

Les enzymes pour la formation stéréospécifique de la liaison carbone-carbone

Laurence Hecquet, Colette Demuyne et Jean Bolte

Summary Enzymes in the stereospecific formation of carbone-carbone bound

The high regio- and stereoselectivity and catalytic efficiency make enzymes especially useful for the synthesis of complex, highly functionalized molecules. This paper presents the main families of enzymes (aldolases, transferases or TPP ligases) used for the synthesis of monosaccharide analogues and related structures.

Mots-clés Enzymes, aldolases, transcétolase, décarboxylases, déshydrogénases, synthèses chimio-enzymatiques, monosaccharides.

Key-words Enzymes, aldolases, transketolase, decarboxylases, dehydrogenases, chemo-enzymatic synthesis, monosaccharides.

Le contrôle de la configuration des centres asymétriques créés lors de la synthèse des molécules est un objectif majeur en chimie organique. Parmi les avantages souvent cités des enzymes par rapport à d'autres catalyseurs (régiosélectivité, conditions douces de réaction...), la stéréospécificité est la qualité principale qui les fera rechercher lors de la création des liaisons carbone-carbone. Toutes les enzymes qui interviennent lors de la biosynthèse des produits naturels sont susceptibles d'être utilisables. Cependant, à ce jour, seul un petit nombre d'entre elles a fait l'objet d'applications.

Pour être utilisable en synthèse organique, une enzyme doit répondre à certains critères : elle doit présenter une grande spécificité dans la réaction qu'elle catalyse, mais accepter un grand nombre de substrats ; il vaut mieux qu'elle ne dépende pas d'un coenzyme difficile à fournir, tel que le phosphoénolpyruvate (PEP), l'adénosine triphosphate (ATP), ou l'acétyl-coenzyme A ; mais surtout, il faut qu'elle soit accessible en grande quantité. La difficulté à remplir ces conditions a retardé l'étude de beaucoup d'enzymes *a priori* intéressantes, notamment celles qui interviennent dans le métabolisme secondaire pour la biosynthèse des terpènes, stéroïdes, alcaloïdes et certains antibiotiques. Dans les toutes dernières années cependant, grâce à la banalisation des techniques de biologie moléculaire, de nouvelles enzymes apparaissent dans les synthèses : le clonage d'un gène permet d'accéder à l'enzyme en abondance, et les techniques de mutagenèse permettent d'étendre son champ d'application ou d'augmenter sa stabilité, y compris en présence de solvants organiques.

C'est dans la chimie des sucres, où la multifonctionnalité des molécules constitue un défi majeur, que les enzymes ont été le plus utilisées pour la formation de liaisons C-C. Elles catalysent des réactions d'addition nucléophile sur des aldéhydes. Ce sont souvent des aldolases, appartenant à la classe des lyases, des transférases ou des ligases à pyrophosphate de thiamine. Dans cette mini revue, destinée

à sensibiliser les chimistes organiciens à l'intérêt des enzymes en synthèse, nous ne parlerons que de ces enzymes [1].

Les DHAP aldolases [1]

Les aldolases catalysent l'addition d'une cétone (le donneur), ici le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) sur un aldéhyde (l'accepteur). On classe les aldolases en deux groupes selon leur mécanisme d'action. Les aldolases de classe I, trouvées principalement chez les animaux et les plantes, activent le donneur en formant un intermédiaire covalent du type base de Schiff. Les aldolases de classe II contiennent dans le site actif un ion Zn^{++} qui va faciliter la formation d'un énolate sur le donneur (*figure 1*).

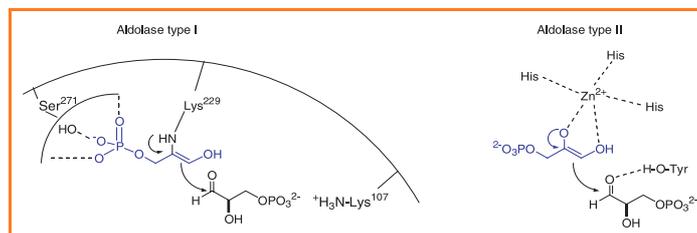


Figure 1 - Mécanisme d'action des aldolases de type I et II.

La DHAP aldolase la plus étudiée est la fructose-1,6-diphosphate aldolase (FDP aldolase). Elle intervient dans la glycolyse, où elle scinde le fructose diphosphate en deux unités à trois carbones, le dihydroxyacétone phosphate et le glycéraldéhyde phosphate, dans une réaction équilibrée. *In vitro*, l'équilibre est déplacé dans le sens de la condensation et l'enzyme contrôle la formation de la liaison C_3-C_4 , avec la stéréochimie 3*S*,4*R*. Trois autres stéréoisomères sont susceptibles de se former lors de cette condensation, et

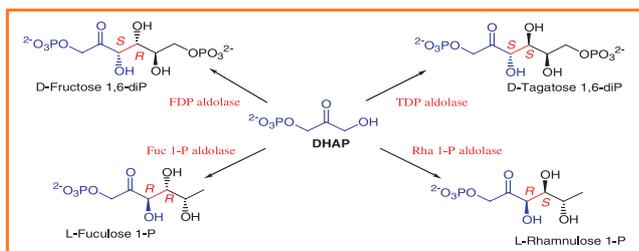


Figure 2 - Stéréospécificité des DHAP aldolases.

il existe une aldolase spécifique pour chaque configuration (figure 2).

La FDP aldolase commerciale est extraite du muscle de lapin et est souvent appelée RAMA (pour rabbit muscle aldolase) à l'instigation de G.M. Whitesides qui a signé en 1983, avec C.-H. Wong, les premiers articles démontrant l'intérêt synthétique de cette enzyme [2]. Ils ont montré que, si elle était relativement spécifique du substrat donneur, n'acceptant que de proches analogues du DHAP, elle acceptait en revanche de nombreux aldéhydes comme accepteurs.

Depuis lors, de très nombreux travaux ont été publiés sur la synthèse de composés plus ou moins reliés aux sucres, où une réaction enzymatique (catalysée par la RAMA) constitue l'étape clef qui détermine la stéréochimie (figure 3).

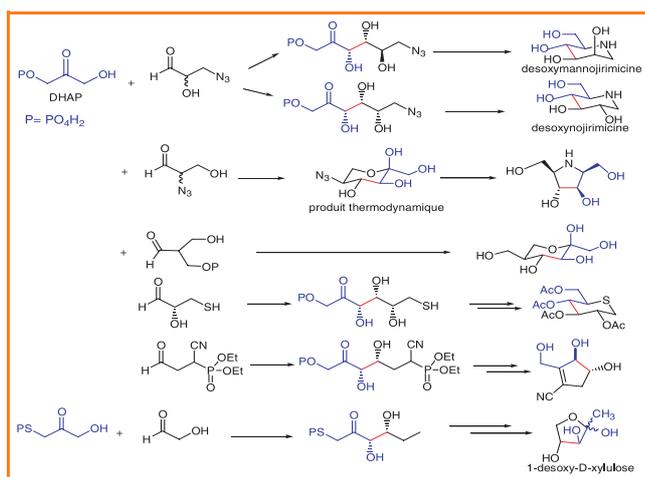


Figure 3 - Synthèses catalysées par la FDP aldolase.

D'autres FDP aldolases d'origine végétale ou microbienne ont été également proposées. La plus prometteuse est extraite de *Streptomyces carnosus* (voir encadré 1). Deux autres DHAP aldolases, la rhamnulose-1-phosphate et la fucose-1-phosphate aldolase ont aussi fait l'objet de travaux. Ces aldolases d'origine microbienne sont difficiles à produire à partir des souches sauvages, de sorte que leur utilisation n'a vraiment commencé qu'après qu'elles aient été clonées et surexprimées.

Pour utiliser ces enzymes, il faut disposer du DHAP. Or ce composé, très instable, doit être préparé au laboratoire au moment de son utilisation. Depuis la synthèse originale de Colbran en 1967, différentes améliorations ont été proposées. Nous avons nous-mêmes proposé une méthode à partir de la dibromoacétone. Il est aussi possible d'accéder au DHAP par une méthode enzymatique où le L-glycérol phosphate est oxydé en DHAP par la glycérol phosphate oxydase.

Encadré 1

La fructose-1,6-bisphosphate aldolase du muscle de lapin (RAMA pour « rabbit muscle aldolase ») et celle de *Streptomyces carnosus*

De très nombreuses synthèses ont été réalisées avec la RAMA. Cependant, la relative instabilité de cette enzyme et son intolérance à l'ajout de co-solvants organiques s'opposent à son utilisation pour des applications à grande échelle. Dans cet objectif, l'enzyme de choix pourrait être l'aldolase de *Streptomyces carnosus*. Bien que d'origine bactérienne, cette enzyme est une aldolase de classe I, comme la RAMA. Elle présente des caractéristiques voisines de cette dernière en termes de stéréospécificité et de spécificité de substrat, mais montre une exceptionnelle stabilité dans les conditions habituelles de synthèse. Le gène de la fructose-1,6-bisphosphate aldolase de *S. carnosus* a été cloné dans *Escherichia coli*. La souche recombinante surexprime l'aldolase d'un facteur 50 par rapport à *S. carnosus*. L'aldolase représente alors 25 % des protéines totales. Dans ces conditions, l'enzyme est facilement purifiée et un fermenteur de 10 litres permet de produire environ 30 000 unités, soit la quantité suffisante pour transformer 14,6 kg de fructose-1,6-bisphosphate par jour.

(Zannetti M.T., Walter C., Knorst M., Fessner W.-D., *Chem. Eur. J.*, 1999, 5, p. 1882).

Quelques exemples de composés obtenus grâce à une DHAP aldolase sont présentés dans la figure 4. Parmi eux, on trouve de nombreux iminocyclitols, recherchés comme inhibiteurs de glycosidases ou glycosyltransférases, enzymes impliquées dans diverses pathologies. Ces travaux ont été initiés par F. Effenberger et C.-H. Wong qui, en 1990 et 1991 respectivement, ont publié les premiers articles sur la synthèse de la déoxynojirimycine et la déoxymannoijirimycine, montrant que les DHAP aldolases offraient une des voies d'accès les plus efficaces vers ce type de composés.

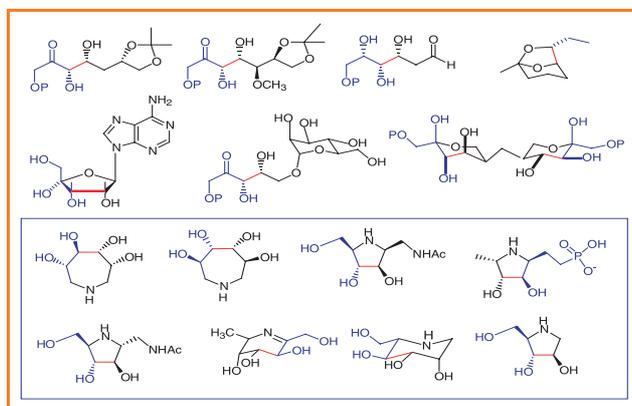


Figure 4 - Composés obtenus par utilisation d'une DHAP aldolase. Sont indiquées en bleu la sous-structure provenant du DHAP et en rouge, la liaison formée enzymatiquement.

Les pyruvate aldolases [3]

Les pyruvate aldolases (figure 5) ont été utilisées pour la synthèse d' α -cétoacides du type acide 2-oxo-3-désoxyulosonique (heptulosonique, DAH ; octulosonique, KDO ; nonulosonique, KDN ; ou acide N-acétylneuraminique, acide sialique). Ces enzymes fonctionnent *in vivo* dans le sens de la dégradation, alors que les phosphoenolpyruvate aldolases (classe des ligases) qui conduisent aux mêmes composés sont impliquées dans leur biosynthèse. Présentant une

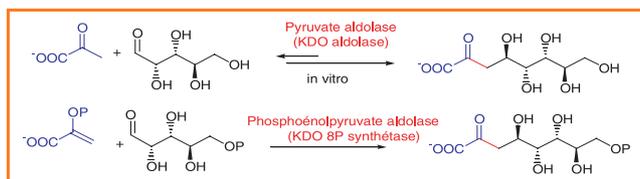


Figure 5 - Réactions d'aldolisation mettant en jeu le pyruvate.

spécificité de substrat plus étroite, ces dernières sont moins utilisées.

La N-acétylneuraminique acide aldolase (acide sialique aldolase), commerciale, a été la première étudiée. Comme la plupart des aldolases, elle est très spécifique pour le substrat donneur (ici le pyruvate) et accepte un assez grand nombre d'aldéhydes. La première synthèse enzymatique de l'acide sialique a été réalisée par S. David et C. Augé en 1984. D'autres synthèses ainsi que celles d'analogues ont été publiées [4] (figure 6). Curieusement, la stéréospécificité de cette enzyme dépend du substrat aldéhydique : lorsque celui-ci présente en C3 la configuration S du substrat naturel, l'attaque du carbonyle se fait sur la face *si*, conduisant à un nouveau centre asymétrique de configuration S ; alors que dans le cas inverse, l'attaque se fait sur la face *re*.

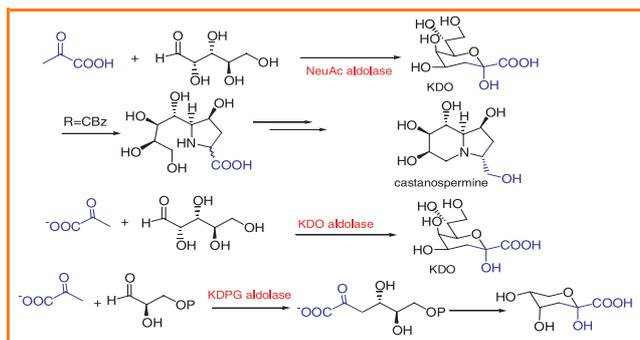


Figure 6 - Réactions catalysées par les pyruvate aldolases.

La KDO aldolase conduit à des acides ulosoniques de configuration 4*R*, par réaction avec son substrat naturel, le D-arabinose, mais aussi le D-ribose, le D-xylose, le D-lyxose, le L-arabinose (figure 6). Des cellules entières d'*Aspergillus terreus* ont été aussi utilisées à des fins préparatives. La KDGP aldolase qui possède la même stéréospécificité pour la création du nouveau centre asymétrique en C4 a également été proposée en synthèse organique.

Les enzymes à pyrophosphate de thiamine [9]

Les enzymes à pyrophosphate de thiamine (ThDP), telles que les α -cétolactate décarboxylases, la première sous-unité (E1) des complexes α -cétolactate déshydrogénase, les transcétolases, l'acétolactate synthase, catalysent à la fois la coupure et la formation de liaisons C-C.

Dans le sens de la condensation, ces réactions sont l'équivalent biologique des réactions de couplage d'aldéhydes catalysées par les sels de thiazolium. Le carbanion issu de la déprotonation du ThDP s'additionne sur le groupe carbonyle d'un α -cétolactate (décarboxylases, transcétolase), ou d'un cétole (transcétolase). Le carbanion formé après coupure de la liaison C-C peut se protoner (ce

qui conduira à un aldéhyde (réaction de décarboxylation)), être transféré sur une autre sous-unité (ce qui conduira ultérieurement à un acide - cas des complexes α -cétolactate déshydrogénase), ou s'additionner à un aldéhyde pour conduire à un cétole (ce qui est la réaction recherchée) (figure 7).

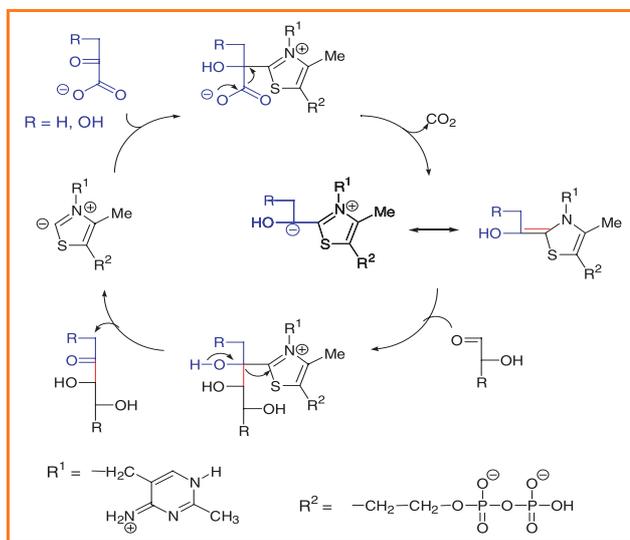


Figure 7 - Réaction catalysée par les enzymes à pyrophosphate de thiamine.

Il est intéressant de remarquer que pour les décarboxylases, la protonation est la réaction biologique « normale », et la formation du cétole apparaît comme une réaction parasite (elles sont donc classées parmi les lyases puisqu'il y a rupture d'une liaison C-C) ; alors que pour la transcétolase, bien qu'elle accepte comme substrat un α -cétolactate qui est décarboxylé (l'hydroxy-pyruvate), la rupture de la liaison C-C est suivie de la formation d'une nouvelle liaison C-C de sorte qu'elle est classée comme une transférase.

La transcétolase (TK)

Cette enzyme a fait l'objet de nombreuses applications au cours des quinze dernières années. Bien que son activité vis-à-vis de substrats non naturels (aldoses non phosphorylés) ait été indiquée dès 1955, nous avons proposé les premiers son utilisation pour la synthèse à l'échelle préparative de cétoles et analogues [7]. Nous avons souvent utilisé pour les synthèses l'enzyme extraite d'épinards, facile à isoler. L'enzyme de levure a aussi été utilisée, nous avons commencé à la produire au laboratoire après qu'elle ait été surexprimée. La transcétolase de *E. coli* a été également surexprimée et utilisée pour des applications synthétiques. La transcétolase catalyse le transfert d'un groupement hydroxyacétyle, provenant soit de l'hydroxypyruvate, soit d'un cétole, sur un α -hydroxyaldéhyde de configuration 2*R* (*in vivo* l'érythrose-4-phosphate), et conduit à des cétoles présentant la configuration 3*S*,4*R* qui est celle du fructose. Bien qu'elle conduise à des composés de même stéréochimie que la FDP aldolase, la transcétolase offre une alternative intéressante : pour accéder à un cétole donné à *n* carbones, la FDP aldolase demandera un aldéhyde à (*n*-3) carbones, et la TK un substrat à (*n*-2). En fonction de la facilité d'accès à ces aldéhydes et de l'activité des enzymes vis-à-vis de ces substrats particuliers, l'une ou l'autre des solutions sera préférée [8] (figure 8).

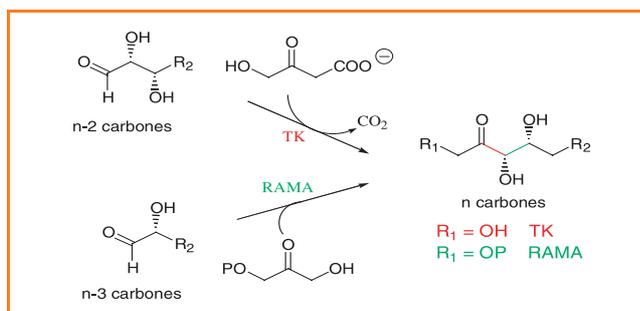


Figure 8 - Complémentarité de la transcétolase et de la fructose-1,6-diphosphate aldolase.

Quelques synthèses réalisées grâce à la TK sont reportées dans la figure 9. Pour ces synthèses, l'hydroxypyruvate est presque toujours utilisé de préférence à un cétose puisque la réaction devient alors irréversible. L'enzyme est énantiosélective vis-à-vis de l' α -hydroxyaldéhyde accepteur qui peut donc être fourni sous forme racémique et subir un dédoublement cinétique.

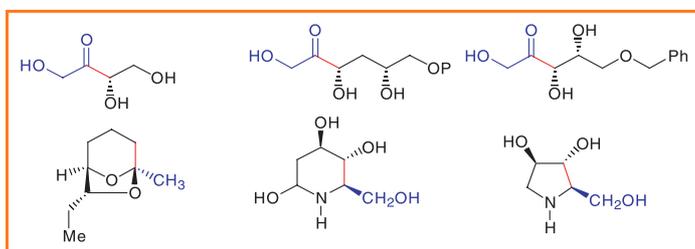


Figure 9 - Quelques exemples de composés synthétisés grâce à la transcétolase (TK).

Les α -cétoacides décarboxylases et déshydrogénases [6b]

La pyruvate décarboxylase a été l'enzyme la plus étudiée du point de vue synthétique. La formation de (R)-phénylacétylcarbinol à partir de benzaldéhyde et de glucose en présence de levure est une des plus anciennes réactions de bioconversion appliquées dans l'industrie, en l'occurrence pour la synthèse de l'éphédrine (figure 10). Cette réaction est en fait due au transfert d'un groupement acétyle, provenant de pyruvate produit au cours de la fermentation, sur le benzaldéhyde, réaction catalysée par la pyruvate décarboxylase. De nombreux travaux visant à augmenter la production de phénylacétylcarbinol ont été publiés (voir encadré 2). D'autres aldéhydes aromatiques que le benzaldéhyde sont également substrats dans cette réaction

Explorer la biodiversité pour trouver de nouveaux catalyseurs

Le développement des méthodes de criblage pour trouver de nouveaux micro-organismes, la banalisation des techniques de biologie moléculaire qui facilitent la production d'enzymes peu (ou pas) exprimées chez certains organismes, ou présentant une faible activité spécifique, ainsi que les avancées sur la connaissance du génome de différentes espèces vont permettre à de nouvelles enzymes d'émerger comme catalyseurs utiles en synthèse organique.

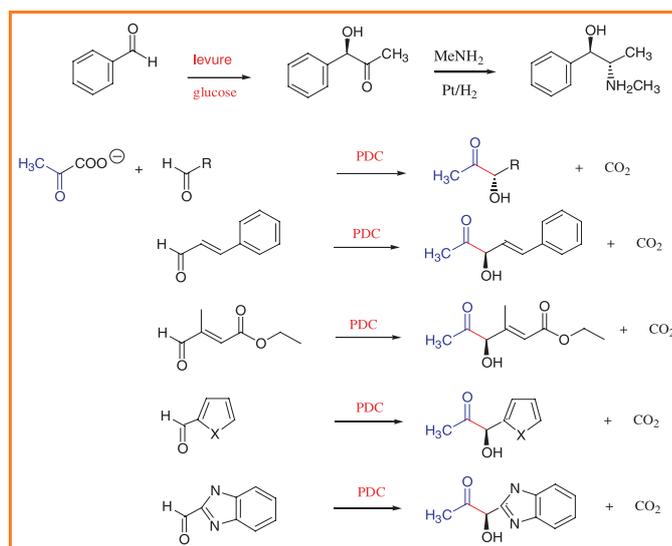


Figure 10 - Exemples de réactions catalysées par la pyruvate décarboxylase.

Encadré 2

L'amélioration de la synthèse du (R)-phénylacétylcarbinol, précurseur de l'éphédrine, par mutagenèse dirigée de la pyruvate décarboxylase (PDC) de *Zymomonas mobilis*

La levure de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*) a été largement utilisée pour catalyser cette réaction. Cependant, la présence d'autres enzymes, et notamment d'alcool déshydrogénases dans la levure, conduit à la formation de sous-produits indésirables. L'utilisation de PDC purifiée présente donc un avantage. La PDC a été isolée de nombreuses sources : levures, champignons, bactéries ou plantes. L'enzyme de *Zymomonas mobilis* offre beaucoup d'avantages en termes de stabilité et d'activité. Cependant, elle est moins performante que celle de *S. cerevisiae* pour l'activité ligase. Une étude comparée des structures des deux enzymes a montré que le site 392 est occupé par une alanine dans la PDC de *S. cerevisiae* et par un tryptophane dans celle de *Z. mobilis*. La mutation du résidu tryptophane 392 par une alanine ou une isoleucine augmente d'un facteur 4 l'activité carboligase, sans diminuer l'activité catalytique de l'enzyme ni sa stabilité.

(Idin H., Siebert P., Mesch K, Pohl. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, 1385, p. 307).

Deux exemples très récents de la littérature nous paraissent représentatifs (figure 11).

Il y a quelques années, les groupes de M. Rohmer et H. Sahn ont montré que le 1-désoxyxylulose-5-phosphate

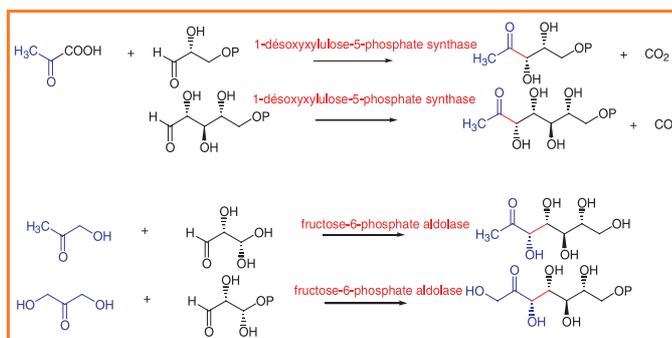
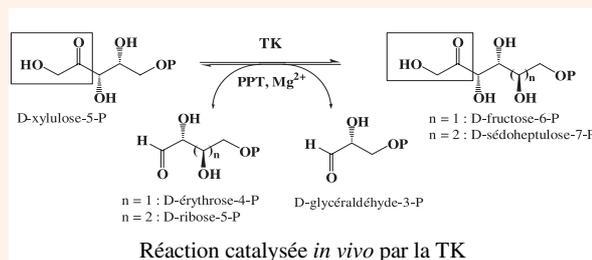
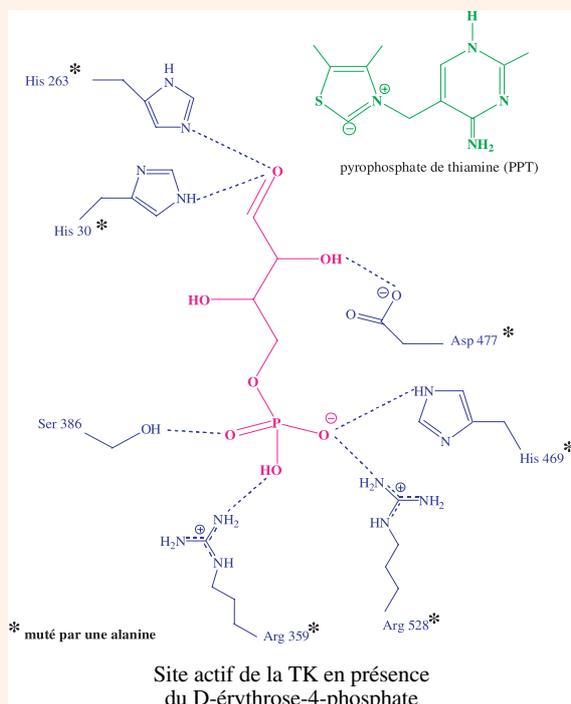


Figure 11 - Nouvelles possibilités offertes par les enzymes, désoxyxylulose phosphate synthase et fructose-6-phosphate aldolase.

Encadré 3

Mutagenèse dirigée sur la transcétolase : étude du site actif



La TK a été co-cristallisée avec un substrat accepteur, le D-érythrose-4-phosphate. Les données cristallographiques et les études réalisées par mutagenèse dirigée ont permis d'établir des interactions entre le site actif et ce substrat. Les constantes cinétiques ont été déterminées en présence de l'enzyme sauvage et des enzymes mutées par une alanine dans les positions indiquées*. Dans le cas de l'Asp 477, les études indiquent que cet acide aminé contrôle l'énantiosélectivité vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (R). De plus, les résidus qui interagissent avec le groupement phosphate confèrent au site actif une certaine flexibilité : les substrats à 2 ou 3 carbones sont stabilisés par la Ser 386 et l'His 469, les substrats à 4 carbones ou plus par les résidus Arg 359 et surtout Arg 528.

(Nilsson U., Hecquet L., Gefflaut T., Guérard C., Schneider G., *FEBS Lett.*, **1998**, 424, p. 49 ; Hecquet L., Demuyneck C., Schneider G., Bolte J., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2001**, 11, p. 207).

était le précurseur de l'isopentényl pyrophosphate chez plusieurs organismes qui n'utilisaient donc pas la voie de l'acide mévalonique [9]. En étudiant cette nouvelle voie, G.A. Sprenger et son équipe ont détecté chez *E. coli* une nouvelle enzyme qui catalyse la formation de 1-désoxy-cétooses (dont le 1-désoxyxylulose-5-phosphate), à partir du pyruvate et d'un aldose. Cette synthétase est une enzyme à thiamine pyrophosphate et suit un mécanisme identique à celui de la transcétolase [10].

Plus récemment, la même équipe a repéré dans le génome de *E. coli* une séquence non exprimée et présentant une importante analogie avec le gène de la transaldolase. Ayant cloné et exprimé ce gène, ils ont mis en évidence une nouvelle activité enzymatique, de type fructose-6-phosphate aldolase, qui permet la condensation réversible de la dihydroxyacétone sur le glycéraldéhyde-3-phosphate. L'étude de cette enzyme est en cours, elle pourrait devenir un sérieux concurrent de la FDP aldolase [11].

Augmenter la spécificité de substrat d'une enzyme par mutagenèse [12]

L'établissement de la structure cristalline d'une enzyme permet de connaître tous les acides aminés présents dans le site actif, et donc d'avancer une hypothèse sur leur rôle dans la formation du complexe enzyme-substrat et dans la réaction elle-même. Le remplacement par mutagenèse dirigée d'un résidu particulier par un autre est maintenant devenu une opération quasi routinière en biologie moléculaire. Il est alors possible par cette technique de tenter de modifier la nature de la réaction catalysée, la stéréospécificité de la réaction, ou la spécificité du substrat.

La transcétolase de levure, avec laquelle nous travaillons, a été cristallisée et sa structure déterminée par G. Schneider et

coll. Dans cette structure, il apparaît que le résidu Asp 477 pouvait être lié au groupe hydroxyle en position 2 de l'aldéhyde accepteur et donc être responsable de l'énantiosélectivité de l'enzyme pour les substrats de configuration 2R (encadré 3). La suppression de cette interaction pouvait alors permettre à l'enzyme d'accepter aussi des substrats de configuration 2S et donc de catalyser la synthèse de cétooses de configuration 3S,4S (configuration du tagatose). La mutation de l'Asp 477 en Ala a été réalisée, et a confirmé notre hypothèse. L'enzyme a effectivement perdu son énantiosélectivité, mais son efficacité a été diminuée d'un facteur 100, ce qui limite beaucoup son intérêt pour des applications synthétiques.

Une telle perte d'activité est très souvent observée lors des expériences de mutagenèse dirigée. La raison est que la mutation, si elle a bien la conséquence recherchée, entraîne aussi d'autres modifications difficiles à prévoir et qui ont un effet négatif sur la catalyse. En fait, la plupart des modifications qui entraînent une amélioration de l'efficacité de l'enzyme dans une application particulière ont été obtenues par mutagenèse aléatoire par la méthode dite d'évolution dirigée [12]. Dans cette technique, une mutagenèse aléatoire concernant 1 ou 2 nucléotides est effectuée *in vitro* sur le gène de l'enzyme. Les gènes mutés étant introduits dans des cellules de *E. coli*, on obtient une banque de clones qui vont exprimer la protéine modifiée. On effectue sur cette banque un criblage qui permet de retenir la souche qui exprime l'enzyme présentant l'activité enzymatique recherchée. Ce mutant va être soumis à un nouveau cycle de mutation, et ainsi de suite jusqu'à obtenir une activité enzymatique satisfaisante.

Cette méthode est performante si l'on dispose d'un crible efficace pour sélectionner les clones recherchés parmi plusieurs dizaines de milliers qui sont obtenus à

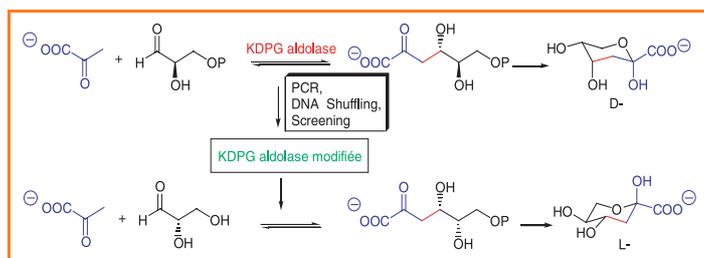


Figure 12 - Inversion de l'énantiosélectivité de la KDPG aldolase par évolution dirigée.

chaque génération. Elle a été récemment appliquée à une pyruvate aldolase [13], la 2-oxo-3-déoxy-D-phosphogluconate aldolase (KDPG aldolase) qui est très spécifique du D-glycéraldéhyde phosphate et, après mutation, accepte le L-glycéraldéhyde, conduisant ainsi à des sucres de la série L (figure 12).

Conclusion

Au cours des 20 dernières années, les enzymes sont apparues comme l'un des outils incontournables de la synthèse organique pour l'obtention de molécules chirales, et des résultats très importants ont été acquis pour la formation des liaisons carbone-carbone. Les chimistes ont su exploiter la stéréospecificité des enzymes qui leur étaient accessibles et se sont ingénies à élargir leur champ d'application en proposant de nouveaux analogues de leurs

substrats naturels. Les avancées les plus spectaculaires ont été liées, non pas tant aux progrès de la biologie moléculaire, qu'à la prise en compte par nos laboratoires des concepts et des techniques développés par cette discipline. On peut penser que de cette interdisciplinarité naîtront des applications nouvelles, non seulement au laboratoire, mais aussi pour des applications industrielles.

Références

- [1] Revues sur la formation enzymatique de liaisons C-C : a) Machajewski T.D., Wong C.-H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, p. 1352 ; b) Wymer N., Toone E.J., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, *39*, p. 1352.
- [2] Wong C.-H., Whitesides G.M., *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, p. 3199.
- [3] Revue sur les pyruvates aldolases : Augé C., Gautheron-Le Narvor C., *Preparative Carbohydrate Chemistry*, S. Hanessian éd., Dekker New York, **1997**, p. 469.
- [4] Fitz W., Schwark J.R., Wong C.-H., *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, p. 3663 et références citées.
- [5] Henderson D.P., Cotterill I.C., Shelton M.C., Toone E.J., *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, p. 906.
- [6] Revues sur les enzymes à pyrophosphate de thiamine : a) Sprenger G.A., Pohl M., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **1999**, p. 145 ; b) Iding H., Siebert P., Mesch K., Pohl M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, *1385*, p. 307.
- [7] Bolte J., Demuynck C., Samaki H., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, p. 5085.
- [8] André C., Demuynck C., Gefflaut T., Guérard C., Hecquet L., Lemaire M., Bolte J., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **1998**, *5*, p. 113.
- [9] Rohmer M., Seemann M., Horbach S., Bringer-Meyer S., Sahm H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, p. 2564.
- [10] Taylor S.V., Vu L.D., Begley T.P., Schörken U., Grolle S., Sprenger G.A., Bringer-Meyer S., Sahm H., *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, p. 2375.
- [11] Schürmann M., Sprenger G.A., *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, p. 11055.
- [12] Revues sur la mutagenèse et l'évolution dirigée des enzymes : a) Arnold F.E., *Acc. Chem. Res.*, **1998**, *31*, p. 125 ; b) Bornschener V.T., Pohl M., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2001**, *5*, p. 137.
- [13] Fong S., Machajewski T.D., Mak C.C., Wong C.-H., *Chem. Biol.*, **2000**, *7*, p. 873.



L. Hecquet

Laurence Hecquet, Colette Demuynck et Jean Bolte sont professeurs au Laboratoire Synthèse et étude de systèmes à intérêt biologique*.



J. Bolte



C. Demuynck

* Laboratoire Synthèse et étude de systèmes à intérêt biologique, Université Blaise Pascal-CNRS (UMR 6504), 63177 Aubière Cedex.
Tél. : 04 73 40 71 28. Fax : 04 73 40 77 17.
E-mail : jbolte@chisg1.univ-bpclermont.fr