. A6red : séquence nucléotidique

La séquence contient trois mutations par rapport à la séquence de CYP153A6 (n° d'accession AJ783967) : 1262C>T, 1341G>C et 1470A>G (la numérotation des mutations prend en compte la séquence AJ783967 et non la séquence indiquée ci-dessous qui inclus l'étiquette histidine, le cytochrome, le peptide de liaison et la réductase).

```
LOCUS       A6red                  2319 bp
ORIGIN
        1 atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tggtgccgcg cggcagccat
       61 atgatgaccg aaatgacggt ggccgccagc gacgcgacga acgcggcgta cgggatggcc
      121 ttggaggaca tcgatgtgag caatcccgtg ctgttccggg acaacacctg gcatccctat
      181 ttcaaacgcc tgcgcgaaga ggatccggtt cactactgca agagcagcat gttcggcccc
      241 tactggtcgg tgaccaagta ccgcgacatc atggcagtcg agaccaaccc gaaggtgttc
      301 tcgtcggagg ctaaaagtgg cggcatcacc atcatggacg acaacgccgc agcatcgctt
      361 cccatgttca tcgccatgga tccaccgaaa cacgatgtcc agcgaaagac cgtgagcccg
      421 atcgtggcgc ccgaaaacct tgccaccatg gaatcggtga ttcgccagcg caccgcggac
      481 ctcctcgacg gattgccgat caatgaagag ttcgactggg tgcatcgggt gtcgatcgaa
      541 ttgaccacga agatgctggc gacgctgttc gattttccct gggacgaccg cgccaagttg
      601 acgcgctggt cggacgtcac cacggcgttg cccggtggcg ggatcatcga ttctgaagaa
      661 cagcgcatgg ccgagctgat ggagtgcgcg acgtatttca ccgagctgtg gaaccagcgc
      721 gtgaatgccg aacccaagaa cgatctcatc tcgatgatgg cccattcgga gtcaacacga
      781 cacatggcgc ccgaggaata tctcggaaac atcgtgctgc tgatcgtcgg cggcaacgac
      841 accacccgca actcgatgac cggcggtgtg ttggccctga acgaatttcc cgacgaatac
      901 cgcaaactgt ccgccaaccc ggcgttgatc agctctatgg tgtcggagat catccggtgg
      961 caaacacctc tttcgcacat gcgtcgtacc gcattggaag acatcgagtt cggcggcaag
     1021 cacatccgcc agggcgacaa agtcgtgatg tggtacgtgt ccggcaaccg ggaccccgag
     1081 gccatcgaca atcccgacac attcatcatc gatcgcgcca agccccgcca gcacttgtcc
     1141 ttcgggttcg gcatccaccg ctgcgtcggc aacagactcg ccgaactaca gctcaacatc
     1201 ctgtgggaag aaatcctcaa acggtggccg gacccactgc agatccaggt tcttcaagaa
     1261 ctgacccgcg tgctctcacc gttcgtcaag ggctacgaat cgctgcccgt gcgcatcaac
     1321 gccgaattcg tgctgcaccg ccatcaaccg gtcaccatcg gagaacccgc cgcccgggcg
     1381 gtgtcccgca ccgtcaccgt cgagcgcctg gaccggatcg ccgacgacgt gctgcgcctc
     1441 gtcctgcgcg acgccggcgg aaagacattg cccacgtgga ctcccggcgc ccatatcgac
     1501 ctcgacctcg gcgcgctgtc gcgccagtac tccctgtgcg gcgcgcccga tgcgccgagc
     1561 tacgagattg ccgtgcacct ggatcccgag agccgcggcg gttcgcgcta catccacgaa
     1621 cagctcgagg tgggaagccc gctccggatg cgcggccctc ggaaccattt cgcgctcgac
     1681 cccggcgccg agcactacgt gttcgtcgcc ggcggcatcg gcatcacccc agtcctggcc
     1741 atggccgacc acgcccgcgc ccgggggtgg agctacgaac tgcactactg cggccgaaac
     1801 cgttccggca tggcctatct cgagcgtgtc gccgggcacg gtgaccgggc cgccctgcac
     1861 gtgtccgagg aaggcacccg gatcgacctc gccgccctcc tcgccgagcc cgccccggc
     1921 gtccagatct acgcgtgcgg gcccgggcgg ctgctcgccg gactcgagga cgcgagccgg
     1981 aactggcccg acggggcgct gcacgtcgag cacttcacct cgtccctcgc ggcgctcgat
     2041 ccggacgtcg agcacgcctt cgacctcgaa ctgcgtgact cggggctgac cgtgcgggtc
     2101 gaacccaccc agaccgtcct cgacgcgttg cgcgccaaca acatcgacgt gcccagcgac
     2161 tgcgaggaag gcctctgcgg ctcgtgcgag gtcgccgtcc tcgacggcga ggtcgaccat
     2221 cgcgacacgg tgctgaccaa ggccgagcgg gcggcgaacc ggcagatgat gacctgctgc
     2281 tcgcgtgcct gtggcgaccg gctggccctg cgactctga
//
```

ANNEXE 4. A6red : séquence protéique

Cette séquence contient la mutation P421L dans la partie cytochrome.

```
LOCUS       A6red                   773 aa
ORIGIN
        1 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MMTEMTVAAS DATNAAYGMA LEDIDVSNPV LFRDNTWHPY
       61 FKRLREEDPV HYCKSSMFGP YWSVTKYRDI MAVETNPKVF SSEAKSGGIT IMDDNAAASL
      121 PMFIAMDPPK HDVQRKTVSP IVAPENLATM ESVIRQRTAD LLDGLPINEE FDWVHRVSIE
      181 LTTKMLATLF DFPWDDRAKL TRWSDVTTAL PGGGIIDSEE QRMAELMECA TYFTELWNQR
      241 VNAEPKNDLI SMMAHSESTR HMAPEEYLGN IVLLIVGGND TTRNSMTGGV LALNEFPDEY
      301 RKLSANPALI SSMVSEIIRW QTPLSHMRRT ALEDIEFGGK HIRQGDKVVM WYVSGNRDPE
      361 AIDNPDTFII DRAKPRQHLS FGFGIHRCVG NRLAELQLNI LWEEILKRWP DPLQIQVLQE
      421 LTRVLSPFVK GYESLPVRIN AEFVLHRHQP VTIGEPAARA VSRTVTVERL DRIADDVLRL
      481 VLRDAGGKTL PTWTPGAHID LDLGALSRQY SLCGAPDAPS YEIAVHLDPE SRGGSRYIHE
      541 QLEVGSPLRM RGPRNHFALD PGAEHYVFVA GGIGITPVLA MADHARARGW SYELHYCGRN
      601 RSGMAYLERV AGHGDRAALH VSEEGTRIDL AALLAEPAPG VQIYACGPGR LLAGLEDASR
      661 NWPDGALHVE HFTSSLAALD PDVEHAFDLE LRDSGLTVRV EPTQTVLDAL RANNIDVPSD
      721 CEEGLCGSCE VAVLDGEVDH RDTVLTKAER AANRQMMTCC SRACGDRLAL RL*
```

ANNEXE 5. A1red : séquence nucléotidique

La séquence contient cinq mutations par rapport à la séquence de CYP153A1 (n° d'accession AJ 311718) : 135T>C, 438A>G, 503C>T, 623G>A, 842A>G (la numérotation des mutations prend en compte la séquence AJ311718 et non la séquence indiquée ci-dessous qui inclus l'étiquette histidine, le cytochrome, le peptide de liaison et la réductase).

```
LOCUS       A1red               2550 bp
ORIGIN
        1 atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tggtgccgcg cggcagccat
       61 atgatgaact cagtcgcgga gatttttgag aagataaccc aaactgtcac cagcaccgct
      121 gcagacgtag caaccacggt tacggataaa gtcaagtcta atgagcagtt tcaaacgggc
      181 aagcagtttt tgcatggCca agtgacccgt tttgtcccat tgcacacgca ggttcgcggc
      241 attcagtgga tgcaaaaagc caaattccgt gtgtttaacg tgcaagaatt tcctgcattt
      301 atcgagcaac cgattccaga agttgcaaca ctggcacttg ctgagattga tgttagcaac
      361 ccatttttat acaagcaaaa aaaatggcag tcttacttta agcggctgcg tgatgaagca
      421 ccggtacatt atcaagccaa cagtccgttt ggggcatttt ggtcggtcac gcgttacgat
      481 gatattgtct atgtcgataa Gaatcatgag atttttttcag ctgaacctgt gatcgcgatt
      541 ggcaacaccc ctcctgggtt agatgTtgaa atgtttattg caatggaccc acccaagcac
      601 gatgtgcagc ggcaggccgt acaggatgta gtcgcaccaa aaaatctcaa agagctagag
      661 ggtttgattc ggctacgcgt gcaagAggtt ttggatcagt tgccaacgga tcagccgttt
      721 gattgggtgc agaatgtttc gattgagctg acagcccgta tgttggcaac attatttgat
      781 ttcccatacg aaaagcggca caaattggtt gaatggtcag acttgatggc tggcactgcg
      841 gaggccacag gtgggacagt gacaaatttg gatgagattt ttgatgcagc agtcgatgca
      901 gcaaGgcatt ttgcggagtt atggcataga aaagccgcac aaaaatctgc aggcgctgaa
      961 atgggctatg atttgatcag cttgatgcag tcaaacgaag cgactaaaga cctgatttat
     1021 cggccgatgg agtttatggg caatttggtc ttgctaattg tcggcggcaa cgataccaca
     1081 cgcaactcga tgacgggtgg ggtatacgca cttaacctgt ttccaaatga gttcgtcaaa
     1141 ctcaaaaaca atccgagctt gatcccgaac atggtatccg aaattattcg ctggcaaacc
     1201 ccgctggcct atatgcgtcg gattgccaag caagatgtag agcttaacgg tcagaccatc
     1261 aaaaaaggcg acaaggtggt gatgtggtac gtttctggca accgcgatga gcgagtgatt
     1321 gagcgacctg atgaattgat cattgatcgt aaaggtgcgc gtaatcatct gtcatttggt
     1381 tttggtgtgc atcgctgtat gggtaatcgc ttggccgaga tgcagttgcg aatcttatgg
     1441 gaagagctgc ttcagcgttt tgaaaatatt ggggttttgg gtgagccaga aattgtgcaa
     1501 tctaactttg tgcgcggcta tgccaagatg atggtcaaac tgactgccaa agcggaattc
     1561 gtgctgcacc gccatcaacc ggtcaccatc ggagaacccg ccgcccgggc ggtgtcccgc
     1621 accgtcaccg tcgagcgcct ggaccggatc gccgacgacg tgctgcgcct cgtcctgcgc
     1681 gacgccggcg gaaagacatt gcccacgtgg actcccggcg cccatatcga cctcgacctc
     1741 ggcgcgctgt cgcgccagta ctccctgtgc ggcgcgcccg atgcgccgag ctacgagatt
     1801 gccgtgcacc tggatcccga gagccgcggc ggttcgcgct acatccacga acagctcgag
     1861 gtgggaagcc cgctccggat gcgcggccct cggaaccatt tcgcgctcga ccccggcgcc
     1921 gagcactacg tgttcgtcgc cggcggcatc ggcatcaccc cagtcctggc catggccgac
     1981 cacgcccgcg cccgggggtg gagctacgaa ctgcactact gcggccgaaa ccgttccggc
     2041 atggcctatc tcgagcgtgt cgccgggcac ggtgaccggg ccgccctgca cgtgtccgag
     2101 gaaggcaccc ggatcgacct cgccgccctc ctcgccgagc ccgcccccgg cgtccagatc
     2161 tacgcgtgcg ggcccgggcg gctgctcgcc ggactcgagg acgcgagccg gaactggccc
     2221 gacggggcgc tgcacgtcga gcacttcacc tcgtccctcg cggcgctcga tccggacgtc
     2281 gagcacgcct tcgacctcga actgcgtgac tcggggctga ccgtgcgggt cgaacccacc
     2341 cagaccgtcc tcgacgcgtt gcgcgccaac aacatcgacg tgcccagcga ctgcgaggaa
     2401 ggcctctgcg gctcgtgcga ggtcgccgtc ctcgacggcg aggtcgacca tcgcgacacg
     2461 gtgctgacca aggccgagcg ggcggcgaac cggcagatga tgacctgctg ctcgcgtgcc
     2521 tgtggcgacc ggctggccct gcgactctga
//
```

ANNEXE 6. A1red : séquence protéique

La séquence contient trois mutations par rapport à la séquence de CYP153A1 (n° d'accession AJ 311718) : A168V, G208E et K281R (la numérotation des mutations prend en compte la séquence AJ311718 et non la séquence indiquée ci-dessous qui inclus l'étiquette histidine, le cytochrome, le peptide de liaison et la réductase).

```
LOCUS       A1red                849 aa
ORIGIN
        1 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MMNSVAEIFE KITQTVTSTA ADVATTVTDK VKSNEQFQTG
       61 KQFLHGQVTR FVPLHTQVRG IQWMQKAKFR VFNVQEFPAF IEQPIPEVAT LALAEIDVSN
      121 PFLYKQKKWQ SYFKRLRDEA PVHYQANSPF GAFWSVTRYD DIVYVDKNHE IFSAEPVIAI
      181 GNTPPGLDVE MFIAMDPPKH DVQRQAVQDV VAPKNLKELE GLIRLRVQEV LDQLPTDQPF
      241 DWVQNVSIEL TARMLATLFD FPYEKRHKLV EWSDLMAGTA EATGGTVTNL DEIFDAAVDA
      301 ARHFAELWHR KAAQKSAGAE MGYDLISLMQ SNEATKDLIY RPMEFMGNLV LLIVGGNDTT
      361 RNSMTGGVYA LNLFPNEFVK LKNNPSLIPN MVSEIIRWQT PLAYMRRIAK QDVELNGQTI
      421 KKGDKVVMWY VSGNRDERVI ERPDELIIDR KGARNHLSFG FGVHRCMGNR LAEMQLRILW
      481 EELLQRFENI GVLGEPEIVQ SNFVRGYAKM MVKLTAKAEF VLHRHQPVTI GEPAARAVSR
      541 TVTVERLDRI ADDVLRLVLR DAGGKTLPTW TPGAHIDLDL GALSRQYSLC GAPDAPSYEI
      601 AVHLDPESRG GSRYIHEQLE VGSPLRMRGP RNHFALDPGA EHYVFVAGGI GITPVLAMAD
      661 HARARGWSYE LHYCGRNRSG MAYLERVAGH GDRAALHVSE EGTRIDLAAL LAEPAPGVQI
      721 YACGPGRLLA GLEDASRNWP DGALHVEHFT SSLAALDPDV EHAFDLELRD SGLTVRVEPT
      781 QTVLDALRAN NIDVPSDCEE GLCGSCEVAV LDGEVDHRDT VLTKAERAAN RQMMTCCSRA
      841 CGDRLALRL*
//
```

ANNEXE 7. Alignement global des séquences protéiques de CYP153A1, A6 et A13a

```
CYP153A13a      ----------MSTSSSTSNDIQAKIIN----------------ATSKVVPMHLQIKAL 32
CYP153A1        MNSVAEIFEKITQTVTSTAADVATTVTDKVKSNEQFQTGKQFLHGQVTRFVPLHTQVRGI 60
CYP153A6        ----------MTEMTVAASDATNAAYG------------------------------ 17
                           : :: *      .

CYP153A13a      KNLMKVKRKTIGTSRPQVHFVETDLPDVNDLAIEDIDTSNPFLYRQGKANAYFKRLRDEA 92
CYP153A1        QWMQKAKFRVFN-VQEFPAFIEQPIPEVATLALAEIDVSNPFLYKQKKWQSYFKRLRDEA 119
CYP153A6        ----------------------------MALEDIDVSNPVLFRDNTWHPYFKRLREED 47
                                           :*: :**.***.*::: . :.******:*

CYP153A13a      PVHYQKNSAFGPFWSVTRYEDIVFVDKSHDLFSAEP---QIILGDPPEGLSVEMFIAMDP 149
CYP153A1        PVHYQANSPFGAFWSVTRYDDIVYVDKNHEIFSAEP---VIAIGNTPPGLDAEMFIAMDP 176
CYP153A6        PVHYCKSSMFGPYWSVTKYRDIMAVETNPKVFSSEAKSGGITIMDDNAAASLPMFIAMDP 107
                **** .* **.:****:* **: *:.. .:**:*.    * : :   . .  *******

CYP153A13a      PKHDVQRRAVQGVVAPKNLKEMEGLIRKRTGDVLDSLPLDTPFNWVPVVSKELTGRMLAS 209
CYP153A1        PKHDVQRQAVQDVVAPKNLKELEGLIRLRVQGVLDQLPTDQPFDWVQNVSIELTARMLAT 236
CYP153A6        PKHDVQRKTVSPIVAPENLATMESVIRQRTADLLDGLPINEEFDWVHRVSIELTTKMLAT 167
                *******::*. :***:**  :*.:** *. .:** ** :  *:**  ** *** :***:

CYP153A13a      LLDFPYDEREKLVGWSDRLSGASSATGGEFTNEDVFFDDAADMAWAFSKLWRDKEARQKA 269
CYP153A1        LFDFPYEKRHKLVEWSDLMAGTAEATGGTVTNLDEIFDAAVDAAKHFAELWHRKAAQKSA 296
CYP153A6        LFDFPWDDRAKLTRWSDVTT--ALPGGGIIDSEEQRMAELMECATYFTELWN-----QRV 220
                *:***::.* **. ***  :  : . ** . . :  :    : *  *::**.     : .

CYP153A13a      GEEPGFDLISMLQSNEDTKDLINRPLEFIGNLALLIVGGNDTTRNSMSGGVLALNQFPEQ 329
CYP153A1        GAEMGYDLISLMQSNEATKDLIYRPMEFMGNLVLLIVGGNDTTRNSMTGGVYALNLFPNE 356
CYP153A6        NAEPKNDLISMMAHSESTRHMA--PEEYLGNIVLLIVGGNDTTRNSMTGGVLALNEFPDE 278
                . *   ****::  .* *:.:   * *::**:.***************:*** *** **::

CYP153A13a      FEKLKANPKLIPNWSLKYS-LATPLAYMRRVAKQDVELNGQTIKKGDRVLMWYASGNQDE 388
CYP153A1        FVKLKNNPSLIPNMVSEIIRWQTPLAYMRRIAKQDVELNGQTIKKGDKVVMWYVSGNRDE 416
CYP153A6        YRKLSANPALISSMVSEIIRWQTPLSHMRRTALEDIEFGGKHIRQGDKVVMWYVSGNRDP 338
                : **. ** **..   :     ***::*** * :*:*:.*: *::**:*:***.***:*

CYP153A13a      RKFENPEQFIIDRKDTRNHVSFGYGVHRCMGNRLAELQLRILWEELLPRFEN---IEVIG 445
CYP153A1        RVIERPDELIIDRKGARNHLSFGFGVHRCMGNRLAEMQLRILWEELLQRFEN---IEVLG 473
CYP153A6        EAIDNPDTFIIDRAKPRQHLSFGFGIHRCVGNRLAELQLNILWEEILKRWPDPLQIQVLQ 398
                . ::.*: :****  .*:*:***:*:***:******:**.*****:* *: :   *:*:

CYP153A13a      EPERVQSNFVRGYSKMMVKLTAKK 469
CYP153A1        EPEIVQSNFVRGYAKMMVKLTAKA 497
CYP153A6        EPTRVLSPFVKGYESLPVRINA-- 420
                **  * * **:** .: *::.*
```

ANNEXE 8. Alignement global des séquences protéiques de CYP153A13 et CYP2B4.

```
A13              1 MSTSSSTSNDIQAKIINATSKVVPMHLQIKALKNLMKVKRKTIGTSRPQV     50
                                         |...:..|...:.....:....|:.
CYP2B4           1 ------------------------mefsllllaflagllllfrghpka     26

A13             51 HF----VETDLPDVNDLAIEDIDTSNPFLYRQGKANAYFKRLRDEAPVHY     96
                   |.    ..:.||.:.:|...|         |:|...: |.|||::
CYP2B4          27 hgrlppgpsplpvlgnllqmd---------rkgllrs-flrlrek-----     61

A13             97 QKNSAFGPFWSV------------TRYEDIVFVDKSHDLFSAEPQIILGD    134
                        :|..::|            |.......||:: :.||...:|.:.|
CYP2B4          62 -----ygdvftvylgsrpvvvlcgtdairealvdqa-eafsgrgkiavvd    105

A13            135 PP-EGLSV-----------EMFIAMDPPKHDVQRRAVQGVVAPKNLKEME    172
                   |. :|..|           ..|.........:.:|:|:..:..:....:|
CYP2B4         106 pifqgygvifangerwralrrfslatmrdfgmgkrsveeriqeearclve    155

A13            173 GLIRKRTGDVLDSLPLDTPFNWVPVVSKELTGRMLASLL---DFPYDERE    219
                   .| ||..|.:||:          .::...:|..::.|::   .|.|.:..
CYP2B4         156 el-rkskgalldn----------tllfhsitsniicsivfgkrfdykdpv    194

A13            220 KLVGWSDRLSGASSATGGEFTNEDVFFDDAADMAWAFS------------    257
                   .|     ||.             |:|| .:..:..:||
CYP2B4         195 fl-----rll-------------dlff-qsfslissfssqvfelfsgflk    225

A13            258 -------KLWRDKE----------ARQKAGEEPG----FDLISMLQSNED    286
                          :::|:.:          .:.:|..:|.    |..:.:|:..:|
CYP2B4         226 hfpgthrqiyrnlqeintfitqsvekhratldpsnprdfidvyllrmekd    275

A13            287 TKDLINRPLEF-IGNLAL----LIVGGNDTTRNSMSGGVLALNQFPEQFE    331
                   ..|..:   || ..||.|    |...|.:||..:..|.|.:.::|...|
CYP2B4         276 ksdpss---efhhqnliltvlslffagtettsttlrygfllmlkyphvte    322

A13            332 KLKAN----------PKLIPNWSLKYSLAT-----------PLAYMRRVA    360
                   ::::.          |.|.....:.|:.|.           |......|.
CYP2B4         323 rvqkeieqvigshrppalddrakmpytdaviheiqrlgdlipfgvphtvt    372

A13            361 KQDVELNGQTIKKGDRVLMWYASGNQDERKFENPEQF----IIDR----K    402
                   | |.:..|..|.|...|....:|...|.|.|:.|..|    .:|.    |
CYP2B4         373 k-dtqfrgyvipkntevfpvlssalhdpryfktpntfnpghfldangalk    421

A13            403 DTRNHVSFGYGVHRCMGNRLAELQLRILWEELLPRF--------ENIEV-    443
                   .....:.|..|...|:|..:|..:|.:.:..:|..|        |:|::
CYP2B4         422 rnegfmpfslgkrvclgegiartelflffttilqnfsiaspvppedidlt    471

A13            444 -----IGE-PERVQSNFVRGYSKMMVKLTAKK    469
                        :|. |...|..|:..
CYP2B4         472 presgvgnvppsyqirflar------------    491
```

ANNEXE 9. Alignement de 36 cytochromes de la famille CYP153

Alignement réalisé avec le logiciel ClustalW2 d'EMBL-EBI.

```
CYP153A19       ------------------------------------------------------------
CYP153A20       ------------------------------------------------------------
CYP153A13       -----------------------------MSTSSSTSNDIQAKVINAT---------- 19
CYP153A13a      -----------------------------MSTSSSTSNDIQAKIINAT---------- 19
CYP153A12       -----------------------------MSTSSSTSNDIQAKVINAT---------- 19
CYP153A14       ------------------------------------------------------------
CYP153A16       ------------------------------------MSNIREAVTAKA---------- 12
CYP153A1        -------------------MNSVAEIFEKITQTVTSTAADVATTVTDKVKSNEQFQTGK 40
CYP153A18       ------------------------------------------------------------
CYP153A25       ------------------------------------------------------------
CYP153A21       ------------------------------------------------------------
CYP153A22       ------------------------------------------------------------
CYP153A23       ------------------------------------------------------------
CYP153A24       ------------------------------------------------------------
CYP153A15       ------------------------------------------------------------
CYP153A17       ------------------------------------------------------------
CYP153A30       ------------------------------------------------------------
CYP153A2        ------------------------------------------------------------
CYP153A26       ------------------------------------------------------------
CYP153A27       ------------------------------------------------------------
CYP153A28P      ------------------------------------------------------------
CYP153A6        ------------------------------------------------------------
CYP153A7        ------------------------------------------------------------
CYP153A31       ------------------------------------------------------------
CYP153A4        ------------------------------------------------------------
CYP153A5        ------------------------------------------------------------
CYP153A3        ------------------------------------------------------------
CYP153A8        ------------------------------------------------------------
CYP153A11       ------------------------------------------------------------
CYP153A29       ------------------------------------------------------------
CYP153A9        ------MNR-RLEIHR---------------------------------------------- 9
CYP153A10       MRHVSCLRRSRLERSRGRARRPGGFHADLFTDPQGQLAALLPDRGARGTRRTGPAPSRRP 60
CYP153E1        ------------------------------------------------------------
CYP153D2        ------------------------------------------------------------
CYP153D3        ------------------------------------------------------------
CYP153D1        ------------------------------------------------------------
CYP153C1        ------------------------------------------------------------


CYP153A19       -----------------------------------MSQAFTHTPTSDVELSSTTNIAD 23
CYP153A20       -----------------------------------MSQAFKHTPPATQPLTSKTNVAD 23
CYP153A13       -------SKVVPMHLQIKALKNLMKVKRKTIGTSRPQVHFVETDLPDVNDLAIEDIDTSN 72
CYP153A13a      -------SKVVPMHLQIKALKNLMKVKRKTIGTSRPQVHFVETDLPDVNDLAIEDIDTSN 72
CYP153A12       -------SKVVPMHLQIKALKNLMKVKRKTIGTSRPQVHFVETDLPDVNDVAIEDIDTSN 72
CYP153A14       ------------MDRIIQGAHLYDRTRRWVTGTNG-EKIFIERPIPPADEVELTDIDLSN 47
CYP153A16       -------QATIPMDRIIQGAHLYDRTRRWVTGTNG-EKIFIERPIPPADEVELTDIDLSN 64
CYP153A1        QFLHGQVTRFVPLHTQVRGIQWMQKAKFRVFNVQE-FPAFIEQPIPEVATLALAEIDVSN 99
CYP153A18       --------------------------------MTTANQTSPNGAIDVNDIPLAELDVSQ 27
CYP153A25       ---------------------------------------MSIHPEIDNSSGPLRELDVSL 21
CYP153A21       -----------------MSQAAVQPEGEIDHT-------------ERAWSMPLKDINIAD 30
CYP153A22       -----------------MSQAAAETPSTVDHQ-------------ERAWSMPLEDINVAD 30
CYP153A23       -----------------MSQAVAEPQTDVDHA-------------ERAWSMPLNEINPAR 30
CYP153A24       -----------------MSQAVAEPHTEIDHT-------------ERAWSMPLNEFNPAQ 30
CYP153A15       ---------MAADTVSFVNHPALERPKVTEREPLHPHNLRFGANIPPAADIDLSTLDLID 51
CYP153A17       -----------------MTQATAATPLTDEFN--------------PAEVALRDIDLSD 28
CYP153A30       -----MSEQVSVGRDYTRSNADLAAKWKIDVN-------------RDPWSIPLEELDPAH 42
CYP153A2        ------------------MMSQNTDPREDLMSDGSIDLKAD-ARARAYSIPLEDYHVAD 40
CYP153A26       --------------------------------MSDAAVKYEADEARDEAYSIPLAEINVAD 29
CYP153A27       --------------------------------MSETLVAARDK-SIADAYAIPLEKIDVSN 28
CYP153A28P      --------------------------------MSSMNVAERVQ-SLDDPYAIPLDKLNVSD 28
CYP153A6        --------------------------------MTEMTVAASDA--TNAAYGMALEDIDVSN 27
CYP153A7        ---------------------------------MEHTGQSAAAT-------MPLDSIDVSI 21
CYP153A31       --------------------------------MTATASAAAPAGIDDPYALSLDQIDVSK 28
```

```
CYP153A4        -MDGRRRRPMPLPQAGEVRKTTGATTMNIQTPVKVDKAERMRRARGEAYATPLAQFHPGA 59
CYP153A5        ---------MTWP---------GRTTM--HGTIETGKAARLRAAREEAYATPLKDFHPGA 40
CYP153A3        ------------------------------------------------------------
CYP153A8        ----------------------------------MDTDMVEPNIREKVAFIPIDEIDVAR 26
CYP153A11       ----------------------------------MQSGPDREEPDRPIAEIPLAEIDVSR 26
CYP153A29       ----------------------------------MTTDTLVG---DTASTVPLSQMDVSD 23
CYP153A9        -------------------------------------------ADDGYIIPLSELDVSE 25
CYP153A10       ALTTLARHSNPVPDKALAPLTRNCHSAKVNCMNTLVVDSSHVRLAPDALSQPVEDIDPSL 120
CYP153E1        ----------------------------------MKMTKQLQDVFEDIDAVPLEKINPAS 26
CYP153D2        --------------MAT--------------------------VIRETPADLHPLDLSR 19
CYP153D3        --------------MASTA------------------------TLVRTASPIAPIDVSL 21
CYP153D1        --------------MATQLAPEVPQFTYHSSPTATEAFAAWLKDNPQAIPAHSHPWDVSR 46
CYP153C1        --------------MAAT---------------------------LAPDRAINPHDVSL 18


CYP153A19       PDIWSNYEYFPIFEKMRAEEPVHYCA-ESTYGPYWSVTRYEDIMAVDTNHQVYSSEA--- 79
CYP153A20       PALWESYSYFPIFEQMRQEDPVHYCA-ESTYGPYWSVTRYEDIMAVDTNHHVYSSDA--- 79
CYP153A13       PFLYRQGKANAYFKRLRDEAPVHYQK-NSAFGPFWSVTRYEDIVFVDKSHDLFSAEP--- 128
CYP153A13a      PFLYRQGKANAYFKRLRDEAPVHYQK-NSAFGPFWSVTRYEDIVFVDKSHDLFSAEP--- 128
CYP153A12       PFLYRQSKSNSYFKRLRDEAPVHYQK-DSAFGPFWSITRYEDIVFVDKNHELFSSEP--- 128
CYP153A14       PFLYRQGRWKSYYERLRNEAPVHYQA-HSAFGPFWSVTRHADIVAVDKNHEVFSSEP--- 103
CYP153A16       PFLYRQGRWKSYYERLRNEAPVHYQA-HSAFGPFWSVTRHADIVAVDKNHEVFSSEP--- 120
CYP153A1        PFLYKQKKWQSYFKRLRDEAPVHYQA-NSPFGAFWSVTRYDDIVYVDKNHEIFSAEP--- 155
CYP153A18       PHLFKNDTWRPWFARLRAEAPVHYLA-DSENGPFWSVTSHDMTKAVDANHKVFSSEEGGI 86
CYP153A25       PEHYENDTWRPMFARLRKEAPVHYLS-DSVNGPFWSVTSHALIKEVDANNSIFSSEKGGI 80
CYP153A21       PDIFQADAIWPYFERLRKEAPVHKAY-SPDFGEYWSVTRYEDIMAVDTNHHVFSSS---- 85
CYP153A22       GALFQDDAIWPYFERLRKEAPVHKGH-SDEFGDYWSVTRYEDIMAVDTNHHVFSS----- 84
CYP153A23       RDLFQNDVIWPYFERLRKEAPVHKAY-DEDFGEYWSVTRYEDIMAVDTNHHVFSSD---- 85
CYP153A24       RDLFQNDVIWPYFERLREEAPVHKCF-DEEFGEYWSVSSYEHIMAVDTNHQVFSSS---- 85
CYP153A15       GELWRQGKYWDRFERLRNEDPLHYCP-DSFPGPFWSVTRYEDVMAIDTDHKRFSSS---- 106
CYP153A17       ANHFFNQHHWKLFERLRNEDPVHFFE-HEEFGRFWSVTRHADIMSIDTNHQQFSSEP--- 84
CYP153A30       DELFAANTVLPYFERLRKEDPVHLNE-TGPYGRYWSVTKYEDIMHVDTNHKIFSSD---- 97
CYP153A2        PALFQADAMWPYFERLRKEAPVHYSKGDEEVGPYWSVTRYNDIMTVDTTHQVFSSDA--- 97
CYP153A26       PSLFRDYKMWPYFERLRAEAPVHYSQGNEDTGPYWSVTRYNDIMSVDTNHQVFSSE---- 85
CYP153A27       PELFRANAIWPYFERLRREDPVHYCK-ESEYGSFWSVTKYKDIMHVDTNHGIYSSEA--- 84
CYP153A28P      PELFRSNRMWPYFERLRREDPVHYCA-ESAYGPFWSVTKYKDIMHVETNHGVYSSDV--- 84
CYP153A6        PVLFRDNTWHPYFKRLREEDPVHYCK-SSMFGPYWSVTKYRDIMAVETNPKVFSSEA--- 83
CYP153A7        PELFYNDSVGEYFKRLRKDDPVHYCA-DSAFGPYWSITKYNDIMHVDTNHDIFSSDA--- 77
CYP153A31       PELFERNAEGAYFARLRREDPVHFCA-DSAYGPYWSITKYKDIMAVDTNHQVFSSEA--- 84
CYP153A4        PRLFQDDTLWPWFERLRKEEPVHYCT-NAPIEPYWSVVKYNDIMHVDTNHGIFSSDS--- 115
CYP153A5        PRHFRDDTLWPWFERLRAEEPVHYCT-NAPIEPYWSVTKYNDIMHVDTNHQIFSSDS--- 96
CYP153A3        ---------------------MHYCK-DSMFGPYWSVTRYNDIMEIETNHSVFSSAS--- 35
CYP153A8        PSLFQKDTVGLFFERLRREEPVHYCR-ESYVGPYWSITKFDDIMAVDTNHKVFSSEA--- 82
CYP153A11       PSLFQSDKVGAFFERLRREDPVHYCS-ESAFGPYWSITRYNDIMAVDTNHKLFSSEA--- 82
CYP153A29       PKLFQSDMIGSYFARLRREDPVHYCP-ESAYGPYWSVTKFNDIMQVEVNHQTFSSEA--- 79
CYP153A9        GKRFQDDSIWGCFERLRREDPVHYCQ-NSAHGPYWSITKYRDIVAVDTNHHAFSSQQ--- 81
CYP153A10       PYRFQQQTHFAMFDRLRRESPVHYVK-DSEYGPFWSVHRYNDIIDVEIDHATFSSDV--- 176
CYP153E1        RDRFINAAELPMFERLRREDPVHFTP-ESEFGPYWSLTLWEDIRAVGNNYRDFTSTQ--- 82
CYP153D2        ADLWREDQWQEPMRQLRAESPIYYCE-DSKFGPYWSVTTYKPIQHIEALPKIFSSSWE-- 76
CYP153D3        PELYAEDRWQEPFRTLRAQAPIQYVP-DSKFGPYWSVTTYKPIVYIEALPKLFSSSWQ-- 78
CYP153D1        SDIYVEDRWQPIFAEMRAKAPVNRVP-DSPYGAYWNVASHKAIMHVESLPELFSSSWQ-- 103
CYP153C1        NALYTEDRWREPFRWLRENMPVSYRA-ESPFGAYWSVVTHDLIQQVELDPGTYSSSWQ-- 75
                                  :           :*.:        :      :::


CYP153A19       --DFGGIVIDDRI--AI-DPETNYKSAS-----FISMDQPKHDDQRKSVNGITNPNNLQY 129
CYP153A20       --HLGGIIIDDGI--QN-DPENDFKAVN-----FIAMDKPKHDEQRKSVNGITNPNNLQH 129
CYP153A13       QIILGDPPEG-------------LSVEM-----FIAMDPPKHDVQRRAVQGVVAPKNLKE 170
CYP153A13a      QIILGDPPEG-------------LSVEM-----FIAMDPPKHDVQRRAVQGVVAPKNLKE 170
CYP153A12       QITLGEFPEG-------------LSVEM-----FIAMDPPKHDVQRRAVQGVVAPKNLKE 170
CYP153A14       FIVIGSPPRF-------------LDIAM-----FIAMDPPKHDRQRQAVQGVVAPKNLRE 145
CYP153A16       FIVIGSPPRF-------------LDIAM-----FIAMDPPKHDRQRQAVQGVVAPKNLRE 162
CYP153A1        VIAIGNTPPG-------------LDAEM-----FIAMDPPKHDVQRQAVQDVVAPKNLKE 197
CYP153A18       AIVDPQPLDGE----------QLMRDPS-----FISMDEPKHATQRKAVSPAVAPKNLAE 131
CYP153A25       SIVDLKPVEG------------QVQGKN-----FIAMDEPEHSIQRSAVAPSVAPKNLVE 123
CYP153A21       -WEHGGITLF--------DQISDFQLPM-----FIAMDPPKHDQQRITVQPIVAPNNLKN 131
CYP153A22       ---EGAITLA--------DPLEDFRAPM-----FIAMDPPKHDKQRITVQPIVAPKNLQN 128
CYP153A23       -WTNGGITLF--------DAAEDFRLPM-----FIAMDPPKHDQQRITVQPIVAPNNLKN 131
CYP153A24       -WEHGGITLF--------DGPEDFQLPM-----FIAMDQPKHDEQRKTVQPIVAPNNLKS 131
```

```
CYP153A15       -WEYGGITLG--------EPISDFEMPM-----FIAMDEPRHSEQRKTVQPAVAPDMLKV 152
CYP153A17       -SIFLGNTNS--------DEDENFNPAT-----FIAMDPPKHDAQRNAVNPAVAPPALRD 130
CYP153A30       -IRNGGIRLGGQR--IEGEPDPLTYLPM-----FIMEDPPKHDEQRKAVQPMFTPQNLAD 149
CYP153A2        --HLGGITIRN--------FDEDFVLPM-----FIAMDQPKHDIQRKTVSPIVSPANLGR 142
CYP153A26       ----GGITLRD--------QDEDFKLPM-----FIAMDPPKHDDQRKVVSPIVAPGNLAK 128
CYP153A27       --TLGGVALRN--------QEEGFFLPM-----FIMMDPPKHDAQRKVVSPIVAPGNLAK 129
CYP153A28P      --EQGGITIRD--------NNAGLKLPM-----FIAMDPPKHDAQRKVVSPIVAPANLAK 129
CYP153A6        --KSGGITIMD--------DNAAASLPM-----FIAMDPPKHDVQRKTVSPIVAPENLAT 128
CYP153A7        --GYGGIIIDDGI--QKG-GDGGLDLPN-----FIAMDRPRHDEQRKAVSPIVAPANLAA 127
CYP153A31       --GLGGIIIEDGI--QKSSGEGSIDLPN-----FIAMDPPKHDGQRKAVSPIVAPANLAN 135
CYP153A4        --TLGGISIRD--------VPEGYDYPS-----FIAMDQPRHSAQRKTVSPMFTPTHLDE 160
CYP153A5        --TLGGISIRD--------APVGYDWPS-----FIAMDEPRHSAQRKTVSPMFTPQHLDE 141
CYP153A3        --ALGGITIRD--------IDPDLRRES-----FISMDPPRHAAQRKTVAPMFTPTHLDN 80
CYP153A8        --KLGGIAIEDMH--S---AKSALELEM-----FIAMDPPKHNQQRKAVTGAVAPSNLLL 130
CYP153A11       --KLGGIAIQDMH--N---DATNLELEM-----FIAMDQPKHDAQRKAVTPAVAPSNLLL 130
CYP153A29       --KLGGIALQDMQ--S---GEAALELEM-----FIAMDPPKHDAQRKAVSPAVAPSNLVL 127
CYP153A9        -----GVTIVE--------VPDKHWTPS-----FIKMGPPQHAEQRNTVSPIVGPESLTR 123
CYP153A10       --KYGGMLIKD--------LPENMRRTS-----FINADPPLHDHQRRVVSPIVAPGNLNR 221
CYP153E1        --NIDLKSIEEKI--KLEAALQALGHERRKNVGFITMDPPEHTKHRKAVTPAVGPSSLAQ 138
CYP153D2        ---YGGITVAGDG--IEHLKEGEIPMPM-----FIAMDPPQHTAQRRTVAPAFGPSEIER 126
CYP153D3        ---YGGISIAFD---SDKLLEHEVRQPM-----FIAMDPPQHTAQRRTVAPSFGPSEVAA 127
CYP153D1        ---YGGITIGDPPEDVDPQKLAERQLPM-----FIAMDRPDHTGQRRTVAPAFTPAKMVE 155
CYP153C1        ---RGNITIADS--------VNETEFPN-----FIAQDPPIHTAQRKVIAPAFGPSQMVK 119
                                                 **  . * *  :*  :    *  :

CYP153A19       FGDIIRTRTVNMLDSLPVGEEFDWVPTVSIELTTQMLATLFDFPFEDRHKLTRWSDVITA 189
CYP153A20       FGEIIRKRTSNLLDSLPVGEEFDWVSTVSIELTTQMLATMFDFPFEDRHKLTRWSDVSTA 189
CYP153A13       MEGLIRKRTGDVLDSLPLDTPFNWVPVVSKELTGRMLASLLDFPYDEREKLVGWSDRLSG 230
CYP153A13a      MEGLIRKRTGDVLDSLPLDTPFNWVPVVSKELTGRMLASLLDFPYDEREKLVGWSDRLSG 230
CYP153A12       MEGLIRKRTGDVLDSLPLDTPFNWVPVVSKELTGRMLASLLDFPYDEREKLVGWSDRLSG 230
CYP153A14       MEGLIRERVVDVLDALPLGEPFNWVQHVSIELTARMLATLLDFPFEQRRKLVQWSDLATS 205
CYP153A16       MEGLIRERVVDVLDALPLGEPFNWVQHVSIELTARMLATLLDFPFEQRRKLVQWSDLATS 222
CYP153A1        LEGLIRLRVQGVLDQLPTDQPFDWVQNVSIELTARMLATLFDFPYEKRHKLVEWSDLMAG 257
CYP153A18       LEPLIRERAADILDNLPVGETFNWVDRVSVELTARMLATLFDFPYERRRDLIRWSDVATA 191
CYP153A25       LEPLIRERAVDILENLPVGETFNWVQEVSIELTARMLTTILDFPYDQRHKLVQWSDLATD 183
CYP153A21       WEGLIRERTGQILDSLPRGEVFDWVDNVS-ELTTMMLATLFDFPFEQRRKLTRWSDVATG 190
CYP153A22       WEGLIRERTGLILDQLPRNETFDWVDKVSIELTTMMLATLFDFPFEERRRLTRWSDVATG 188
CYP153A23       WEGLIRERTAYVLDSLPRGETFDWVDNVSIELTTMMLATLFDFPFEERRKLTFWSDMVT- 190
CYP153A24       WEPLIRERTGMVLDSLPRGETFDWVDNVSIELTTMMLATLFDFPFEDRRKLTFWSDMVT- 190
CYP153A15       YEPLIRSRTQGLLDSLPVNEPFDWVDKVSVELTTMMLATLFDYPFENRRDLTHWSDVATG 212
CYP153A17       LEPLIRQRVSAVLDSLPIGETFNWVDLVSIEITTQMLATLFDFPFEDRYMLTRWSDMTTA 190
CYP153A30       LEPLIRERAGLILDALPRGETFNWVRQVSVELTGRTLATLFNVPQEDRHKLIHWSDTVER 209
CYP153A2        LEGIIRERVCGILDALPINEPFDWVDKVSIELTTQMLATLFDFPWEERRKLTRWSDIATA 202
CYP153A26       LEGTIRERAGKILDELPTGEPVDWVDRVSIELTTQMLATLFDFPFEERRKLTRWSDVATA 188
CYP153A27       LEGTIRERAGNILDSLPVNETFDWVDRVSIELTTQMLATLFDFPWEERRKLTRWSDVAAA 189
CYP153A28P      LEGTIRERAGKILDSLPVNETFNWVDRVSIELTTQMLATLFDFPWEERRKLTRWSDVATS 189
CYP153A6        MESVIRQRTADLLDGLPINEEFDWVHRVSIELTTKMLATLFDFPWDDRAKLTRWSDVTTA 188
CYP153A7        LEGTIRERVSKTLDGLPVGEEFDWVDRVSIEITTQMLATLFDFPFEERRKLTRWSDVTTA 187
CYP153A31       LEGTIRERVGRVLDGLPVGEEFDWVPAVSIELTTQMLATLFDFPFEERSKLTRWSDVATA 195
CYP153A4        LAKLIRQRSQTVLDNLPRNETFNFVERVSIELTTQMLATLFDFPWEERRKLTRWSDVSTA 220
CYP153A5        LAVLIRGRTQKVLDGLPRGETFNFVDRVSIELTTQMLATLFDFPFDERRKLTRWSDVATA 201
CYP153A3        LALNIRARSAECLDNLPRGEVFDWVDRVSIELTTQMLAVLFDFPWEDRRKLTRWSDIATT 140
CYP153A8        LEPTIRERACQILDDLPVGEDIDWVDKVAVELTTMTLATLFDFPWEERRKLTRWSDVTTA 190
CYP153A11       LEPVIRERAGAILDSLPVGEEIDWVKSVSVELTTMTLATLFDFPWDERAKLTRWSDVTTA 190
CYP153A29       LEPIIRERAGIILDSLPIGEEIDWVDRVSIELTTMTLATLFDFPWEERRKLTRWSDVATS 187
CYP153A9        LETLIRSRVRMILDGLPRNEVFNWVTKVSIELTTQTLATLFDFPFEDRRLLTYWSDAAVT 183
CYP153A10       LEHTIRREAADILDGLPRGETFDWVDNVSIELTGRVLCELMDFPRADRRLLTYWSDIVNV 281
CYP153E1        MEPIMRERAGIILDSLPIGEPFDWVDLVSKELTATVLATLLDFPFEERRKLTFWSDLLMF 198
CYP153D2        MRADTQARTAALIDTLPVGEAFDWVERLSIELTTDMLAILFDFPWENRHNLTRWSDALGD 186
CYP153D3        MKAEVQLRTGALLDSLPVGDPFDWVQKVSIELTTGMLARLFDFPWEERHNLTHWSDIGGD 187
CYP153D1        MEAEIRRRTASVLDSLPWGERFDWVDKVSIELTTGMLAILFGFPWADRRLLTFWSDWAGD 215
CYP153C1        LERLVRERTTQLLDGLPMGEEFDWVERVSIPLTLGMLLILFDMPFDEWRDIKRWSDWASG 179
                     : .    :: ** .  .::*  ::  :*   *  ::. *      :  ***

CYP153A19       EPESDIVE--NQEARVAELNEMAEYFVELQKGRINK-----PDSIDLLTMMTHSPAMAKM 242
CYP153A20       EPGSGIVE--TQQQRIDELMEMAAYFSDLQQSRKDK-----PDNIDLLTMMTHSPAMANM 242
CYP153A13       ASSATGGEFTNEDVFFDDAADMAWAFSKLWRDKEARQKAGEEPGFDLISMLQSNEDTKDL 290
CYP153A13a      ASSATGGEFTNEDVFFDDAADMAWAFSKLWRDKEARQKAGEEPGFDLISMLQSNEDTKDL 290
```

```
CYP153A12       ASSATGGEFTNEDVFFDDAADMAWSFSKLWRDKEARQKAGEEPGFDLISMLQSNDDTKDL 290
CYP153A14       MEQANGGPSDNDEIFRG-MVDMARGLSAHWRDKAARTAAGELPGFDLITMLQSDESTKDL 264
CYP153A16       MEQANGGPSDNDEIFRG-MVDMARGLSAHWRDKAARTAAGELPGFDLITMLQSDESTKDL 281
CYP153A1        TAEATGGTVTNLDEIFDAAVDAAKHFAELWHRKAAQKSAGAEMGYDLISLMQSNEATKDL 317
CYP153A18       VPKVTG-EANDMGARRDALIECATTFYQLWQER-----AAQPPKFDFVSMLAHGEATKHL 245
CYP153A25       VPQVTGKEGTDMQARYDELMNCAAAFYQLWVSK-----SGQPPSFDLISMLQNNPDTARM 238
CYP153A21       RNNPEIV--ADDDQWRAELLECLEAFTDIWNERI----NSDTPGNDLITMLTRGESTKNM 244
CYP153A22       RDNPEIY--KSEEQWRGELMECLEAFTGLWNDRV----NSDTPGNDLISMLASGESTKNM 242
CYP153A23       TDPKTLE--GGVEEKRGHLLACLEYFTGLWNERI----NSDTPGNDLITMLTRGESTKNM 244
CYP153A24       TDANTLE--GGEEEWKGHLLECLAYFTELWNQRI----NSDKPGNDLITMLTRGEATKNM 244
CYP153A15       MHNPDICP-GGEEEWKATMMKCLMTFMGIYQERQ----QQPQK-PDLMSLLAHGEKTKNM 266
CYP153A17       NPETLAAMGLTIEDRRNAMYECLEIFGGLYAER-----AQLPPANDFISLMAHNEDMKNL 245
CYP153A30       LGDPEYF--ETPEEGFKELWNCWEYFDGVWKDR------LANPGSDLISLLAHSPSTKNM 261
CYP153A2        SP-ESGLI-ESEEARRAELLECLAYFTNLWNERVNLT----EPGNDLISMLAHGEATRDM 256
CYP153A26       TE-ESGII-ESEEQRRAELLECAEYFMGLWNERVNAR----EPGNDLISMLAHGESTRNM 242
CYP153A27       GT-AFGDE-ETEKARRNELRDCAAYFTELWNQRVNAT----EPGNDLITMLAQGEATKNM 243
CYP153A28P      EE-AFKTP-EGEAAREAELLECAAYFTELWNQRVNAT----EPGGDLITMLAQGESTKNM 243
CYP153A6        LP-GGGII-DSEEQRMAELMECATYFTELWNQRVNA-----EPKNDLISMMAHSESTRHM 241
CYP153A7        AP-GGGVV-ESWDQRKTELLECAAYFQVLWNERVNKD-----PGNDLISMLAHSPATRNM 240
CYP153A31       EP-GSGIV-DSWEQRTSEIMECAECFQGLWNERMEK------PGMDLVSMMAHSPATHDM 247
CYP153A4        LP-KSGIV-ASAEERRREMDECYAYMSKLWNERVNS-----APRNDLLSLMAHNDATRFM 273
CYP153A5        LP-KSGVV-DSEQQRRDELNECAAYFARMWNDRVNS-----EPRNDLLSMMAHHDATRTM 254
CYP153A3        IPGPDGLV-ATEDERQAELTECAGYFARLWKERIEQ-----PPKSDLLSMMAHGAATRDM 194
CYP153A8        AP-ETGIV-ASYEARRAELIECAMYFKGLWEQRINA-----EPKNDLISMMAHSPATRDM 243
CYP153A11       IP-GSGIV-ESNEQRRQELIECAMYFKGLWDQRIDR-----SEGSDLITMMANSPATREM 243
CYP153A29       TP-ETGVV-SSFEQRREELLECAHYFKGLWDQRVNE-----PPKPDLISMMVHSPATRDM 240
CYP153A9        TPKAGYAI-DSWDKRSTILSECLDYFTRLWNERINA-----EPRLDLISLMAHSPVTRHM 237
CYP153A10       DLEVGGEI-NTEEKRYVKLKECASYFGVLFKERMNS-----EPKDDLISMLAHSEYTKNM 335
CYP153E1        EP-GHGLV-KSWEQKAEETVKCYQVFEALWEKRRNG-----PPSYDLISMLAHHPDTRDM 251
CYP153D2        I-ESFNTL-EERQQRLATAFEMGAAFKELWDHKAK-----NPGKHDLISIMLQSDAMNHM 239
CYP153D3        V-ELIRSP-EGLVERNTKLLQMGMAFAALWQEKAQ-----NPGK-DLISVMLKSDAMNHM 239
CYP153D1        V-ELTLAR-ELADTRFGFLGEMAHYFQRLWGARMQ-----APPSGDLISMMIHSEAMNHM 268
CYP153C1        VSEDSLND-AYRAEFVQQMGQMLMRFDRELEARRA-----LPPSDDLLSRMVHSDAMGHL 233
                                      :      :           *::: :        :

CYP153A19       P--PEEFMGNLALLIVGGN---------------------------------------- 259
CYP153A20       P--PEEFLGNLSLLIVGGNDTTRNSMTGGVFGFSLFPEQWDKMVAD--PTLIDNAVAEII 298
CYP153A13       INRPLEFIGNLALLIVGGNDTTRNSMSGGVLALNQFPEQFEKLKAN--PKLIPNMVSEII 348
CYP153A13a      INRPLEFIGNLALLIVGGNDTTRNSMSGGVLALNQFPEQFEKLKAN--PKLIPNMVSEII 348
CYP153A12       INRPLEFIGNLALLIVGGNDTTRNSMSGGVLAFNQFPEQFEKLKAN--PKLIPNMVSEII 348
CYP153A14       IDRPMEFLGNLVLLIVGGNDTTRNSMSGGVLALNEFPDQFEKLKAN--PELIPNMVSEII 322
CYP153A16       IDRPMEFLGNLVLLIVGGNDTTRNSMSGGVLALNEFPDQFEKLKAN--PELIPNMVSEII 339
CYP153A1        IYRPMEFMGNLVLLIVGGNDTTRNSMTGGVYALNLFPNEFVKLKNN--PSLIPNMVSEII 375
CYP153A18       SEDPLLMLGNIILLIVGGNDTTRNSISGGVVALNQYPEEYQKLRDT--PALIPNMVAETV 303
CYP153A25       NEDMELFLGNMLLLIVGGNDTTRNSISGGVMALNQYPDEYQKLRDN--PALIPNMVSEII 296
CYP153A21       D--PMEYLGNIILLIVGGNDTTRNSMTASVYALNKFAGEYDKLLAK--PDLIPNLSSEII 300
CYP153A22       D--PMEYLGNIILLIVGGNDTTRNSMTGSVYALNKFAGEYDKLIAD--PSLIPNLSSEII 298
CYP153A23       D--PMEYLGNIILLIVGGNDTTRNSMTASVYGLNKFPGEYDKLIAD--PSLIPNLSSEII 300
CYP153A24       D--PMEYLGNIILLIVGGNDTTRNSMTGSVYALNKFPTEYDKLIAD--PGLIPNLSSEII 300
CYP153A15       T--PMELLGNVILLIVGGNDTTRNSMTASVFALNKFPKEYEKLKAD--PSIIPNMVSETI 322
CYP153A17       D--PMNLLGNLVLLIVGGNDTTRNSMSGGVLALHENPAEFAKLKAD--PSIIPNMVSEII 301
CYP153A30       P--PNEYLGNMLLLIVGGNDTTRNSITGGVLALNQYPDEYAKLIAN--PDIIPNMVSEII 317
CYP153A2        P--PMEYLGNVILLIVGGNDTTRNSLTGGLYALSKNPQEEAKLRAD--PGLIPNMVSEII 312
CYP153A26       D--KMEYLGNLILLIVGGNDTTRNSISGGLYALNKFPDQYKKLLAN--PGIIPNMVPEII 298
CYP153A27       G--PMEYLGNVLLLIVGGNDTTRNSITGGLLALNENPVQYKKLRDN--PSLVESMVPEII 299
CYP153A28P      S--PAEYLGNVILLIVGGNDTTRNSLTGGLLALHENPDQYRKLREN--PALVETMIPEII 299
CYP153A6        A--PEEYLGNIVLLIVGGNDTTRNSMTGGVLALNEFPDEYRKLSAN--PALISSMVSEII 297
CYP153A7        T--PEEYLGNVLLLIVGGNDTTRNSMTGGVLALHKNPDQFAKLKAN--PALVETMVPEII 296
CYP153A31       T--PQNYLGNVLLLIVGGNDTTRNSMTGGVLALHQNPAEFAKLKAN--HGLIDSMVSETI 303
CYP153A4        D--PDNLMGNIILLIVGGNDTTRNTMTGSVLALNENPEQYDKLRAN--PALIDSMVPEVI 329
CYP153A5        D--RDNLIGNILLLIVGGNDTTRNTMSGSVLALNENPHEFEKLRAN--PKLIDTLVPEVI 310
CYP153A3        D--AKNFLGNLVLLIVGGNDTTRNTMSGSIYALSQHPEQYRKLREN--PALLDSFVPEVI 250
CYP153A8        P--FLEFLGNLLLLIVGGNDTTRNSISGGVLALNQNPDAYLKLNND--PGLITSMVPEII 299
CYP153A11       P--FLEFLGNLLLLIVGGNDTTRNSISGGVIALNQNPDQYEKLRQH--PSLIGSMVPEII 299
CYP153A29       P--YLEFLGNLILLIVGGNDTTRNSISGGVLALNQNPAEYRKLMAD--PDLIPKMIPEII 296
CYP153A9        E--PTEFLGNLILLIVGGNDTTRNSITGGLLFMSQYPSELRKLTDN--PKLISSAVSEII 293
CYP153A10       P--EQEFLGMIVLLMVGGNDTTRNSISGGLVALNQFPEQYAKLHND--PGLIPKLVPEIL 391
CYP153E1        T--LEQFRGTIVLLIIGGNDTTRNTISSSLYLLDKYPEEFAKLKAN--PKLVMPMISETL 307
```

```
CYP153D2        S--HEEFMGNLILLIVGGNDTTRNSMSAYAYGLHCFPEERAKLEANHDPDLAVNAMHEII 297
CYP153D3        S--NEEFIGNLVLLIVGGNDTTRNSMSSYAYGLAQFPEERAKLEAN--PALIPNAVQELI 295
CYP153D1        S--PQEFMGNLVLLIVGGNDTTRNTMSGIVHALDKFPDQRELLERD--ASLIPNAVQECI 324
CYP153C1        T--PPERIANIALLIVGGNDTTRNSMSGLIEALHRYPAELDKLRAD--PALSANAAQEII 289
                        . : **::***

CYP153A19       ------------------GGKQIRKGDKVVMWYASGNRDTSIFDDPDKIIIDRKNARRH 300
CYP153A20       RWQTPLAHMRRTALEDAILGGKQIRKGDKVVMWYASGNRDTSIFDDPDKIIIDRKNARRH 358
CYP153A13       RWQTPLAYMRRVAKQDVELNGETIKKGDRVLMWYASGNQDERKFENPEQFIIDRKDTRNH 408
CYP153A13a      RWQTPLAYMRRVAKQDVELNGQTIKKGDRVLMWYASGNQDERKFENPEQFIIDRKDTRNH 408
CYP153A12       RWQTPLPHMRRVATQDVELNGQTIKKGDRVLMWYASGNQDERKFENPEQFIIDRKEARNH 408
CYP153A14       RWQTPLAHMRRIAKADTVLNGQFIRKGDKVLMWYASGNRDERVFDRPDDLIIDRANARNH 382
CYP153A16       RWQTPLAHMRRIAKADTVLNGQFIRKGDKVLMWYASGNRDERVFDRPDDLIIDRANARNH 399
CYP153A1        RWQTPLAYMRRIAKQDVELNGQTIKKGDKVVMWYVSGNRDERVIERPDELIIDRKGARNH 435
CYP153A18       RWQTPVIHMRRTALEDVELGGKTIRKGDKVVMWYLSGNRDEAVFPDADRLIIDRPNARQH 363
CYP153A25       RWQTPVIHMRRTALEDYELGGQHIKKGEKVIMWYLSGNRDESVFEDPDRLIIDRPNARSH 356
CYP153A21       RWQTPLAHMRRTALEDIVLNGAHIKKGDKVAMWYVSGNRDESVFEDADKVIIDRPNARRQ 360
CYP153A22       RWQTPLAHMRRTALEDIELNGQMIKKGDKVAMWYVSGNRDTAVFENADDVIIDRPNARRQ 358
CYP153A23       RWQTPLAHMRRTALEDIELNGTMIKKGDKVAMWYVSGNRDADVFENADDIIIDRPNARRQ 360
CYP153A24       RWQTPLAHMRRTALEDFELGGKMIKKGDKVAMWYVSGNRDKTVFENADDVIIDRANARRQ 360
CYP153A15       RWQTPLAYMRRTALEDVEMHGKTIKKGDQVAMWYVSANRDERFWDKPNDFIADRPEARRH 382
CYP153A17       RWQTPLAYMRRTANEDLEFRGKQIKQGDRIMMWYVSGNRDERAIERPNEFLIDRENARRH 361
CYP153A30       RWQSPVAHMCRTATEDTELGGKKIRKWDKVAMWYVSGNRDDSKIDRANEFLIDREGARHH 377
CYP153A2        RWQTPLAHMRRTALEDYELAGQTIKKGDKVVMWYVSGNRDDTVIENADQFIVDRPNARRH 372
CYP153A26       RWQTPLAYMRRTALQDAEVGGQTIRKGEKVAMWYVSGNRDESVIQNPNELVIDRERPRQH 358
CYP153A27       RWQTPLSHMRRTALQDTELGGKQIKKGDKVVMWYVSGNRDEEAIENANSFIIDRKHPRQH 359
CYP153A28P      RWQTPLTHMRRTALQDTELAGKRIKKGDRVVMWYVSGNRDEEAIDEPNRFIIDRARPRQH 359
CYP153A6        RWQTPLSHMRRTALEDIEFGGKHIRQGDKVVMWYVSGNRDPEAIDNPDTFIIDRAKPRQH 357
CYP153A7        RWQTPLAHMRRTAIADSELGGKTIRKGDKVVMWYYSGNRDDEVIDRPEEFIIDRPRPRQH 356
CYP153A31       RWQTPLAHMRRTALADAEVGGKTIRKGDKVVMWYVSGNRDKDVIIQPDDFIIDRERPRQH 363
CYP153A4        RWQTPLAHMRRTALQDTEIGGKQIKKGDRVVMWYVSGNRDEEAIDRPNEFIIDRPRPRTH 389
CYP153A5        RWQTPLAHMRRTALQDAELGGKTIRKGDRVVMWYVSGNRDDEVIERPEEFIIDRARARIH 370
CYP153A3        RWQTPLAHMRRTALSDFEFRGKQIKKGDKVVMWYVSGNRDEEAIEKPYDFIIDRARPRTH 310
CYP153A8        RWQTPLTHMRRTALQDWEIGGKKIRKGDKVVMWYLSGNRDETVIDRADEFIIDRKNPRHH 359
CYP153A11       RWQTPLTHMRRTALADSEIGGKRIRKGDKVVMWYLSGNRDETVIERPEEFIIDRKNPRQH 359
CYP153A29       RWQTPLTHMRRTALMDAEIGGKKIRKGDKVVMWYLSGNRDDEVIDRPNEFIINRPNSRHH 356
CYP153A9        RYQTPIAHMRRTAAIDSIVGGKPIRTGDKVVMWYISGNRDEEVIENANSFVIDRKNVRQH 353
CYP153A10       RWVTPVTHMRRTATRDIEFRGKQIRQGDKVVVWYASGNRDSDVIKDPYQFIIDRANPRLH 451
CYP153E1        RFHPPVNFMSRVATRDVEIRGKNIKEGDRVVMWYTSGNRDASAIEDPDTFSIDRERARRH 367
CYP153D2        RWQTPLAHMRRTALEDTELFGHQIRARDKIALWYASANRDESIFPDGDRIIVDRENARRH 357
CYP153D3        RWQTPLAHMRRTVEEDTEIDGQLMKKGDKVVLWYLSANRDETVFKDADRIIVGRENARRH 355
CYP153D1        RYVTPLAHMRRTATADTELFGNQIKAGEKVILWYISANRDETVFENPDKLMVDRPNARRH 384
CYP153C1        RWQSPVTHMRRTLTRDAELGGQRLAEGDKIVMWYISGNRDENVFPDAERFDVTRENARRH 349
                                * :   ::: :** *.*:*         .   *   * :

CYP153A19       LSFGFGIHRCMGNRIGELQLRILWEEILKRFSR---VEVTGEPVLTHSNFVKG------Y 351
CYP153A20       LSFGFGIHRCMGNRIGELQLRILWEEVLKRFSR---IEVTGEPELTNSNFVKG------Y 409
CYP153A13       VSFGYGVHRCMGNRLAELQLRILWEELLPRFEN---IEVIGEPERVQSNFVRG------Y 459
CYP153A13a      VSFGYGVHRCMGNRLAELQLRILWEELLPRFEN---IEVIGEPERVQSNFVRG------Y 459
CYP153A12       VAFGYGVHRCMGNRLAELQLRILWEEILPRFEK---LEVIGEPERVQSNFVRG------Y 459
CYP153A14       ISFGFGVHRCMGNRLAEMQLRILWEELLPRFEN---IEVVGEPEYVQSNFVRG------I 433
CYP153A16       ISFGFGVHRCMGNRLAEMQLRILWEELLPRFEN---IEVVGEPEYVQSNFVRG------I 450
CYP153A1        LSFGFGVHRCMGNRLAEMQLRILWEELLQRFEN---IEVLGEPEIVQSNFVRG------Y 486
CYP153A18       VSFGFGVHRCMGNRLAEMQLRVLWEEIMKRFHT---VEVVGEVERLSNNFIRG------I 414
CYP153A25       VAFGFGVHRCMGNRMAELQLRVLWEEIMERFHT---IEVVGDITRLPNNFIRG------I 407
CYP153A21       MSFGYGIHRCVGNRLGELQIKILWEEILKRFPK---IEVMEEPTRTKSVFVKG------Y 411
CYP153A22       MSFGYGIHRCVGNRLGELQIKILWEELLKRFPK---IEVMEEPTRTRSPFVKG------Y 409
CYP153A23       MSFGYGIHRCVGNRLGELQIKILWEEILKRFPK---IELMEEPTRTPGCFVKG------Y 411
CYP153A24       MSFGYGIHRCVGNRLGELQIMILWEEILKRFPK---IELMAEPTRSPGCFVKG------Y 411
CYP153A15       ISFGFGIHRCVGNRLAELQLRILWEEIMERFEH---IEVLAEPSLNQNAFVKG------Y 433
CYP153A17       LSFGFGIHRCMGNRVGEMQVRILWEEILKRFDR---VEVVGKPARTLSNFVMG------F 412
CYP153A30       LSFGFGIHRCIGNRVGEMQLRILWEEIMKRFKK---VEVVGDPKYLRSNFIRG------I 428
CYP153A2        LSFGFGIHRCVGNRLAEMQLKIVWEEILKRFPK---IEVLEEPKRVYSTFVKG------Y 423
CYP153A26       LSFGFGIHRCVGNRLAEMQLRIIWEEILKRWDQP--IRVLSEPQRVHSSFVKG------Y 410
CYP153A27       LSFGFGIHRCVGNRLAEMQLRVVWEEILKRWPDKP-IEVVGEPTRVFSNLIKG------Y 412
CYP153A28P      LSFGFGIHRCVGNRLAEMQLRIVWEEILKRWPDKP-IEVVDEPKRVFSNFIKG------Y 412
CYP153A6        LSFGFGIHRCVGNRLAELQLNILWEEILKRWPDPLQIQVLQEPTRVLSPFVKG------Y 411
CYP153A7        LSFGFGIHRCVGNRLAEMQLRILWEEILTRFSR---IEVMAEPERVRSNFVRG------Y 407
```

```
CYP153A31       LSFGFGVHRCVGNRLAEMQLKILWEEILKRFSR---IEVTSEPVRTRSNFVRG------Y 414
CYP153A4        LSFGFGIHRCVGMRLAELQLKIVWEEMLKRFDR---IEVVGEPKRIYSSFIKG------Y 440
CYP153A5        LSFGFGIHRCVGMRLAELQLRIVWEEMLKRFER---IEVVGEPKRVYSSFVKG------Y 421
CYP153A3        LSFGFGIHRCVGLRLAELQLKIIWEEILKRFDH---IDVVGEPKRVYSSFVKG------L 361
CYP153A8        LSFGYGIHRCMGNRLAELQLRIIWEEIHKRFAK---IEVTGEPERLFSNLVRG------I 410
CYP153A11       LSFGYGIHRCMGNRLAELQ------------------------------------- 378
CYP153A29       LSFGFGVHRCMGNRVAELQLRIIWEEILKRFSK---VEVVGAPERTLSNFIRG------F 407
CYP153A9        LSFGFGIHRCLGRHLAELQLRVLWEEILDGGLK---IKVVGEPERIASNFVHG------Y 404
CYP153A10       LSFGFGIHRCLGNRLAELQLRVLWEEILKRQML---IEMMGEPVRKYANNITG------V 502
CYP153E1        LSFGVGVHACIGSRVAEMQLTVIWEEILKRFSR---IEVLEEPERSYSNFLHG------F 418
CYP153D2        LAFGYGIHRCVGARVAELQLTTLISEMQKRRLR---VNVLAEPERVNASFVHVSPHAGRT 414
CYP153D3        LSFGYGIHRCVGARVAELQLVTLLEEMAKRRLR---ANVLAEPVRVPACFVHG------Y 406
CYP153D1        LSFGHGIHRCVGARLAELQLRILLEEMHERRMR---VRVAGEVERVRANFVHG------F 435
CYP153C1        IGFGHGIHRCVGARLAEVQIAAVIEEIATRRLR---ITPQGAPTRLASPFLHG------F 400
                :.** *:* *:* ::.*:*

CYP153A19       ASLPVKLHAL----- 361
CYP153A20       TSLPVKLHAL----- 419
CYP153A13       SKMMVKLTAKK---- 470
CYP153A13a      SKMMVKLTAKK---- 470
CYP153A12       SKMVVKLTAKK---- 470
CYP153A14       SKLMVRLTPKGGA-- 446
CYP153A16       SKLMVRLTPKGGA-- 463
CYP153A1        AKMMVKLTAKA---- 497
CYP153A18       ASVPVRLHPL----- 424
CYP153A25       KEVPVRVHAH----- 417
CYP153A21       TYMPVRIPA------ 420
CYP153A22       TYMPVRIPA------ 418
CYP153A23       TYMPVRIPA------ 420
CYP153A24       TYMPVRIPE------ 420
CYP153A15       NWMPVVLHPK----- 443
CYP153A17       TELPVRLHPKK---- 423
CYP153A30       TELPVIVRE------ 437
CYP153A2        ERMMVRIPERI---- 434
CYP153A26       EKMMVELPKRKH--- 422
CYP153A27       SSMPVRIPG------ 421
CYP153A28P      EALPVRIPG------ 421
CYP153A6        ESLPVRINA------ 420
CYP153A7        AKMMVRVHA------ 416
CYP153A31       ASMPVRLHA------ 423
CYP153A4        ESLPVRIPG------ 449
CYP153A5        ESLPVRVS------- 429
CYP153A3        ETLPVKIAA------ 370
CYP153A8        TKLPVRLHAR----- 420
CYP153A11       ---------------
CYP153A29       THLPVKLYVH----- 417
CYP153A9        SALPVRIEA------ 413
CYP153A10       MALPVRIAA------ 511
CYP153E1        ENLKVII-------- 425
CYP153D2        RALLTAVTAGPISAR 429
CYP153D3        KSLQVELSHY----- 416
CYP153D1        RKLEVELEKR----- 445
CYP153C1        TAMPVVMSRD----- 410
```

Enzymatic C–H Activation

DOI: 10.1002/anie.201005597

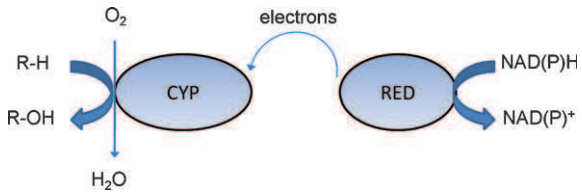
A Regioselective Biocatalyst for Alkane Activation under Mild Conditions**

*Mélanie Bordeaux, Anne Galarneau, François Fajula, and Jullien Drone**

The activation of alkanes to provide compounds of high value is an important scientific challenge.[1] Increasing environmental concerns call for the design of alternative and efficient oxidation routes under mild conditions. Such benign methods should enable the problems associated with the use of toxic acids, solvents, and metals to be circumvented, and should enable reactions to be carried out in an aqueous medium at low temperature with a clean oxidant, such as oxygen.[2] The use of biological catalysts instead of chemical catalysts can be advantageous, because difficult reactions can often be performed under mild conditions. Indeed, alkanes are particularly inert molecules, and their selective transformation remains an important problem.[3]

Cytochromes P450 (CYP) form a superfamily of enzymes widely distributed from prokaryotes to superior eukaryotes.[4] They are known to catalyze the monooxygenation of a large variety of hydrophobic chemical compounds, such as alkanes, xenobiotics, steroids, and prostaglandins.[4c,5] An important element for P450 catalysis is the nicotinamide adenine dinucleotide cofactor, which, in its reduced form (NADH or NADPH), provides the electrons necessary for the catalytic cycle. As the electrons cannot be transferred directly to the heme prosthetic group, redox protein partner(s) (P450 reductase) should be present to shuttle the reducing equivalents from NAD(P)H to the hydroxylase domain[6] (Scheme 1). Slow or uncoupled electron transfer currently limits the catalytic efficiency of P450s.

It is possible to overcome this limitation by artificially fusing a P450 hydroxylase to its natural reductase partner(s)[7] (homologous fusion). Interestingly, functional enzymes can also be obtained by fusion with a reductase from another organism[7] (heterologous fusion). This strategy is of great interest because many P450s catalyze interesting reactions but have no identified reductase. The resulting biosynthetic



Scheme 1. Oxidation of a substrate (RH) under the catalysis of a cytochrome P450 hydroxylase (CYP) coupled to redox protein partner(s) (RED). One molecule of the cofactor (NADPH) and one molecule of molecular oxygen are consumed to yield one molecule of the product (ROH).

single-component cytochromes P450 are self-sufficient: the different partners involved in the reaction remain together, and the coupling efficiency and reaction rate are significantly increased. The cytochrome CYP102A1 from *Bacillus megaterium* (P450 BM3) was the first natural self-sufficient P450 discovered[8,9] and remains one of the most efficient cytochromes to date.

Alkane hydroxylases of the CYP153 family (AH153) are monomeric and soluble proteins that convert medium-chain alkanes (C_5 to C_{12}) into their corresponding alcohols.[10–12] This process is thought to take place in the first step of alkane metabolism, whereby the oxidation of the terminal and/or subterminal carbon atoms leads to 1- and/or 2-alcohols. Such a reaction at room temperature and atmospheric pressure is of great interest to synthetic organic chemists, because the activation of inert C–H bonds remains difficult by classical chemical methods.[2] Pioneering studies on AH153 by van Beilen and co-workers have produced a significant amount of in vitro data for several members of this family.[12] Bioconversions were also conducted by van Beilen et al., who used *Pseudomonas putida* whole cells expressing CYP153A6 from *Mycobacterium* sp. HXN-1500 to produce perillyl alcohol from limonene.[13] In another study, Fujii et al. used *Escherichia coli* to successfully express CYP153A1 from *Acinetobacter* sp. EB104. They produced primary alcohols and α,γ-alkanediols by bioconversion. Although CYP153A1 was correctly folded, functional in vivo, and present in the soluble fraction of cell extracts, its purification and in vitro characterization were not reported.[14] Kubota et al. reported the cloning of large genes encoding several CYP153 hydroxylases fused to an FMN/Fe_2S_2-containing reductase (RhFred, earlier found in the self-sufficient P450RhF from *Rhodococcus* sp. NCIMB 9784[15]) in *Escherichia coli* (FMN = flavin mononucleotide). For experiments with CYP153A13a from *Alcanivorax borkumensis* SK2, the P450 hydroxylase domain was correctly folded, and its in vivo hydroxylation activity enabled the production of primary alcohols by resting cells.[16] How-

[*] M. Bordeaux, Dr. A. Galarneau, Dr. F. Fajula, Dr. J. Drone
Institut Charles Gerhardt Montpellier
UMR 5253 CNRS/ENSCM/UM2/UM1
8, rue de l'Ecole Normale, 34296 Montpellier Cedex 5 (France)
Fax: (+33) 4-6716-3470
E-mail: jullien.drone@enscm.fr

[**] We are grateful to Philippe Gonzales for GC/MS instrumentation, to Irina Randrianjatovo, Emeline Vernhes, and Carl Ghaleb for their excellent technical help, and to Dr. N. Ramsahye for proofreading this article. This research was supported by the French Ministry of Education (M.B.), the CNRS, the Graduate School of Chemistry of Montpellier (ENSCM), and the University of Montpellier 2. We thank Dr. D. Sherman (University of Michigan (USA)) for providing us with a genetic sample of RhFred.

Supporting information for this article is available on the WWW under http://dx.doi.org/10.1002/anie.201005597.

© 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ever, no purification or in vitro analysis was reported for this enzyme, and, as pointed out by Li et al., the self-sufficiency of the system has not yet been determined unambiguously.[17]

The clear indication by all studies reported so far of a lack of a reliable AH153-expression system in *E. coli* prompted us to develop such a system. In this study, we focused on CYP153A13a artificially fused to RhFred and to a histidine affinity tag. We succeeded in the cloning, functional expression in *E. coli*, purification, and complete in vitro characterization (kinetics, substrate binding) of this enzyme and demonstrated its self-sufficiency. We were also able to use this enzyme in whole-cell catalysis with linear and cyclic alkanes.

After cloning, expression in *E. coli*, and purification (see the Supporting Information for experimental details), we recorded the absolute UV/Vis spectrum of the purified enzyme, A13-red, in the absence of a substrate at room temperature (Figure 1). A maximal absorption peak was

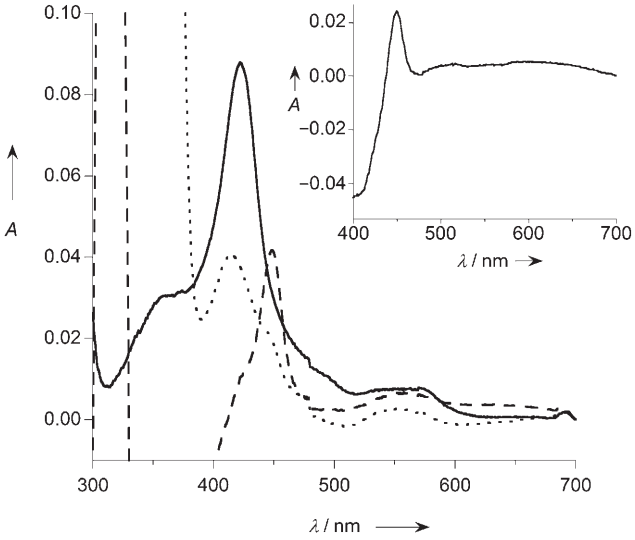


Figure 1. UV/Vis spectra of A13-red. Solid line: oxidized (resting) enzyme; dotted line: dithionite-reduced enzyme; dashed line: dithionite-reduced CO complex. The insert shows the difference spectrum generated by subtraction of the spectra of the dithionite-reduced enzyme and the dithionite-reduced CO complex.

observed at 420 nm. The spectrum showed that 90% of the iron atoms of heme groups were in a low-spin state; thus, the electronic properties of the iron center were not perturbed by the fused reductase. The carbon monoxide difference spectra of the dithionite-reduced protein exhibited the characteristic intense Soret band at 450 nm (Figure 1). This result indicated that the hydroxylase domain of the purified enzyme was correctly folded and functional. Since the hydroxylase and the reductase domains are fused, we assumed that the whole protein was correctly folded. Indeed, the denaturation of part of a protein generally induces denaturation of the entire polypeptide.[18]

The interaction of ferric CYP with a number of substrates involves a concomitant shift in the equilibrium between low-spin and high-spin configurations. Titration experiments were

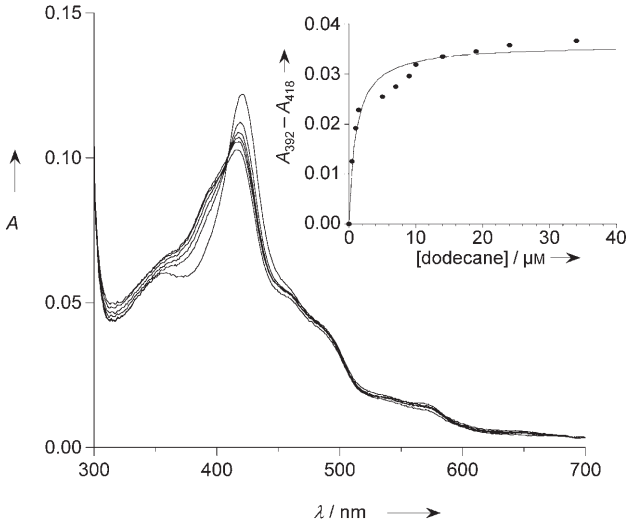


Figure 2. Titration curve of A13-red with dodecane.

performed with the purified enzyme and four different alkanes at room temperature (Figure 2; see also the Supporting Information). Similarly to CYP153A6,[11] but to a lower extent, the chimeric fusion protein strongly interacted with the alkanes (Table 1). The maximal binding affinity was observed with *n*-dodecane ($K_D = 1$ μM), whereas *n*-decane (16 μM) and *n*-octane (29 μM) were found to bind less tightly. Interestingly, cyclohexane induced a significant conversion to the high-spin state, which enabled the dissociation constant to be determined (5 μM). Hence, we showed that hydrophobic molecules, such as linear and cyclic alkanes, have a high affinity for the active site of A13-red, and that its volume is sufficient to enable the docking of cyclic substrates.

We next tested the ability of A13-red to catalyze alkane hydroxylation in vitro, with cyclohexane, octane, decane, and dodecane as substrates. Incubation of the purified fusion protein and the substrate in the presence of NADPH as an electron donor yielded significant amounts of the corresponding alcohols. This result demonstrated unambiguously the self-sufficiency of A13-red. The only product detectable by

Table 1: Dissociation constants, catalytic parameters, coupling efficiencies of A13-red, and bioconversion activities.

Substrate	K_D [μM]	TOF[a] [min^{-1}]	Coupling[b] [%]	TTN[c]	In vivo activity[d]
n-octane	29	57	54	410	60.9
n-decane	16	30	28	235	13.5
n-dodecane	1	0.1	<1	1	2.1
cyclohexane	5	3	25	20	12.7

[a] The turnover frequency was measured by GC/MS analysis over 10 min as (μmol 1-alcohol)/(μmol P450)/min. All reactions were carried out with P450 (150 nM), NADPH (500 μM), and the alkane (4 mM) in potassium phosphate buffer. [b] The coupling efficiency is defined as the ratio between the product-formation rate and the NADPH-oxidation rate. [c] The total turnover number was determined by GC/MS analysis after completion of the reaction as (μmol 1-alcohol)/(μmol P450). [d] In vivo activity is defined as the quantity of 1-alcohol produced in milligrams per gram of cell dry weight (cdw). Values in this table are the mean of at least three independent experiments, and errors were estimated to be 5–10%.

 © 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers!

GC/MS after 60 minutes in the reaction with octane at room temperature was 1-octanol. We did not detect any secondary alcohols (such as 2-octanol, 3-octanol, or *i*-octanol) or any overoxidation compounds (such as 1,8-octanediol, octanal, 2-octanone, or octanoic acid). Similarly, the oxidation of decane and dodecane led only to 1-decanol and 1-dodecanol, respectively. These results clearly demonstrate the very high chemo- and regioselectivity of this biocatalyst. High regioselectivity for the terminal hydroxylation of alkanes was also reported for rabbit CYP4B1,[19] for CYP52A3 from *Candida maltosa*,[20] and for AlkB from *Pseudomonas oleovorans*.[21] However, these three enzymes are membrane-bound and require external proteins to be active. Cytochrome CYP153A6 is a very regioselective alkane hydroxylase (>95% ω hydroxylation) but is not a self-sufficient system.[11] Molecular engineering of P450 BM3 has led to artificial alkane hydroxylases; however, even after extensive efforts, hydroxylation occurred mainly at subterminal positions.[22] Alignment of the three-dimensional model of CYP153A6 bound to octane[11,23] with the A13a model (Figure 3a) clearly showed that the 11 residues implicated in the binding of the substrate were 100% conserved and all pointing in the direction of the substrate. This model of A13a provides a good basis to rationalize the affinity of the enzyme for linear alkanes, since it shows that the hydrophobic nature and the volume of these two active sites were highly comparable. Modeling results also showed that the terminal methyl group of linear alkane substrates is very close to (3.2 Å) and ideally positioned above the iron atom of the heme group (Figure 3b). In BM3, it is clear that the ω end of substrates bind in a hydrophobic pocket at one side of the active site distant from the iron center.[24] This arrangement is a key element for explaining the different regioselectivities.

The oxidation of cyclohexane to cyclohexanol with A13-red was also detected during our in vitro assays. This reaction is an important chemical process for the modern chemical industry, because cyclohexanol is a starting molecule for the production of adipic acid and caprolactam, which are intermediates of nylon-6 and nylon-6,6 polymers.[25] This oxidation was more than 99% selective for cyclohexanol (no cyclohexanone or polyol was found).

The purified protein showed a good turnover frequency with octane (TOF = 57 min^{-1}, Table 1). We measured a lower TOF with decane (30 min^{-1}) and cyclohexane (3 min^{-1}). However, almost no activity was observed for dodecane (0.1 min^{-1}) in spite of its high affinity for the enzyme. Therefore, A13-red was preferentially active on octane, although octane did not induce the highest spin change in titration experiments. As observed for wild-type (WT) A6,[11] no direct link between the TOF and K_D values can be made for A13-red. It appears that A13-red is more efficient than the alkane ω-hydroxylases WT A13a (TOF < 0.1 min^{-1} for octane and 8 min^{-1} for decane)[11] and CYP4B1 (two- and threefold less active on octane and decane, respectively).[19] The turnover frequencies were almost the same as those observed for WT A6.[11] Only AlkB surpasses A13-red in terms of TOF (200 min^{-1} with octane[21]); however, as this enzyme was reported to be rather unstable,[27] it can be assumed that the total turnover number (TTN) of AlkB is relatively low.

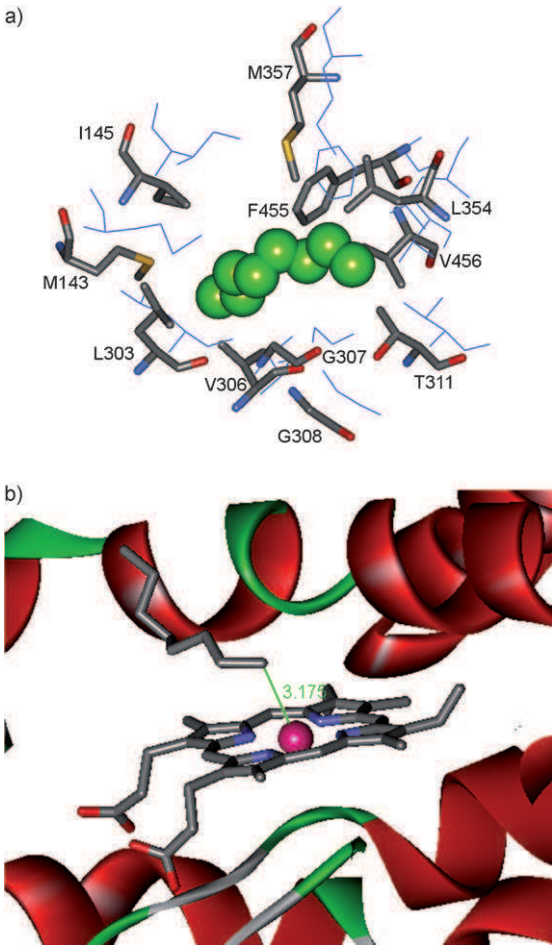


Figure 3. a) Three-dimensional alignment of the CYP153A6 (blue lines) and A13a (gray/colored sticks) active sites docked with octane (CPK model). Only residues in the A13a active site are numbered. b) Zoom-in view of the interaction between the terminal methyl group of octane and the reactive iron center.

Many cytochromes P450 show a significant degree of uncoupling:[28] electrons are consumed from NADPH but do not all participate in substrate oxidation. Coupling efficiency was monitored on the basis of both the NADPH-oxidation and product-formation rates. We observed that, for linear alkanes, there was a linear relationship between coupling efficiency and the TOF value. The hydroxylation of octane was well-coupled to NADPH consumption (54%), whereas with decane it decreased to 28%, and it was less than 1% with dodecane. Different coupling efficiencies for alkane hydroxylases have been described. For example, the double mutant of CYP102A3 from *Bacillus subtilis* (BS1) shows 5% coupling with modest regioselectivity (48% 1-octanol),[29] and the mutant 1-12G of BM3 shows 37% coupling with good regioselectivity (82% 2-octanol).[30] However, no coupling data were reported for WT A6, A13a, or AlkB. Hence, we report for the first time an efficiently coupled alkane ω-hydroxylase.

During uncoupling, reactive oxygen species, such as H_2O_2, are generated. They are responsible for cytochrome P450 inactivation, primarily through degradation of the heme

© 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

prosthetic group.[31] For octane hydroxylation, the total turnover number reaches a value of 410, whereas it is lower for decane (235). This lower value might be due to the larger amounts of H_2O_2 produced and is a logical result given the limited tolerance of A13-red for H_2O_2 (see the Supporting Information) and the fact that the TTN reflects the stability of the catalyst during the reaction.

The use of growing or resting whole cells as biocatalysts is an attractive approach when an expensive cofactor, such as NADPH, is required.[32] Resting cells are recovered from an expression culture broth, and bioconversion is performed in a simple aqueous buffered solution containing the substrate (see the Supporting Information). Bioconversions with the same four alkanes were conducted, and the expected 1-alcohols were produced. A maximal productivity of 61 mg 1-octanol per gram of cell dry weight (cdw) was reached for octane, whereas it was lower for decane and dodecane (Table 1). Thus, for linear alkanes, the amount of 1-alcohol produced in vivo correlated with the in vitro TOF value. The productivity of bioconversion with cyclohexane was relatively high in view of the poor in vitro TOF value. One may postulate that cyclohexane enters the cells very rapidly but is also more toxic than decane.[33] Consequently, productivities become comparable despite large differences in vitro. Finally, bioconversion with octane produced 2-octanol ($< 5\,\%$), the reaction stopped after 5 hours, and the 1-octanol concentration diminished after this time.[34] Octanoic acid was detected after 24 hours. This product might form by the overoxidation of 1-octanol by enzymes in *E. coli*.[35,36]

In conclusion, our work provides a proof of concept and evidence that CYP153A13a fused to RhFred is a reliable alternative to existing biocatalysts. This self-sufficient, soluble, and efficient enzyme is a step forward towards environmentally benign alkane-activation catalysts that operate in an aqueous medium at low temperature and with oxygen. This biocatalyst shows regio- and chemoselectivities that are much higher than those of any existing enzymes and thus adds to the toolbox available to synthetic organic chemists for alkane oxidation. It may be an excellent starting point for X-ray crystallography studies and directed-evolution experiments devoted to the oxidation of shorter-chain alkanes.

Received: September 7, 2010
Revised: December 20, 2010
Published online: ■■ ■■, ■■■■

Keywords: alkane activation · cytochromes · oxidative biocatalysis · protein engineering · sustainable chemistry

[1] The selective functionalization of aliphatic hydrocarbons is considered a "holy grail" in chemistry; see: a) B. A. Arndtsen, R. G. Bergman, *Science* **1995**, *270*, 1970 – 1973; b) S. E. Bromberg, W. Yang, M. C. Asplund, T. Lian, B. K. McNamara, K. T. Kotz, J. S. Yeston, M. Wilkens, H. Frei, R. G. Bergman, C. B. Harris, *Science* **1997**, *278*, 260 – 263.

[2] P. T. Anastas, J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, New York, **1998**.

[3] R. Curci, L. D'Accolti, C. Fusco, *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 1 – 9.

[4] For general reviews about cytochromes P450, see: a) D. W. Nebert, F. J. Gonzalez, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 945 – 993; b) K. N. Degtyarenko, A. I. Archakov, *FEBS Lett.* **1993**, *332*, 1 – 8; c) R. Bernhardt, *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 128 – 145.

[5] M. Sono, M. P. Roach, E. D. Coulter, J. H. Dawson, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2841 – 2888.

[6] F. Hannemann, A. Bichet, K. M. Ewen, R. Bernhardt, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2007**, *1770*, 330 – 344.

[7] a) A. W. Munro, H. M. Girvan, K. J. McLean, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2007**, *1770*, 345 – 359; b) P. Hlavica, *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 103 – 121.

[8] a) L. O. Narhi, A. J. Fulco, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 7160 – 7169; b) M. A. Noble, C. S. Miles, S. K. Chapman, D. A. Lysek, A. C. MacKay, G. A. Reid, R. P. Hanzlik, A. W. Munro, *Biochem. J.* **1999**, *339*, 371 – 379; c) for a review about self-sufficient cytochromes P450, see: R. De Mot, A. H. Parret, *Trends Microbiol.* **2002**, *10*, 502 – 508.

[9] L. O. Narhi, A. J. Fulco, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 6683 – 6690.

[10] G. A. Roberts, G. Grogan, A. Greter, S. L. Flitsch, N. J. Turner, *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 3898 – 3908.

[11] E. G. Funhoff, U. Bauer, I. García-Rubio, B. Witholt, J. B. van Beilen, *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 5220 – 5227.

[12] E. G. Funhoff, J. B. Van Beilen, *Biocatal. Biotransform.* **2007**, *25*, 186 – 193.

[13] a) J. B. van Beilen, R. Holtackers, D. Lüscher, U. Bauer, B. Witholt, W. A. Duetz, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 1737 – 1744.

[14] T. Fujii, T. Narikawa, F. Sumisa, A. Arisawa, K. Takeda, J. Kato, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 1379 – 1385.

[15] J. B. van Beilen, E. G. Funhoff, A. van Loon, A. Just, L. Kaysser, M. Bouza, R. Holtackers, M. Rothlisberger, Z. Li, B. Witholt, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 59 – 65.

[16] M. Kubota, M. Nodate, M. Yasumoto-Hirose, T. Uchiyama, O. Kagami, Y. Shizuri, N. Misawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 2421 – 2430.

[17] S. Li, L. M. Podust, D. H. Sherman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12940 – 12941.

[18] D. Esposito, D. K. Chatterjee, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, *17*, 353 – 358.

[19] M. B. Fisher, Y.-M. Zheng, A. E. Rettie, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *248*, 352 – 355.

[20] U. Scheller, T. Zimmer, D. Becher, F. Schauer, W.-H. Schunck, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32528 – 32594.

[21] J. Shanklin, C. Achim, H. Schmidt, B. G. Fox, E. Münck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 2981 – 2986.

[22] P. Meinhold, M. W. Peters, A. Hartwick, A. R. Hernandez, F. H. Arnold, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 763 – 772.

[23] We thank Dr. Enrico Funhoff for providing us with the 3D model of CYP153A6 complexed with octane.

[24] R. J. F. Branco, A. Seifert, M. Budde, V. B. Urlacher, M. J. Ramos, J. Pleiss, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2008**, *73*, 597 – 607.

[25] a) U. Schuchardt, W. A. Carvalho, E. V. Spinacé, *Synlett* **1993**, 713 – 718; b) U. Schuchardt, D. Cardoso, R. Sercheli, R. Pereira, R. S. da Cruz, M. C. Guerreiro, D. Mandelli, E. V. Spinacé, E. L. Pires, *Appl. Catal. A* **2001**, *211*, 1 – 17.

[26] E. G. Funhoff, J. Salzmann, U. Bauer, B. Witholt, J. B. van Beilen, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 806 – 812.

[27] I. E. Staijen, V. Hatzimanikatis, B. Witholt, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *244*, 462 – 470.

[28] I. G. Denisov, B. J. Baas, Y. V. Grinkova, S. G. Sligar, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 7066 – 7076.

[29] O. Lentz, A. Feenstra, T. Habicher, B. Hauer, R. Schmid, V. B. Urlacher, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 345 – 350.

[30] M. W. Peters, P. Meinhold, A. Glieder, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13442 – 13450.

 © 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers!

[31] P. C. Cirino, Y. Tang, K. Takahashi, D. A. Tirrell, F. H. Arnold, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *83*, 729 – 734.
[32] W. A. Duetz, J. B. van Beilen, B. Witholt, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 419 – 425.
[33] The toxicity of a given solvent correlates with the logarithm of its partition coefficient in octanol and water ($\log P_{ow}$). Organic molecules with a $\log P_{ow}$ value between 1.5 and 4 are extremely toxic for microorganisms because they enter cells very rapidly and promote subsequent membrane disorganization and lysis: J. L. Ramos, E. Duque, M.-T. Gallegos, P. Godoy, M. I. Ramos-González, A. Rojas, W. Terán, A. Segura, *Annu. Rev. Microbiol.* **2002**, *56*, 743 – 765. $\text{Log}\, P_{ow} = 3.2$, 4.7, 5.7, and 6.9 for cyclohexane, octane, decane, and dodecane, respectively.
[34] The decrease in the in vivo alkane hydroxylase activity over time might be due to cell lysis and the consequent collapse of cofactor regeneration. Moreover, as cells are dying and their membranes are lysed, more and more phospholipids and other biomolecules are released into the reaction mixture, and it becomes more difficult to extract products from the samples, as they might become captive in micelles that form.
[35] YqhD is an *E. coli* adenosine diphosphate dependent alcohol dehydrogenase that was shown to be active on several medium-chain-length primary alcohols: G. Sulzenbacher, K. Alvarez, R. H. Van Den Heuvel, C. Versluis C, S. Spinelli, V. Campanacci, C. Valencia, C. Cambillau, H. Eklund, M. Tegoni, *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 489 – 502.
[36] YdcW is an *E. coli* NADH-dependent aldehyde dehydrogenase active on *n*-alkyl aldehydes up to seven or eight carbon atoms in length: A. Gruez, V. Roig-Zamboni, S. Grisel, A. Salomoni, C. Valencia, V. Campanacci, M. Tegoni, C. Cambillau, *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*, 29 – 41.

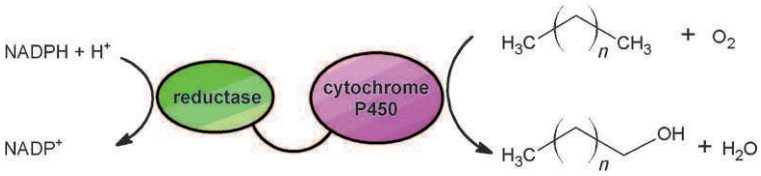
© 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Communications

Enzymatic C–H Activation

M. Bordeaux, A. Galarneau, F. Fajula, J. Drone* ——— ■■■–■■■

A Regioselective Biocatalyst for Alkane Activation under Mild Conditions



Going green: Chemical methods for the hydroxylation of alkanes involve toxic, dangerous reagents and are not very selective. In a biochemical alternative route based on an artificial self-sufficient cytochrome P450, the highly selective and efficient terminal hydroxylation of *n*-alkanes is possible under mild conditions (see scheme; NADPH is the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ($NADP^+$)).

© 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers!

C–H Bond Activation

DOI: 10.1002/anie.201203280

Catalytic, Mild, and Selective Oxyfunctionalization of Linear Alkanes: Current Challenges

*Mélanie Bordeaux, Anne Galarneau, and Jullien Drone**

biomimetic catalysts · cytochromes · green chemistry · methane monooxygenase · sustainable chemistry

Selective catalysts for sustainable oxidation of alkanes are highly demanded because of the abundance of these molecules in the environment, the possibility to transform them into higher-value compounds, such as chemicals or synthetic fuels, and the fact that, kinetically speaking, this is a difficult reaction. Numerous chemical and biological catalysts have been developed in the lasts decades for this purpose, rendering the overview over this field of chemistry difficult. After giving a definition of the ideal catalyst for alkane oxyfunctionalization, this review aims to present the catalysts available today that are closest to ideal.

1. Introduction

Alkanes are saturated hydrocarbons originating from natural gas or crude oil fields, and are widely used as chemical raw materials or fuels.[1] For example, methane and ethane, the principal constituents of natural gas, are primarily used as fuel in private households and in industry. In the industrial sector, methane is mixed with carbon dioxide and dihydrogen to produce other chemicals, such as methanol, acetic anhydride, and acetic acid, under harsh conditions.[1] Other chemicals produced from methane include chloromethanes, acetylene, and syngas.[1] Another example is cyclohexane, the primary use of which is in the production of nylon intermediates, accounting for more than 60%.[2] Longer alkanes can be cracked at high temperatures (above 200°C) in a random way to produce mixtures of smaller alkanes and alkenes.[3] These reactions, aiming to functionalize alkanes to give important building blocks or to generate energy, are either performed under harsh conditions or produce large amounts of carbon dioxide. Hence, alternative methods for functionalization of alkanes, particularly for oxyfunctionalization, are highly demanded.

Oxyfunctionalization of linear alkanes faces several issues in terms of reactivity, regio-, and chemoselectivity.[4] Alkane inertness is commonly illustrated by the fact that *n*-hexane does not react with boiling nitric acid, concentrated sulfuric acid, potassium permanganate, or chromic acid.[1,5] Indeed, the energy of an unactivated C–H bond approaches 400 kJ mol^{-1}, and finding a catalyst that is sufficiently active to break such a strong bond is problematic.[6] Considering a linear alkane, C–H bonds of the terminal methyl positions are approximately 15 kJ mol^{-1} higher in energy than those of adjacent methylene positions.[7] Hence, if the process is not directed through some substrate recognition mechanisms, preferential oxidation will be determined by the bond strength. Consequently, achieving terminal oxidation selectively is typically an even greater challenge. Finally, because oxygenated products are more reactive than the starting alkane, mixtures of overoxidized compounds are often observed.

Taking all these parameters into consideration, a definition of the ideal catalyst for alkane oxyfunctionalization can be given:[8]

1) It should be conveniently produced from cheap, renewable, and harmless sources, such as glucose, glycerol, or even starch,
2) It should enable large turnover numbers (TON) during the highly selective conversion of alkanes into oxidized derivatives (alcohols, aldehydes, ketones, or carboxylic acids), thus, catalyst stability is a key point,

[*] M. Bordeaux, Dr. A. Galarneau, Dr. J. Drone
Institut Charles Gerhardt Montpellier
UMR 5253 CNRS/ENSCM/UM2/UM1
8 rue de l'Ecole Normale, 34296 Montpellier (France)
E-mail: jullien.drone@enscm.fr
Dr. J. Drone
Ingénierie des Agropolymères et Technologies Emergentes
UMR 1208 SupAgro/INRA/CIRAD/UM2
2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier (France)

WILEY ONLINE LIBRARY

© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers!

3) For an easy implementation, it should be operative under "mild" conditions of temperature and pressure. Downstream processing should be kept to minimum by avoiding the use of expensive and/or toxic reagents/solvents,
4) It should be an atom-economical process that produces a minimal amount of non-toxic waste by using an oxidant such as molecular oxygen (from air). Because of its low cost, H_2O_2 might be considered as an environmentally friendly alternative to O_2 in some cases.

Following this definition, researchers have been exploring both chemical and enzymatic strategies for several decades. Important knowledge has been accumulated during this exploration,[9] but unresolved problems are still pending. On the following pages, the most advanced catalysts are presented and possible developments in the area of alkane hydroxylation are discussed.

2. Alkane Hydroxylation Systems Developed by Nature

Alkanes represent a large source of carbon atoms and/or of energy for a wide range of prokaryotic and eukaryotic microorganisms.[10,11] After entering the cell by passive diffusion through the membrane(s), metabolism of these hydrophobic substrates generally involves a common pathway, in which enzymatic hydroxylation occurs as the first step. Once transformed into terminal or subterminal alcohols (including terminal diols), further enzymatic oxidations result in carboxylic acid derivatives that enter the fatty acids β-oxidation metabolic route to generate energy in the cell. Enzymatic systems involved in alkane hydroxylation are very diverse. Owing to the most recent discoveries, the number of known systems is increasing and they are regularly the subject of reviews.[11] Despite the large diversity of enzymatic scaffolds and mechanisms (cytochrome P450 heme iron enzymes, integral membrane non-heme diiron alkane hydroxylases (AlkB), soluble non-heme diiron methane monooxygenases (sMMO), and membrane-bound non-heme copper-containing methane monooxygenases (pMMO)), they all can be classified as transition-metal organocatalysts. The metals found in these alkane monooxygenases are strictly limited to iron and copper. Moreover, most of them share three common characters: they use molecular dioxygen from air as the oxidizing agent, they use reduced nicotinamide dinucleotides (NAD(P)H) as electron suppliers, and they operate under physiological, mild conditions [Eq. (1)].

$$\text{R-H} + \text{O}_2 + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+ \rightarrow \text{R-OH} + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}_2\text{O} \qquad (1)$$

2.1. Methane Monooxygenases

Methane monooxygenases (MMOs) are found in methanotrophic bacteria.[12] Depending on copper concentration during the cultivation of some of these bacteria, two different types of MMOs can be expressed.[13] The soluble MMO (sMMO, EC 1.14.13.25) expressed under copper-limited conditions is made of a well-characterized carboxylate-bridged bis(μ-oxo)diiron active center[14] (Figure 1). The particulate MMO (pMMO, EC 1.14.18.3) otherwise expressed harbors a dicopper-based active site, which has long been a matter of controversy[15] (Figure 2). The substrate scope of MMOs

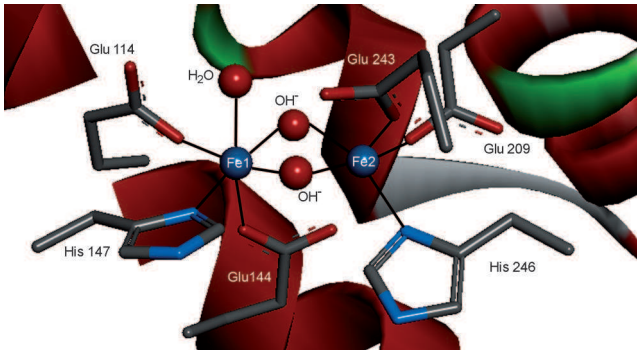


Figure 1. Carboxylate-bridged diiron^{III} resting state of the active site of soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath), found in the hydroxylase protein $MMOH_{ox}$ (PDB ID: 1MTY).

Anne Galarneau was born in Les Sables d'Olonne, France, in 1967 and obtained her Ph.D. in 1993 from the University of Nantes, France. She joined the group of Prof. T. Pinnavaia at the University of Michigan, USA, and settled at Montpellier as CNRS researcher in 1995. Her research interests include the synthesis of porous silica and its applications in biocatalysis, heterogeneous catalysis, and adsorption.

Mélanie Bordeaux was born in 1984. She received her BS degree in biochemistry from the University of Tours and her M.Sc. degree in biochemistry and biotechnology at the University of Toulouse in 2007. She spent two years working for a biotechnology company before starting her Ph.D. in 2009 at the Institute Charles Gerhardt in Montpellier, France. She works under the supervision of Jullien Drone and Anne Galarneau, and her research interests focus on protein engineering for enzymatic catalysis to produce fine chemicals.

Jullien Drone was born in Blois, France, in 1979. He studied organic chemistry at the University of Nantes and received his Ph.D. degree in 2006. He spent one postdoctoral year with Prof. Manfred T. Reetz at the Max Planck Institute for Coal Research, Germany. In 2007, he started an academic position as an assistant professor at the National Graduate School of Chemistry in Montpellier, France. His main research interests are P450-based biocatalysis and metabolic-pathway engineering for terpene biosynthesis in microorganisms.

© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

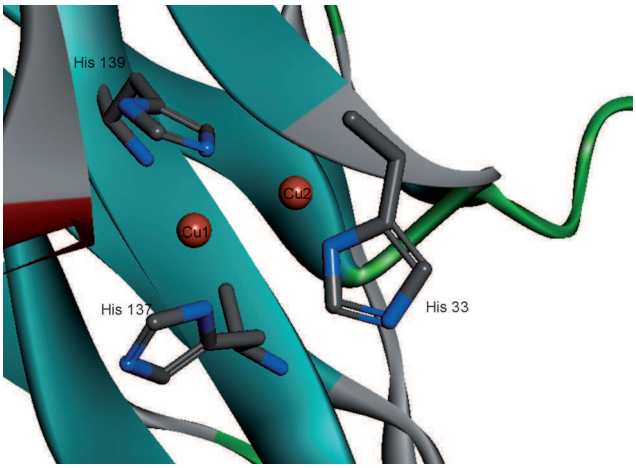


Figure 2. The dicopper active site of particulate monooxygenase from *M. capsulatus* (PDB ID: 1YEW).

ranges from methane to octane, but they are also able to oxidize a vast range of other hydrophobic molecules.[16] These enzymes may seem very promising for in vitro applications, but, as previously noted, the ideal biocatalyst should be easily prepared. An issue with MMOs is the fact that they are multicomponent, because the production of such a recombinant and functional system is extremely difficult.[17] Moreover, pMMO is membrane-bound. A high level of difficulty does not mean an impossible task, as recently demonstrated by different in vitro cutting-edge studies on these enzymes.[15,18–22] In vitro applications are nevertheless strongly limited by these problems. Moreover, these enzymes have been shown to be quite unstable and subject to product inhibition, thus leading to poor productivity[14] (Table 1, entries 1 and 2). Although they appear to be far from ideal catalysts, their binuclear metallic active sites and related mechanisms[23,24] have been for a long time and still are a source of inspiration for chemical-catalyst designers (see Section 5).[25]

2.2. Integral Membrane Non-Heme Diiron Alkane ω-Hydroxylases

The enzyme AlkB (EC 1.14.15.3) was initially isolated from *Pseudomonas putida* GPo1 (*P. oleovorans*), a bacterium able to grow on *n*-octane as the sole source of carbon atoms and energy.[45,46] AlkB-related enzymes can, in fact, be found within several *n*-alkane-degrading bacteria, such as *Alcanivorax*, *Acinetobacter*, *Gordonia*, etc.[47–54] They use a diiron cluster to regioselectively oxidize substrates, generally ranging from pentane to dodecane, in terminal position.[27] In spite of relatively high turnover frequencies (TOF; Table 1, entry 3), AlkBs are not well-suited for in vitro applications

Table 1: Selected catalysts for the mild oxyfunctionalization of linear alkanes.

Entry	Catalyst	Oxidant	Substrate[a]	Product (Selectivity)	TON/TOF[b]	Reference
1	sMMO	O_2	methane	methanol (100%)	n.a.[c]/222	[26]
2	pMMO	O_2	methane	methanol (100%)	18[d]/0.3	[15]
3	AlkB	O_2	octane	1-octanol (100%)	n.a./207	[27]
4	CYP4B1	O_2	heptane	1-heptanol (96%)	n.a./33	[28]
5	CYP52 A3	O_2	hexadecane	1-hexadecanol (98%)	n.a./27	[29]
6	CYP153 A6	O_2	octane	1-octanol (>95%)	n.a./60	[30]
7	CYP153 A[e]	O_2	octane	1-octanol (91%)	55/n.a.	[31]
8	APO1 AaP	H_2O_2	butane	1-butanol (100%)	1200[d]/n.a.	[32]
9	APO1 AaP	H_2O_2	hexane	1-hexanol (53%)	1900[d]/n.a.	[32]
10	LadA[f]	O_2	hexadecane	1-hexadecanol (100%)	n.a./4.4	[33]
11	$P450_{PMO}$ R2	O_2	propane	2-propanol (90%)	45800/370	[34]
12	$P450_{PMO}$ R2	O_2	ethane	ethanol (100%)	2450/n.a.	[35]
13	P450cam[g]	O_2	propane	2-propanol (96%)	n.a./505	[36]
14	P450cam[g]	O_2	ethane	ethanol (100%)	n.a./78	[36]
15	A13-Red	O_2	octane	1-octanol (>99%)	410[h]/57	[37]
16	WT BM3[i]	O_2	propane	2-propanol (100%)	1020/n.a.	[38]
17	WT BM3[i]	O_2	methane	methanol (100%)	2500/n.a.	[38]
18	Mn(TDCPP)Cl	H_2O_2	heptane	ω-1 (64%), ω-2 (28%)[j]	202[d]/n.a.	[39,40]
19	$(FePc tBu_4)_2N$	H_2O_2	methane	formic acid (64%)	29/n.a.	[41]
20	Vanadium POM[k]	H_2O_2	hexane	ω-1 (66%), ω-2 (26%)[l]	22/n.a.	[42]
21	MnAlPO-18	O_2	hexane	ω (66%), ω-1 (32%)[m]	149/n.a.	[43]
22	Cu-ZSM-5	O_2	methane	methanol (>98%)	0.024[d]/n.a.	[44]

[a] Substrates are linear alkanes. [b] TON: turnover number (μmol product/μmol catalyst), TOF: turnover frequency (μmol product/μmol catalyst/min). [c] n.a.: data not available. [d] Calculated from the data available in the reference. [e] CYP153A from *Polaromonas* sp. strain JS666. [f] LadA from *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 with F146N/N376I mutations. [g] P450cam harboring 9 mutations: F87W/Y96F/T101L/V247L/L1244M/L294M/T185M/L1358P/G248A. [h] By using a NADPH recycling system and in the presence of bovine catalase, the TON of A13-Red on octane reached values above 3000 (unpublished results). [i] Wild-type P450 BM3 was used in the presence of $CF_3(CF_2)_8CO_2H$ and $CF_3(CF_2)_9CO_2H$ in the case of methane and propane, respectively. [j] ω-1: sum of 2-heptanol and 2-heptanone, ω-2: sum of 3-heptanol and 3-heptanone. [k] Vanadium-based polyoxometalate $[(n\text{-}C_4H_9)_4N]_4[\gamma\text{-}HPV_2W_{10}O_{40}]$. [l] ω-1: 2-hexanol, ω-2:3-hexanol. [m] ω: sum of 1-hexanol, 1-hexanal, and hexanoic acid, ω-1: sum of 2-hexanol and 2-hexanone.

© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers!

because of their membrane-bound and multicomponent nature.[55–57]

2.3. P450 Enzymes

Cytochromes P450 (CYPs) form a superfamily of enzymes widely distributed from prokaryotes to higher eukaryotes.[58,59] They catalyze monooxygenation of C–H bonds on a large variety of hydrophobic molecules, such as alkanes, xenobiotics, steroids, or prostaglandins.[60] Active sites of CYPs ubiquitously consist of a mononuclear iron atom that is complexed by an N_4-tetradentate porphyrin and a proximal cysteinate: the heme prosthetic group.[61] Hydroxylation mechanism occurs through the heme paradigm, in which H· is abstracted from the substrate (R-H) by an oxoiron(IV) reactive species [(Por·$^+$)Fe^{IV}=O)], also known as compound I (Figure 3).[60,62–66]

Selective hydroxylation of alkanes at the terminal methyl position was reported for some mammalian liver P450s, including rabbit liver P450 CYP4B1,[28] and in *Candida* subspecies P450 CYP52A3.[29] However, as AlkB and MMOs, these enzymes are membrane-bound and multicomponent, and their catalytic efficiency is rather low, which dramatically restricts their in vitro applications (Table 1, entries 4 and 5).

Pioneering discoveries by Maier,[67] followed by those from van Beilen[68–70] and Witholt and Funhoff[30] and their respective co-workers have shed light on a novel family of monomeric, soluble (but multicomponent) proteins that regioselectively convert medium-chain alkanes (pentane to dodecane) into the corresponding primary alcohols. These authors collected a significant amount of in vitro data for several members of the CYP153 family (Table 1, entry 6). Alkane hydroxylases of the CYP153 family are at the center of several studies that aim to characterize existing or new members of the family[31,71–74] (Table 1, entry 7), to change their substrate scope[75] or to enhance their efficiency for in vitro applications.[37] This newly discovered family of CYPs is, to date, the most efficient for the regioselective hydroxylation in terminal position. Further studies on this family should focus on the resolution of tridimensional structures to improve our understanding of the molecular mechanisms responsible for their high regio- and chemoselectivities.

2.4. Aromatic Peroxygenases

A few years ago, two novel extracellular fungal peroxidases have been discovered in the agaric mushrooms *Agrocybe aegerita* and *Coprinellus radians*, and have been classified as aromatic peroxygenases (APO).[76–83] These H_2O_2-dependent heme iron thiolate proteins are soluble, have a single component, and combine the unique features of CYPs (oxygen transfer) and of peroxidases, such as the heme

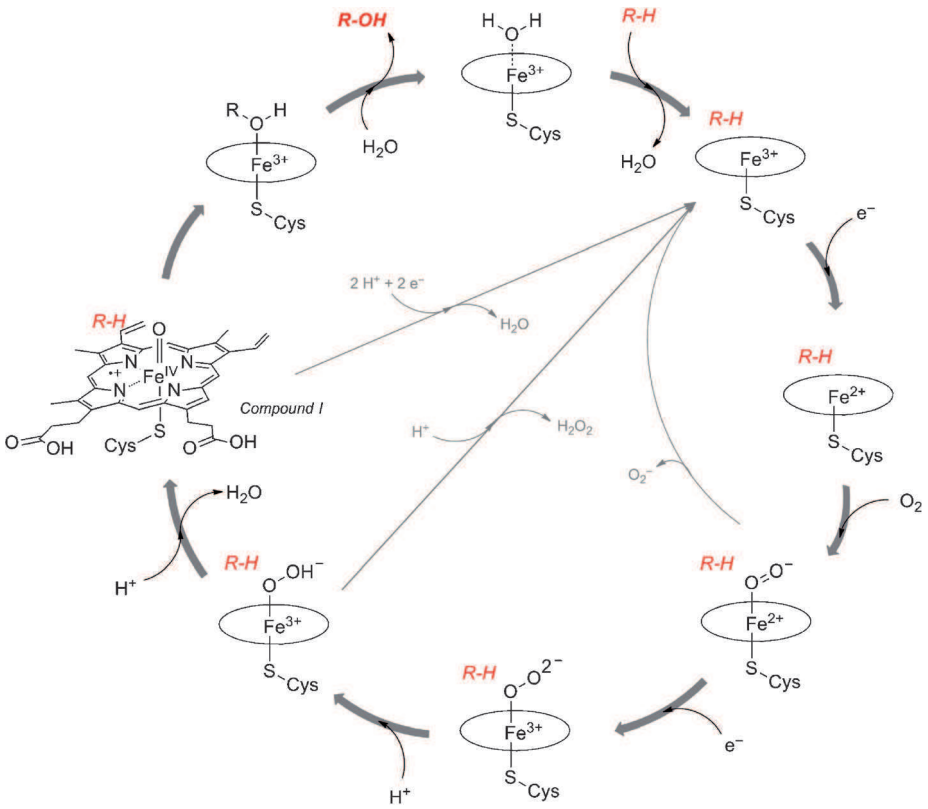


Figure 3. Generic catalytic cycle of cytochrome P450 with the chemical formula of the catalytically active Fe–heme species (compound I). The heme prosthetic group is depicted by an oval and the proximal cysteine ligand is abbreviated CysS.

© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

chloroperoxidase (CPO) from the ascomycete *Caldariomyces fumago*[84] (phenol oxidation, halide oxidation, etc.). It has been established in 2011 that the *A. aegerita* peroxygenase (AaP) is able to hydroxylate alkanes from propane to hexadecane with H_2O_2 as the oxidizing agent. Interestingly, the hydroxylation of propane is 100% selective for 1-propanol, but gives 2- and 3-alcohols from higher alkanes. Moreover, AaP is fairly stable in large amounts of various organic solvents, such as acetone, dichloromethane, or hexane.[32] To date, this enzyme appears to be the closest to ideal biocatalyst for (sub)terminal hydroxylation of short- and medium-chain alkanes under mild conditions. As the enzyme is efficient (Table 1, entries 8 and 9), stable, self-sufficient, and does not require any reduced nicotinamide cofactors, direct applications without protein engineering could be easily implemented. Some efforts should be made on the recombinant production of AaP and homologous APOs as well as on their 3D-structures resolution.

2.5. Long-Chain Alkane Monooxygenase

Isolated in 2007 from *G. thermodenitrificans* NG80-2 (a thermophilic bacterium that metabolizes long-chain alkanes), the soluble enzyme LadA enables the selective but slow oxidation of the terminal position of alkanes from C_{15} to C_{36} (Table 1, entry 10) through an original, metal-free flavoprotein monooxygenase mechanism.[85–87] The crystal structure of LadA was resolved at 2.7 Å in complex with its flavin mononucleotide (FMN) cofactor, and showed a homodimeric organization based on a $(\alpha/\beta)_8$ barrel monomer and a very surprising structural similarity with bacterial luciferase family members.[87] This thermostable biocatalyst requires either the reduced form of FMN ($FMNH_2$) or NADPH, both in stoichiometric amounts to allow substrate oxidation.[33] Hence, LadA is cofactor-dependent, not self-sufficient, and partner enzyme(s), which are not identified yet, are postulated for $FMNH_2$ or NADPH supply and/or recycling. Further biochemical studies on LadA should take an interest in understanding its peculiar mechanism of C–H bond activation without any metallic center.

2.6. Conclusion on Natural Alkane Monooxygenases

Enzymatic systems naturally evolved for alkane hydroxylation are highly specialized and adapted for catalysis in cells, where cofactors can be efficiently regenerated by partner reductase(s). The use of wild-type, cofactor-dependent monooxygenases for in vitro application is consequently drastically limited. The use of whole-cell biocatalysis is an alternative to the use of isolated, cell-free systems, but the viability of this strategy is fundamentally decreased by additional and costly downstream processing.[88] The exception to this rule could be represented by the newly elucidated APOs, but further studies are needed to determine their tridimensional structures[89] and to fully assess their biocatalytic potential. Considering these problems, molecular engineering of natural alkane monooxygenases is a judicious approach to reach the ideal catalyst, as illustrated in the following section.

3. Biological Alkane Hydroxylation Systems Optimized by Molecular Protein Engineering

Protein engineering is a dramatically powerful tool for biocatalysis. Indeed, it provides a way to design enzymes with novel and controllable properties. Several strategies have been developed in the last two decades, and protein engineering has been extensively reviewed.[90–101] In summary, two distinct strategies can be depicted: the random (molecular directed evolution) and the rational strategy. In a directed evolution experiment, a library of randomly mutated genes is created, followed by screening for the desired property at the protein level. Several rounds of randomization/screening are applied, thus mimicking the natural process of the Darwinian evolution. No information on the protein structure is needed with this strategy. On the other hand, rational design of enzymes has proven to be a very efficient strategy as well. It is based on the information provided by the three-dimensional structure of the target protein. The introduction of mutations is perfectly controlled, but requires a good knowledge of the relationships between sequence and activity.

3.1. Directed Evolution of P450 BM3

Cytochrome P450 BM3 is a soluble and single-component fatty acid hydroxylase isolated from *Bacillus megaterium* (CYP102A1). It is the most active of all P450 enzymes, probably because the normally separated components (the hydroxylating and the electron-transfer subunits) are merged in a single polypeptide. This peculiar architecture explains why this CYP is self-sufficient. BM3 catalyzes the subterminal hydroxylation of medium- to long-chain fatty acids.[102,103] Arnold and co-workers have achieved a considerable amount of work to change the specificity of P450 BM3 from fatty acids to short-chain alkanes by using molecular directed evolution.[8,34,104–107] The most evolved variants harbor mutations on both subdomains and show high activity on gaseous alkanes and ultimately on ethane (Table 1, entries 11 and 12). During its evolution, the long, large, and hydrophobic funnel, which is naturally designed to dock fatty acids, was progressively shrinked in order to allow a better interaction with very small molecules.[35] Although still NADPH-dependent, these evolved mutants of BM3 are almost ideal biocatalysts for subterminal alkane hydroxylation, even though they are surprisingly inactive on methane. It might be interesting to evaluate the combination between the mutations of the H_2O_2-dependent mutant 21B3[108] (NAD(P)H independent) with the heme domain of propane-active mutant 35-E11[8] or $P450_{PMO}R2$[34] to obtain a self-sufficient hydrogen peroxide driven propane hydroxylating biocatalyst, an equivalent of APOs.

© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers!

3.2. Iterative and Rational Design of P450cam

Cytochrome P450cam from *P. putida* (also known as CYP101) is a soluble but multicomponent enzyme that naturally oxidizes camphor.[109–111] On the basis of X-ray structures of the enzyme and some mutants, Wong and co-workers described the progressive shrinking of the large camphor-binding pocket to enable alkane binding and hydroxylation by substituting the original residues with larger or more hydrophobic ones. This series of publications led to the description of a relatively efficient ethane hydroxylase (Table 1, entries 13 and 14) in 2005.[36,112–115] Although very interesting from the fundamental point of view, these variants would probably be difficult to implement in vitro because P450cam is not a naturally self-sufficient CYP.

3.3. Man-made P450 Fusion Enzymes

A limitation to the use of CYPs in vitro is the involvement of redox proteins necessary to shuttle electrons from NAD(P)H to the heme group during the catalytic cycle.[116] Inspired by the original architecture of self-sufficient BM3, and encouraged by the feasibility of artificial fusions between P450-hydroxylase and electron-transfer subunits,[72,117–121] Drone and co-workers generated an artificial single-component P450 for the in vitro regioselective hydroxylation of alkanes in terminal position under mild conditions. In short, they combined the excellent regioselectivity of a CYP153 hydroxylating unit with the catalytic efficiency of a BM3-like architecture (Figure 4). Particularly interesting about the

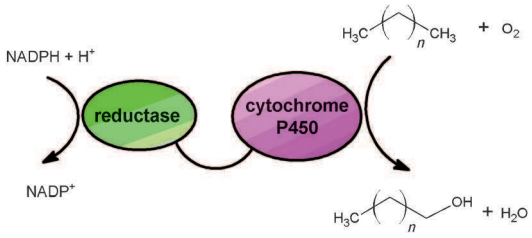


Figure 4. Principle of an artificial fusion between a CYP domain (responsible for the hydroxylation reaction) and a reductase domain (responsible for electron shuttling from NAD(P)H to CYP) leading to a self-sufficient CYP.

P450 unit (CYP153A13a from *Alcanivorax borkumensis* SK2) is its high selectivity toward terminal hydroxylation and the lack of overoxidation activity.[37] This monooxygenase is the most efficient alkane ω-hydroxylase described to date (Table 1, entry 15) and expands the alkane activation toolbox.[122]

This strategy, which enables the construction of self-sufficient systems, had been used to create a functional putidaredoxin reductase-putidaredoxin-cytochrome P450cam triple fusion protein[121] years before P450cam was converted into an ethane monooxygenase. Therefore, it is surprising that no attempt to create the similar triple fusion with the propane- or the ethane-active mutant has been reported to date. This might generate an interesting biocatalyst.

Similarly to the strategy developed by Fraaije and co-workers with Baeyer–Villiger monooxygenases,[123] another type of hybrid system, including the heme, the reductase, and a NAD(P)H-recycling domain on a single polypeptide, could enable access to a new kind of useful self-sufficient alkane hydroxylases.

3.4. Conclusion on Protein Engineering of Alkane Hydroxylases

Wild-type enzymatic systems are versatile and have proven to be remarkable platforms for developing the ideal alkane hydroxylation catalysts using protein engineering. In vitro applications are no longer limited by the absence of suitable enzymes, but more by the cost of NAD(P)H for electron supply.[124] This bottleneck could be circumvented by generating hybrid enzymes, combining the activity of mutant or wild-type heme domains (from P450cam, P450 BM3, or CYP153 family) and the advantages of H_2O_2-dependent APOs. That would be an interesting way to obtain ideal enzymes for hydroxylation of C_2–C_{12} substrates. Based on these hybrids, protein engineering is likely to provide cofactor-independent enzymes active on methane.

4. The Use of Additives for Tuning CYP Activity

The "substrate misrecognition system" is a recent concept originally described in 2007 by Watanabe and co-workers.[125–127] In this strategy, the biocatalyst is tricked by decoy molecules and oxidizes non-natural substrates. Two independent groups have recently reported the efficient and selective hydroxylation of alkanes with the wild-type P450 BM3, using perfluorinated fatty acids as decoy molecules (Table 1, entry 16).[38,128] The long, large, and hydrophobic substrate pocket is, in fact, filled with an inert perfluorinated acid of adequate chain length in order to leave sufficient space for the alkane substrate to dock in and subsequently react with compound I. The principal difference between these studies is that Reetz and co-workers efficiently and selectively oxidized methane to methanol[38] (Table 1, entry 17), while Watanabe and co-workers did not witness activity on alkanes smaller than propane.[128] Notably, it is the very first example of the selective oxidation of methane catalyzed by a P450 enzyme. It represents a real breakthrough, because it was thought for many years that CYPs were unable to perform this reaction. This difference between both studies can probably originate from the different experimental setup. Indeed, Reetz proceeded to use a high-pressure reactor (10 bar) and an NADPH recycling system, while Watanabe performed the catalytic tests in alkane-saturated aqueous buffers with no NADPH recycling system. Thus, it is very interesting to consider the "substrate misrecognition system" strategy, because it presents a less labor-intensive way than a directed-evolution strategy to change the substrate scope of an enzyme. However, a large-scale application would be problematic, because the presence of perfluorinated decoy molecules requires additional downstream processing steps to separate them from the product at the end of the reaction.

© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Finally, the comparison between these studies shows that experimental conditions can make a large difference between nearly identical enzymes. Using the $P450_{PMO}$ mutants[34] of P450 BM3 in pressurized reactors (with or maybe without decoy molecules) might thus give unexpected results with methane.

5. Chemical Catalysts for Alkane Hydroxylation under Mild Conditions

Even though the number and variety of reports on homogeneous or heterogeneous chemical catalysts for alkane hydroxylation is considerable,[129] only few of them can be considered as ideal, and there are still large gaps in our fundamental knowledge of how to rationally design such catalysts. Actually, all these systems generate high-valent metal–oxo complexes sufficiently active to react with C–H bonds.[61,130,131] Four categories of chemical catalysts for low-temperature (below 60 °C) hydroxylation of alkanes with dioxygen or hydrogen peroxide as terminal oxidant can be depicted: metalloporphyrins, mononuclear non-heme iron complexes, polyoxometalates, and microporous systems. The examples given in this section are willingly restricted to cases, in which no aggressive and/or environmentally harmful oxidants[2] (such as $K_2Cr_2O_7$, CrO_3, $KMnO_4$, PhIO, peracids, alkyl hydroperoxides, OsO_4, SeO_2, oxone, etc.) or prohibitive metals (Au, Pt, Pd, Ru, Ir, etc.) are used.

5.1. Metalloporphyrins: Biomimetic Heme–Iron Complexes

The understanding of mechanisms used by CYPs has inspired the development of biomimetic heme-based catalysts for many years, and metalloporphyrins are some of them.[130,132] During several generations of catalytic systems, the chemical stability of the porphyrin group was progressively improved.[133] Indeed, the porphyrin ligands are susceptible to oxidative self-degradation.[134] Stable iron and manganese porphyrins that use H_2O_2 and are able to sustain alkane hydroxylation with TONs above 200 have emerged, such as *meso*-tetra-(2,6-dichlorophenyl) porphyrin (TDCPP, Figure 5). Cyclohexane and adamantane hydroxylations were almost exclusively used as model reactions at the expense of linear alkanes. Modest conversion of heptane (11.5 % with respect to H_2O_2) under mild conditions was reported with Mn(TDCPP)Cl and H_2O_2, giving a mixture of 2-, 3-alcohols and 2-, 3-ketones (Table 1, entry 18).[39,40]

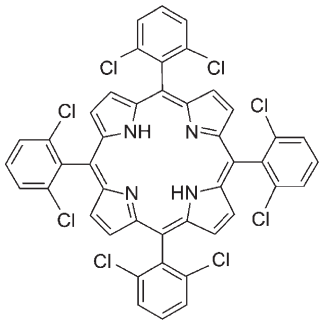


Figure 5. Structure of the biomimetic N_4-tetradentate *meso*-tetra-(2,6-dichlorophenyl)porphyrin or TDCPP ligand.

The use of stable, binuclear, porphyrin-like complexes for the continued challenge of methane oxidation has been described recently by Sorokin and co-workers.[135] The catalysts used in that case are soluble N-bridged diiron phtalocyanines (Figure 6), which are relatively easy to prepare.[135–137] Interestingly, these chemical catalysts combine the porphyrin nature of CYP active site with the diiron nature of sMMO active site. These authors have reported unprecedented catalytic activities on methane to give formic acid with high selectivity[41] (Table 1, entry 19) as well as on propane[138] by using H_2O_2 and performing the reactions under mild conditions (25–60 °C).

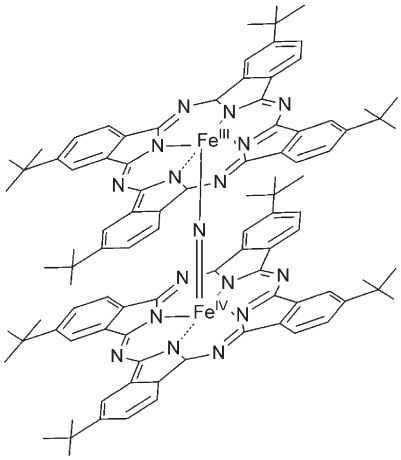


Figure 6. Structure of the N-bridged diiron phtalocyanine $(FePc{t}Bu_4)_2N$ described by Sorokin for methane oxidation under mild conditions.[41]

5.2. Biomimetic Mononuclear Non-Heme Iron Complexes

In a similar way of thinking, non-heme iron complexes were developed with respect to the active sites of mononuclear non-heme monooxygenases (for example, Rieske dioxygenases).[139,140] Iron that is complexed either by the N_4-tetradentate ligands of the tripodal TPA (tris(2-pyridylmethyl)amine)[134] or by the linear BPMEN (*N*,*N*′-bis(2-pyridylmethyl)-*N*,*N*′-dimethyl-1,2-diaminoethane,[141] Figure 7) undergoes alkane hydroxylation in the presence of H_2O_2 at room temperature. For example, Fe^{II}-BPMEN/H_2O_2 is 89 % chemoselective for cyclohexanol and achieves 6.3 TONs.[140,142–144] There is almost no documentation of these catalysts with substrates other than cyclohexane and adamantane. Nevertheless, as cyclohexane has a C–H bond dissociation energy of 99 kcal mol^{-1},[145] comparable to that of secondary C–H bonds in linear alkanes,[146] extrapolation of the catalytic activity on these substrates makes sense.

Catalysis with Fe^{II}–TPA/H_2O_2 was further investigated by computational means.[146] Reactivity of the high-valent iron–

© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers!

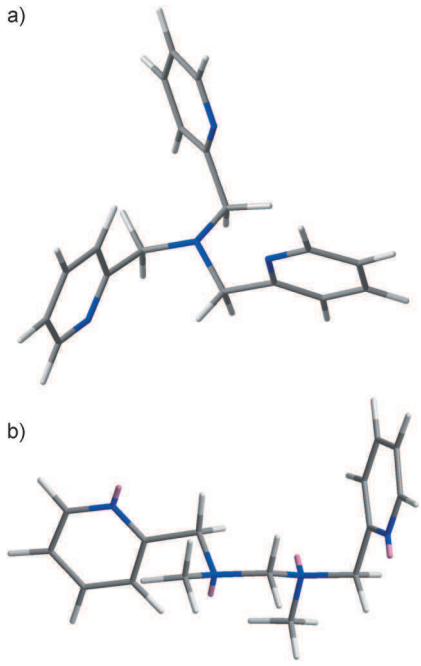


Figure 7. Threedimensional views of a) the N_4-tetradentate, tripodal TPA ligand, and b) the N_4-tetradentate, linear BPMEN ligand.

oxo [HO-(TPA)Fe^{V}=O] species was explored with propane and methane, following the heme paradigm mechanism.[147] It appears that the calculated activation energy for hydrogen abstraction of primary C–H bond in methane is too high for this catalyst. However, it clearly shows that homolytic cleavage of secondary C–H bonds in propane by the reactive species would be experimentally feasible and give 2-propanol.

Based on the catalyst Fe^{II}–TPA, a recent work has attempted to improve its selectivity for terminal hydroxylation. The design of TPA derivatives with long *n*-alkyl chains appears to be an elegant strategy to mimic hydrophobic binding pockets of enzymes, because the linear alkane can be recognized and correctly oriented through a subsequent tunneling effect. Unfortunately, none of these catalysts produced more than 10% of oxygenated products.[148]

5.3. Vanadium-based Polyoxometalates

Polyoxometalates (POMs) are stable clusters of early-transition metals and oxygen anions originally reported in 1826 by Berzelius.[149] Some general properties, such as the possible introduction of a transition metal into their frameworks, make POMs a class of attractive targets for catalysis.[150] Vanadium-based POMs are able to generate strong electrophilic oxidative species in the presence of $HClO_4$ and H_2O_2 (Figure 8, species **C**).[151] This property was recently exploited with a divanadium-substituted phosphotungstate catalyst for the efficient, mild, and selective oxidation of *n*-propane, *n*-butane, and *n*-hexane (Table 1, entry 20).[42,151] Despite modest TONs, this catalyst is highly chemoselective, because it does not overoxidize the alcohols produced.

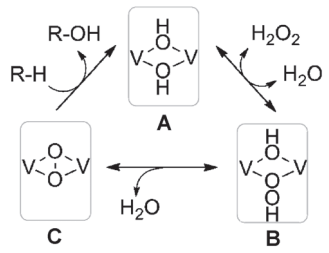


Figure 8. Postulated mechanism for the hydroxylation of alkanes with H_2O_2 catalyzed by vanadium-doped POMs. In the presence of H^+ and hydrogen peroxide, the resting species **A** (bis-(μ-hydroxo) divanadium) is oxidized to give **B** ((μ-hydroperoxo, μ-hydroxo) divanadium), which further dehydrates to **C** ([(μ-η^2:η^2-peroxo) divanadium) believed to be responsible for the oxidation.

5.4. Shape-Selective Oxidation with Microporous Catalysts

Microporous solids contain cages and channels of varying size and shape, and are commonly used as adsorbents and catalysts.[152–154] Under specific conditions, a fraction of the framework's Al^{III} ions of aluminophosphate (AlPO) molecular sieves can be substituted by another metal without notable modifications of their morphology.[155] It has been shown that Mn^{III}-substituted AlPO (in particular Mn-AlPO-18, $Al_{24}P_{24}O_{96}$), with 3.8 Å pores, regioselectively achieves the terminal oxidation of *n*-pentane (39% regioselective), *n*-hexane (65%), *n*-octane (62%), and *n*-dodecane (47%) using air (or O_2) as the unique source of oxygen (Table 1, entry 21).[43,156] In this case, regioselectivity is mainly governed by the vicinity of the terminal methyl position within the cage framework (Figure 9). Thus, there is direct relationship between the pore size of the eight-membered rings of the catalyst and the size of the alkane molecule. However, it should be noted that the chemoselectivity was difficult to control (overoxidized compounds are obtained).[5] Moreover, the conversion rate had to be kept below 10% to avoid deactivation of the catalyst by side products. These results have been contradicted by another team that synthesized the same catalysts and tested their regioselectivity profiles under

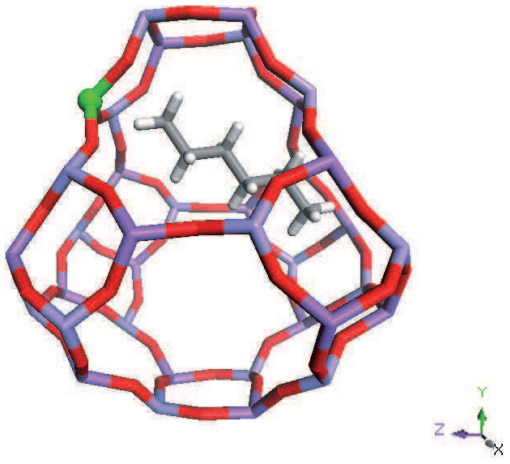


Figure 9. *n*-Hexane docking to the Mn^{III}-substituted AlPO-18 framework.

© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

the same conditions. This second study showed that, in their hands, the terminal oxidation leads to less than 5% of the products, while ω-1 and ω-2 oxidation account for 28 and 33%, respectively.[7]

Some zeolite-based catalysts have been described for the selective methane oxidation to methanol.[44] The aluminosilicate Cu-ZSM-5 (Si/Al = 12, Cu/Al = 0.58) was activated with O_2, then methane was passed through the catalyst at room temperature and selectively gave methanol. This catalyst was also tested with ethane and gave a 4/1 mixture of ethanol/acetaldehyde. The same authors described a zeolite mordenite (Si/Al = 8.8, Cu/Al = 0.43) that resulted in equivalent amounts of methanol per gram of catalyst under identical conditions. Both catalysts were thought to have the adequate architecture to allow the formation of a bis(μ-oxo)dicopper core by mimicking the bis(μ-oxo)diiron sMMO active center. However, strong evidences recently elucidated a bent mono-(μ-oxo)dicupric ($[Cu_2O]^{2+}$ or Cu^{II}-O-Cu^{II}) species to be responsible of C–H bond abstraction.[157] Despite the fact that these systems are not catalytic (TON below the unity, Table 1, entry 22), they brought a significant knowledge in copper-based mechanisms for activation of methane.

5.5. Conclusion on Chemical Catalysts

The development of biomimetic/bioinspired chemical catalysts for alkane hydroxylation has improved our understanding of alkane monoxygenases. It proves that merging these complementary approaches instead of trying to render one more attractive than the other is very important. Chemical catalysts are either regioselective or chemoselective, but both selectivities are not, for instance, found in the same catalyst. Interestingly, while achieving selective transformations for longer alkanes is still problematic, direct, mild, and selective activation of methane, which is the most difficult reaction, is about to be solved by chemical catalysts. Finally, in spite of immense efforts and progresses, the development of methods for the selective oxygenation of alkanes with O_2 still remains a major challenge.

6. Summary and Outlook

Nature has been using and evolving organometallic alkane monooxygenases for at least several hundred million years,[158,159] allowing specialized bacteria to grow independently of photosynthesis, for example, by feeding on methane near cold-gas seeps and hydrothermal vents in oceans.[12] Although membrane-bound and/or multicomponent enzymes clearly appear not to be the right choice for the design of the ideal catalyst, intensive efforts have been invested into the discovery and/or engineering of soluble and single-component enzymes for C(sp^3)–H bond activation. Some of them are fulfilling almost all the criteria of ideality. On the other hand, chemical catalysts are still being studied, engineered, and characterized. Even today, only few of them might be considered to be in agreement with the principles of "green" chemistry, and there is still much to do to reach this ultimate goal. Making comparisons between chemical and enzymatic catalysts for alkane oxyfunctionalization is an extremely useful strategy to gain insights into the fundamental mechanisms of this chemistry. This allows the development of novel catalysts that are able to address the challenges of sustainable oxidation processes.[2,160] It is likely that the efficient, mild, and chemoselective oxidation of methane will be first achieved by chemical catalysts during the next years. Regioselective oxyfunctionalization of longer alkanes will not be possible without the frame of a substrate binding pocket to induce both their recognition and orientation. Single-component, soluble, and H_2O_2-dependent biocatalysts will play a crucial role in this type of transformations, and there is a great chance that such a biocatalyst will be based on the APO/CYP scaffold. Besides biocatalyst design, several practical issues should also be solved, such as low substrate solubility, limited oxygen mass transfer, and product inhibition. As well-illustrated by dedicated reviews,[58,161–166] optimization of reaction parameters to improve productivity, yield, and consequently economic feasibility will allow the development of industrially useful preparative transformations based on these enzymes.

Work on CYP153-based fusion proteins was funded by the French Ministry of Education, the CNRS, the Graduate School of Chemistry of Montpellier (ENSCM), and the University of Montpellier 2. We are grateful to E. Dubreucq, A.-H. Jan, and M. Subileau for fruitful discussions and proofreading the manuscript.

Received: April 28, 2012
Published online: ■■ ■■, ■■■■

[1] H. Arakawa, M. Aresta, J. N. Armor, M. A. Barteau, E. J. Beckman, A. T. Bell, J. E. Bercaw, C. Creutz, E. Dinjus, D. A. Dixon, et al., *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 953–996.
[2] J. M. Thomas, R. Raja, *Catal. Today* **2006**, *117*, 22–31.
[3] K. P. de Jong, J. Zečević, H. Friedrich, P. E. de Jongh, M. Bulut, S. van Donk, R. Kenmogne, A. Finiels, V. Hulea, F. Fajula, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 10272–10276; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 10074–10078.
[4] R. H. Crabtree, *Dalton Trans.* **2001**, 2437–2450.
[5] R. Raja, G. Sankar, J. M. Thomas, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2403–2406; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2313–2316.
[6] A. E. Shilov, G. B. Shul'pin, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2879–2932.
[7] B. Modén, B.-Z. Zhan, J. Dakka, J. G. Santiesteban, E. Iglesia, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 1402–1411.
[8] P. Meinhold, M. W. Peters, M. M. Y. Chen, K. Takahashi, F. H. Arnold, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1765–1768.
[9] J. A. Labinger, J. E. Bercaw, *Nature* **2002**, *417*, 507–514.
[10] J. B. Van Beilen, Z. Li, W. A. Duetz, T. H. M. Smits, B. Witholt, *Oil Gas Sci. Technol.* **2003**, *58*, 427–440.
[11] J. B. van Beilen, E. G. Funhoff, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 308–314.
[12] R. S. Hanson, T. E. Hanson, *Microbiol. Rev.* **1996**, *60*, 439–471.
[13] J. C. Murrell, I. R. McDonald, B. Gilbert, *Trends Microbiol.* **2000**, *8*, 221–225.
[14] M. Merkx, D. A. Kopp, M. H. Sazinsky, J. L. Blazyk, J. Müller, S. J. Lippard, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2860–2888; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2782–2807.

 © 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers!

[15] R. Balasubramanian, S. M. Smith, S. Rawat, L. A. Yatsunyk, T. L. Stemmler, A. C. Rosenzweig, *Nature* **2010**, *465*, 115 – 119.
[16] J. Green, H. Dalton, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 17698 – 17703.
[17] J. Colby, H. Dalton, *Biochem. J.* **1978**, *171*, 461 – 468.
[18] S. M. Smith, S. Rawat, J. Telser, B. M. Hoffman, T. L. Stemmler, A. C. Rosenzweig, *Biochemistry* **2011**, *50*, 10231 – 10240.
[19] R. L. Lieberman, D. B. Shrestha, P. E. Doan, B. M. Hoffman, T. L. Stemmler, A. C. Rosenzweig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3820 – 3825.
[20] A. Kitmitto, N. Myronova, P. Basu, H. Dalton, *Biochemistry* **2005**, *44*, 10954 – 10965.
[21] J. S. Lloyd, P. De Marco, H. Dalton, J. C. Murrell, *Arch. Microbiol.* **1999**, *171*, 364 – 370.
[22] R. L. Lieberman, A. C. Rosenzweig, *Nature* **2005**, *434*, 177 – 182.
[23] S. J. Lippard, *Philos. Trans. R. Soc.* **2005**, *363*, 861 – 877.
[24] J. D. Lipscomb, B. J. Brazeau, B. J. Wallar, *Int. Congr. Ser.* **2002**, *1233*, 205 – 212.
[25] E. Y. Tshuva, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 987 – 1012.
[26] B. G. Fox, W. A. Froland, D. R. Jollie, J. D. Lipscomb, *Methods Enzymol.* **1990**, *188*, 191 – 202.
[27] J. Shanklin, C. Achim, H. Schmidt, B. G. Fox, E. Münck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 2981 – 2986.
[28] M. B. Fisher, Y.-M. Zheng, A. E. Rettie, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *248*, 352 – 355.
[29] U. Scheller, T. Zimmer, D. Becher, F. Schauer, W.-H. Schunck, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32528 – 32534.
[30] E. G. Funhoff, J. Salzmann, U. Bauer, B. Witholt, J. B. van Beilen, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 806 – 812.
[31] D. Scheps, S. Honda Malca, H. Hoffmann, B. M. Nestl, B. Hauer, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 6727 – 6733.
[32] S. Peter, M. Kinne, X. Wang, R. Ullrich, G. Kayser, J. T. Groves, M. Hofrichter, *FEBS J.* **2011**, *278*, 3667 – 3675.
[33] Y. Dong, J. Yan, H. Du, M. Chen, T. Ma, L. Feng, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94*, 1019 – 1029.
[34] R. Fasan, M. M. Chen, N. C. Crook, F. H. Arnold, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8566 – 8570; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8414 – 8418.
[35] R. Fasan, Y. T. Meharenna, C. D. Snow, T. L. Poulos, F. H. Arnold, *J. Mol. Biol.* **2008**, *383*, 1069 – 1080.
[36] F. Xu, S. G. Bell, J. Lednik, A. Insley, Z. Rao, L.-L. Wong, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4097 – 4100; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4029 – 4032.
[37] M. Bordeaux, A. Galarneau, F. Fajula, J. Drone, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2123 – 2127; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2075 – 2079.
[38] F. E. Zilly, J. P. Acevedo, W. Augustyniak, A. Deege, U. W. Häusig, M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2772 – 2776; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2720 – 2724.
[39] P. Battioni, J. P. Renaud, J. F. Bartoli, M. Reina-Artiles, M. Fort, D. Mansuy, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8462 – 8470.
[40] A. Thellend, P. Battioni, D. Mansuy, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1035.
[41] A. B. Sorokin, E. V. Kudrik, L. X. Alvarez, P. Afanasiev, J. M. M. Millet, D. Bouchu, *Catal. Today* **2010**, *157*, 149 – 154.
[42] K. Kamata, K. Yonehara, Y. Nakagawa, K. Uehara, N. Mizuno, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 478 – 483.
[43] J. M. Thomas, R. Raja, G. Sankar, R. G. Bell, *Nature* **1999**, *398*, 227 – 230.
[44] M. H. Groothaert, P. J. Smeets, B. F. Sels, P. A. Jacobs, R. A. Schoonheydt, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1394 – 1395.
[45] I. E. Staijen, V. Hatzimanikatis, B. Witholt, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *244*, 462 – 470.
[46] J. N. Baptist, R. K. Gholson, M. J. Coon, *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, *69*, 40 – 47.
[47] A. Tani, T. Ishige, Y. Sakai, N. Kato, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 1819 – 1823.
[48] L. G. Whyte, T. H. M. Smits, D. Labbe, B. Witholt, C. W. Greer, J. B. van Beilen, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 5933 – 5942.
[49] M. M. Marín, L. Yuste, F. Rojo, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 3232 – 3237.
[50] J. B. van Beilen, T. H. M. Smits, L. G. Whyte, S. Schorcht, M. Röthlisberger, T. Plaggemeier, K.-H. Engesser, B. Witholt, *Environ. Microbiol.* **2002**, *4*, 676 – 682.
[51] J. B. van Beilen, M. M. Marin, T. H. M. Smits, M. Rothlisberger, A. G. Franchini, B. Witholt, F. Rojo, *Environ. Microbiol.* **2004**, *6*, 264 – 273.
[52] T. Fujii, T. Narikawa, K. Takeda, J. Kato, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 2171 – 2177.
[53] M. Throne-Holst, S. Markussen, A. Winnberg, T. E. Ellingsen, H.-K. Kotlar, S. B. Zotchev, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *72*, 353 – 360.
[54] K. Kloos, J. C. Munch, M. Schloter, *J. Microbiol. Methods* **2006**, *66*, 486 – 496.
[55] I. E. Staijen, J. B. van Beilen, B. Witholt, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1957 – 1965.
[56] Ref. [45].
[57] G. Eggink, R. G. Lageveen, B. Altenburg, B. Witholt, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17712 – 17718.
[58] R. Bernhardt, *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 128 – 145.
[59] G. Grogan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 241 – 248.
[60] M. Sono, M. P. Roach, E. D. Coulter, J. H. Dawson, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2841 – 2888.
[61] B. Meunier, S. P. de Visser, S. Shaik, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3947 – 3980.
[62] J. T. Groves, *J. Chem. Educ.* **1985**, *62*, 928 – 931.
[63] F. Ogliaro, N. Harris, S. Cohen, M. Filatov, S. P. de Visser, S. Shaik, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8977 – 8989.
[64] J. Rittle, M. T. Green, *Science* **2010**, *330*, 933 – 937.
[65] S. Shaik, W. Lai, H. Chen, Y. Wang, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 1154 – 1165.
[66] S. Shaik, S. Cohen, Y. Wang, H. Chen, D. Kumar, W. Thiel, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 949 – 1017.
[67] T. Maier, H. H. Förster, O. Asperger, U. Hahn, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *286*, 652 – 658.
[68] E. G. Funhoff, U. Bauer, I. García-Rubio, B. Witholt, J. B. van Beilen, *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 5220 – 5227.
[69] J. B. van Beilen, E. G. Funhoff, A. V. Loon, A. Just, L. Kaysser, M. Bouza, M. Ro, Z. Li, B. Witholt, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 59 – 65.
[70] J. B. van Beilen, D. Lu, U. Bauer, B. Witholt, W. A. Duetz, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 1737 – 1744.
[71] R. Zhou, C. Huang, A. Zhang, S. G. Bell, W. Zhou, L.-L. Wong, *Acta Crystallogr. Sect. F* **2011**, *67*, 964 – 967.
[72] M. Kubota, M. Nodate, M. Yasumoto-Hirose, T. Uchiyama, O. Kagami, Y. Shizuri, N. Misawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 2421 – 2430.
[73] S. G. Bell, L.-L. Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *360*, 666 – 672.
[74] R. N. Austin, D. Deng, Y. Jiang, K. Luddy, J. B. van Beilen, P. R. Ortiz de Montellano, J. T. Groves, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 8372 – 8374; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 8192 – 8194.
[75] D. J. Koch, M. M. Chen, J. B. van Beilen, F. H. Arnold, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *75*, 337 – 344.
[76] D. H. Anh, R. Ullrich, D. Benndorf, A. Svatos, A. Muck, M. Hofrichter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *73*, 5477 – 5485.
[77] E. Aranda, M. Kinne, M. Kluge, R. Ullrich, M. Hofrichter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *82*, 1057 – 1066.
[78] M. Hofrichter, R. Ullrich, M. J. Pecyna, C. Liers, T. Lundell, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 871 – 897.
[79] M. Kinne, M. Poraj-Kobielska, S. A. Ralph, R. Ullrich, M. Hofrichter, K. E. Hammel, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 29343 – 29349.

© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

[80] M. J. Pecyna, R. Ullrich, B. Bittner, A. Clemens, K. Scheibner, R. Schubert, M. Hofrichter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 885 – 897.
[81] R. Ullrich, J. Nüske, K. Scheibner, J. Spantzel, M. Hofrichter, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 4575 – 4581.
[82] R. Ullrich, M. Hofrichter, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6247 – 6250.
[83] R. Ullrich, C. Liers, S. Schimpke, M. Hofrichter, *Biotechnol. J.* **2009**, *4*, 1619 – 1626.
[84] D. R. Morris, L. P. Hager, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 1763 – 1768.
[85] L. Wang, Y. Tang, S. Wang, R.-L. Liu, M.-Z. Liu, Y. Zhang, F.-L. Liang, L. Feng, *Extremophiles* **2006**, *10*, 347 – 356.
[86] L. Feng, W. Wang, J. Cheng, Y. Ren, G. Zhao, C. Gao, Y. Tang, X. Liu, W. Han, X. Peng, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 5602 – 5607.
[87] L. Li, X. Liu, W. Yang, F. Xu, W. Wang, L. Feng, M. Bartlam, L. Wang, Z. Rao, *J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 453 – 465.
[88] R. Mathys, A. Schmid, B. Witholt, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *64*, 459 – 477.
[89] K. Piontek, R. Ullrich, C. Liers, K. Diederichs, D. A. Plattner, M. Hofrichter, *Acta Crystallogr. Sect. F* **2010**, *66*, 693 – 698.
[90] P. A. Dalby, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21*, 473 – 480.
[91] E. M. Brustad, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 201 – 210.
[92] M. T. Reetz, J. D. Carballeira, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 891 – 903.
[93] T. W. Johannes, H. Zhao, *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, *9*, 261 – 267.
[94] V. G. H. Eijsink, S. Gåseidnes, T. V. Borchert, B. van den Burg, *Biomol. Eng.* **2005**, *22*, 21 – 30.
[95] E. G. Hibbert, F. Baganz, H. C. Hailes, J. M. Ward, G. J. Lye, J. M. Woodley, P. A. Dalby, *Biomol. Eng.* **2005**, *22*, 11 – 19.
[96] B. Höcker, *Biomol. Eng.* **2005**, *22*, 31 – 38.
[97] J.-L. Jestin, S. Vichier-Guerre, *Res. Microbiol.* **2005**, *156*, 961 – 969.
[98] N. E. Labrou, *Biomol. Eng.* **2005**, *22*, vii-ix.
[99] L. G. Otten, W. J. Quax, *Biomol. Eng.* **2005**, *22*, 1 – 9.
[100] C. Roodveldt, A. Aharoni, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 50 – 56.
[101] L. Yuan, I. Kurek, J. English, R. Keenan, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2005**, *69*, 373 – 392.
[102] L. O. Narhi, A. J. Fulco, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 6683 – 6690.
[103] L. O. Narhi, A. J. Fulco, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 7160 – 7169.
[104] E. T. Farinas, U. Schwaneberg, A. Glieder, F. H. Arnold, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 601 – 606.
[105] A. Glieder, E. T. Farinas, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1135 – 1139.
[106] M. W. Peters, P. Meinhold, A. Glieder, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13442 – 13443.
[107] P. Meinhold, M. W. Peters, A. Hartwick, A. R. Hernandez, F. H. Arnold, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 763 – 772.
[108] P. C. Cirino, F. H. Arnold, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3421 – 3423; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3299 – 3301.
[109] M. Haniu, K. T. Yasunobus, I. C. Gunsalusg, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 12657 – 12663.
[110] M. Haniu, L. G. Armes, C. Gunsalusg, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 12664 – 12671.
[111] B. P. Unger, I. C. Gunsalus, S. G. Sligar, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 1158 – 1163.
[112] J.-A. Stevenson, A. C. G. Westlake, C. Whittock, L.-L. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12846 – 12847.
[113] J.-A. Stevenson, J. K. Bearpark, L.-L. Wong, *New J. Chem.* **1998**, *22*, 551 – 552.
[114] S. G. Bell, J.-A. Stevenson, H. D. Boyd, S. Campbell, A. D. Riddle, E. L. Orton, L.-L. Wong, *Chem. Commun.* **2002**, 490 – 491.
[115] S. G. Bell, E. Orton, H. Boyd, J.-A. Stevenson, A. Riddle, S. Campbell, L.-L. Wong, *Dalton Trans.* **2003**, 2133 – 2140.
[116] A. W. Munro, H. M. Girvan, K. J. McLean, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2007**, *1770*, 345 – 359.
[117] M. Nodate, M. Kubota, N. Misawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *71*, 455 – 462.
[118] M. S. Shet, C. W. Fisher, P. L. Holmans, R. W. Estabrook, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 11748 – 11752.
[119] S. Li, L. M. Podust, D. H. Sherman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12940 – 12941.
[120] S. Fuziwara, I. Sagami, E. Rozhkova, D. Craig, M. A. Noble, A. W. Munro, S. K. Chapman, T. Shimizu, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 515 – 526.
[121] O. Sibbesen, J. J. D. Voss, P. R. Ortiz de Montellano, *Biochemistry* **1996**, *271*, 22462 – 22469.
[122] Ref. [11].
[123] D. E. Torres Pazmiño, R. Snajdrova, B.-J. Baas, M. Ghobrial, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2307 – 2310; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2275 – 2278.
[124] V. B. Urlacher, M. Girhard, *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 26 – 36.
[125] D.-S. Lee, A. Yamada, H. Sugimoto, I. Matsunaga, H. Ogura, K. Ichihara, S.-I. Adachi, S.-Y. Park, Y. Shiro, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 9761 – 9767.
[126] I. Matsunaga, T. Sumimoto, M. Ayata, H. Ogura, *FEBS Lett.* **2002**, *528*, 90 – 94.
[127] O. Shoji, T. Fujishiro, H. Nakajima, M. Kim, S. Nagano, Y. Shiro, Y. Watanabe, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3730 – 3733; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3656 – 3659.
[128] N. Kawakami, O. Shoji, Y. Watanabe, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5427 – 5430; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5315 – 5318.
[129] M. V. Kirillova, A. M. Kirillov, P. M. Reis, J. A. L. Silva, J. J. R. Frausto da Silva, A. J. L. Pombeiro, *J. Catal.* **2007**, *248*, 130 – 136.
[130] D. Mansuy, *C. R. Chim.* **2007**, *10*, 392 – 413.
[131] J. T. Groves, *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 434 – 447.
[132] M. Costas, *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2912 – 2932.
[133] J. T. Groves, P. R. Ortiz de Montellano, *Chem. Rev.* **2005**, *110*, 949 – 1017.
[134] C. Kim, K. Chen, J. Kim, L. J. Que, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5964 – 5965.
[135] A. B. Sorokin, E. V. Kudrik, D. Bouchu, *Chem. Commun.* **2008**, 2562 – 2564.
[136] D. A. Summerville, I. A. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1747 – 1752.
[137] L. A. Bottomley, J. N. Gorce, V. L. Goedken, C. Ercolani, *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 3733 – 3737.
[138] A. B. Sorokin, E. V. Kudrik, *Catal. Today* **2011**, *159*, 37 – 46.
[139] M. M. Abu-Omar, A. Loaiza, N. Hontzeas, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2227 – 2252.
[140] M. Costas, K. Chen, L. J. Que, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *200 – 202*, 517 – 544.
[141] K. Chen, L. J. Que, *Chem. Commun.* **1999**, 1375 – 1376.
[142] Y. Mekmouche, C. Toia-Duboc, M. Fontecave, J.-B. Galey, C. Lebrun, J. Pe, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 975 – 978; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 949 – 952.
[143] G. J. P. Britovsek, J. England, A. J. P. White, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 8125 – 8134.
[144] K. Chen, L. J. Que, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6327 – 6337.
[145] J. Kaizer, E. J. Klinker, N. Y. Oh, J.-U. Rohde, W. J. Song, A. Stubna, J. Kim, E. Münck, W. Nam, L. Que, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 472 – 473.
[146] A. Bassan, M. R. A. Blomberg, P. E. M. Siegbahn, L. Que, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 692 – 705.
[147] A. Company, L. Gómez, M. Güell, X. Ribas, J. M. Luis, L. Que, M. Costas, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15766 – 15767.
[148] G. Guisado-Barrios, A. Slawin, D. Richens, *J. Coord. Chem.* **2010**, *63*, 2642 – 2658.
[149] C. L. Hill, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1 – 2.
[150] Special issue on polyoxometalates, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1 – 390.

 © 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers!

[151] N. Mizuno, K. Kamata, K. Yamaguchi, *Catal. Today* **2012**, *185*, 157 – 161.
[152] R. Gounder, E. Iglesia, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1958 – 1971.
[153] B. Zhan, B. Moden, J. Dakka, J. Santiesteban, E. Iglesia, *J. Catal.* **2007**, *245*, 316 – 325.
[154] J. M. Thomas, R. Raja, G. Sankar, R. G. Bell, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 191 – 200.
[155] M. Hartmann, L. Kevan, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 635 – 664.
[156] R. Raja, J. M. Thomas, *Chem. Commun.* **1998**, 1841 – 1842.
[157] J. S. Woertink, P. J. Smeets, M. H. Groothaert, M. A. Vance, B. F. Sels, R. A. Schoonheydt, E. I. Solomon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 18908 – 18913.
[158] E. Notomista, A. Lahm, A. Di Donato, A. Tramontano, *J. Mol. Evol.* **2003**, *56*, 435 – 445.
[159] J. G. Leahy, P. J. Batchelor, S. M. Morcomb, *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 449 – 479.
[160] F. Cavani, J. H. Teles, *ChemSusChem* **2009**, *2*, 508 – 534.
[161] Z. Li, J. B. van Beilen, W. A. Duetz, A. Schmid, A. de Raadt, H. Griengl, B. Witholt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 136 – 144.
[162] J. B. van Beilen, W. A. Duetz, A. Schmid, B. Witholt, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 170 – 177.
[163] B. Bühler, I. Bollhalder, B. Hauer, B. Witholt, A. Schmid, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *82*, 833 – 842.
[164] B. Bühler, A. Schmid, *J. Biotechnol.* **2004**, *113*, 183 – 210.
[165] S. Staudt, C. A. Mueller, J. Marienhagen, C. Boeing, S. Buchholz, U. Schwaneberg, H. Groeger, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 186 – 190.
[166] S. A. Rothen, M. Sauer, B. Sonnleitner, B. Witholt, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *58*, 356 – 365.

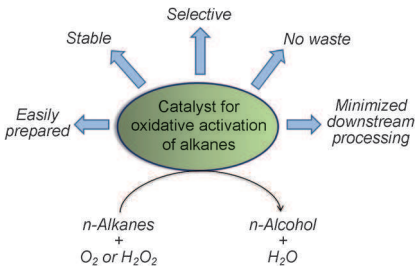
© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Minireviews

C–H Bond Activation

M. Bordeaux, A. Galarneau, J. Drone* ——— ■■■■–■■■■

Catalytic, Mild, and Selective Oxyfunctionalization of Linear Alkanes: Current Challenges



Seeking ideality: Intensive efforts have been invested into the discovery and/or engineering of a range of catalysts, ideally meeting the criteria shown in the picture, for the oxidative C–H bond activation of linear alkanes. The comparison between chemical and enzymatic catalysts for alkane oxyfunctionalization is an extremely useful strategy to gain insights into the fundamental mechanisms of this chemistry.

© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers!