



SIMULATIONS MOLÉCULAIRES APPLIQUÉES À L'ACÉTYLATION DE FLAVONOÏDES CATALYSÉE PAR DES LIPASES : INFLUENCE DES STRUCTURES DE LA LIPASE ET DU FLAVONOÏDE SUR LA RÉGIOSÉLECTIVITÉ DE LA BIOCONVERSION

thèse de

Eduardo Basilio DE OLIVEIRA

soutenue publiquement à l'INPL le

7 décembre 2009

réalisée sous la direction de

M. Jean-Marc ENGASSER, Prof. (LIBio, INPL, France)

Mme. Catherine HUMEAU, M.d.C. (LIBio, INPL, France)

M. Mohamed GHOU, Prof. (LIBio, INPL, France)

et avec la collaboration de

Mme. Elaine Rose MAIA, Prof. (LEEM, UnB, Brésil)

M. Bernard MAIGRET, D.R. (LORIA-CNRS, France)

STRUCTURE DE LA PRÉSENTATION

1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE

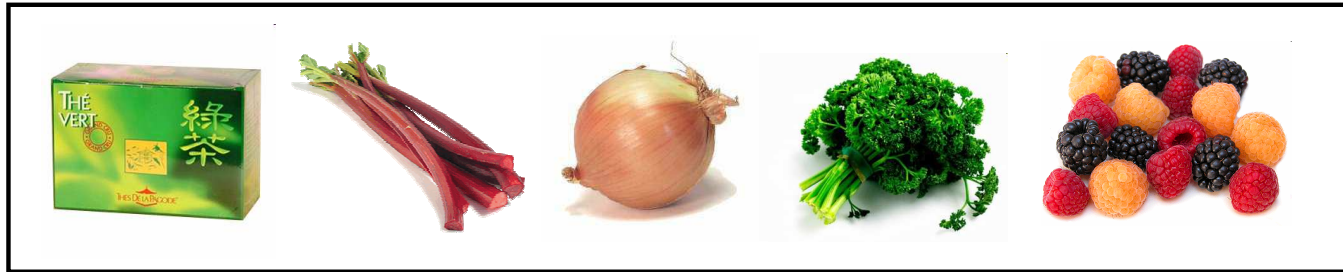
- DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES
- OBJECTIF GÉNÉRAL

2. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

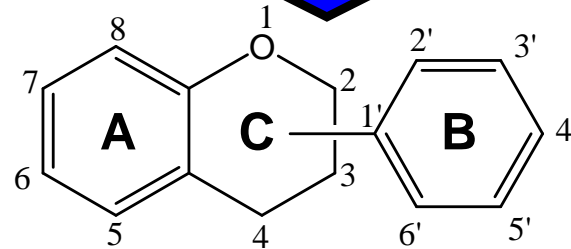
- OBTENTION DES STRUCTURES
- PROBLÉMATIQUE 1 : RÉGIOSÉLECTIVITÉ DU PROCÉDÉ
- PROBLÉMATIQUE 2 : SPÉCIFICITÉ ENZYMATIQUE
- PROBLÉMATIQUE 3 : RÉACTIVITÉ DES FLAVONOÏDES

3. CONCLUSIONS / PERSPECTIVES

DÉFINITION ET IMPORTANCE DES PROCÉDÉS ENZYMATIQUES D'ACYLATION DE FLAVONOÏDES



FLAVONOÏDE
DONNEUR D'ACYLE
ENZYME
SOLVANT

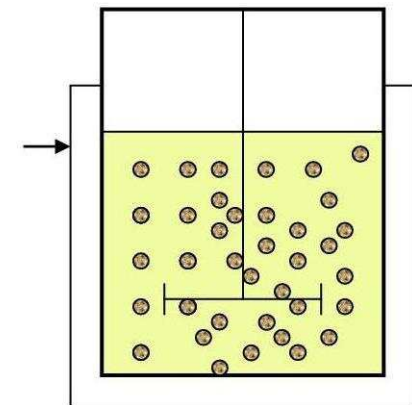


😊 De nombreuses activités biologiques bénéfiques.

☹️ Peu solubles et stables dans des milieux divers.

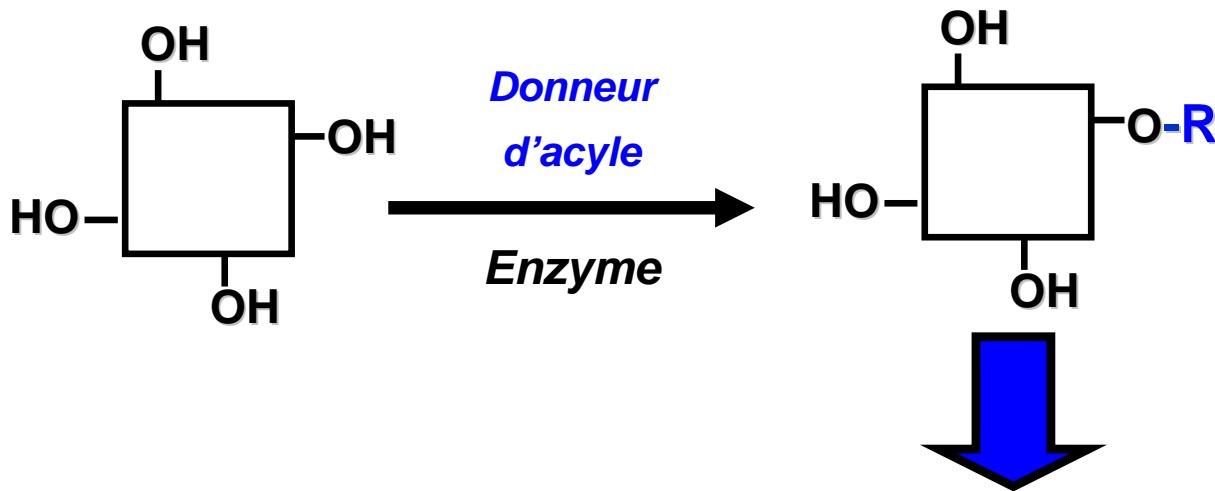
En fonction du nombre et de la disposition des OH libres.

Difficulté d'incorporation dans des formulations.



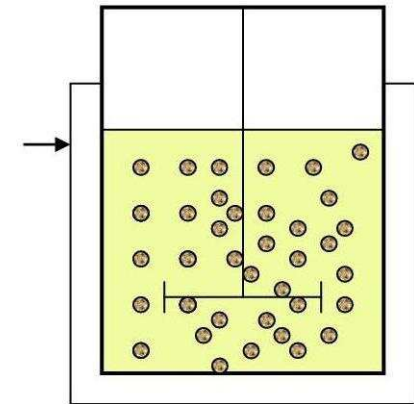
FLAVONOÏDE ACYLÉ
DE MANIÈRE
RÉGIOSÉLECTIVE

DÉFINITION ET IMPORTANCE DES PROCÉDÉS ENZYMATIQUES D'ACYLATION DE FLAVONOÏDES



FLAVONOÏDE
DONNEUR D'ACYLE
ENZYME
SOLVANT

- 😊 Dérivés acylés : plus stables et solubles dans des formulations à caractère hydrophobe.
- 😊 La plupart des OH restent intacts, conservant les propriétés biologiques.

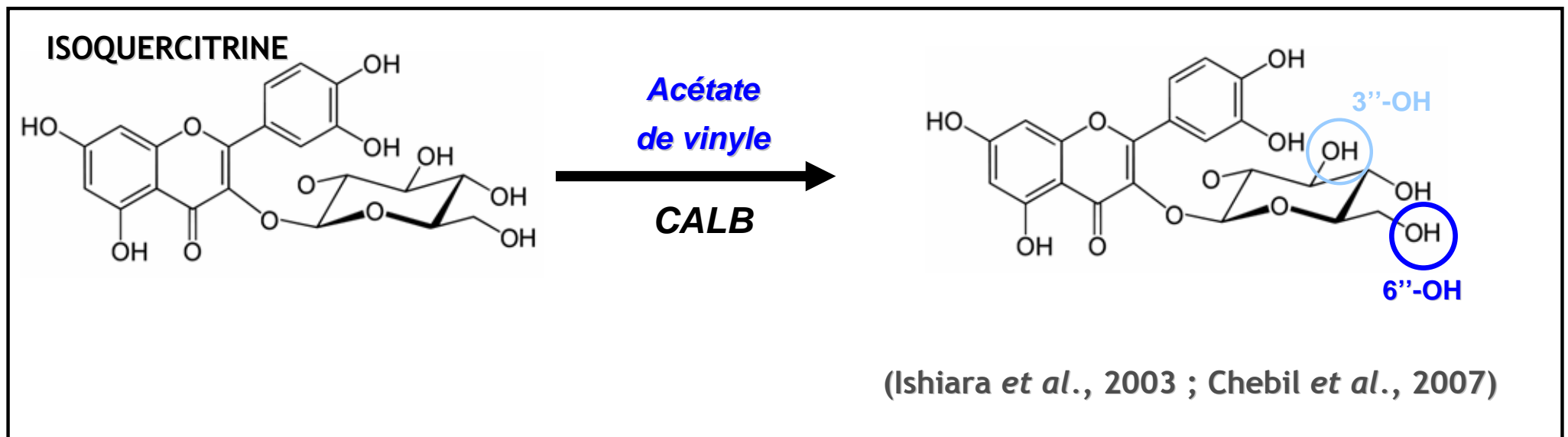
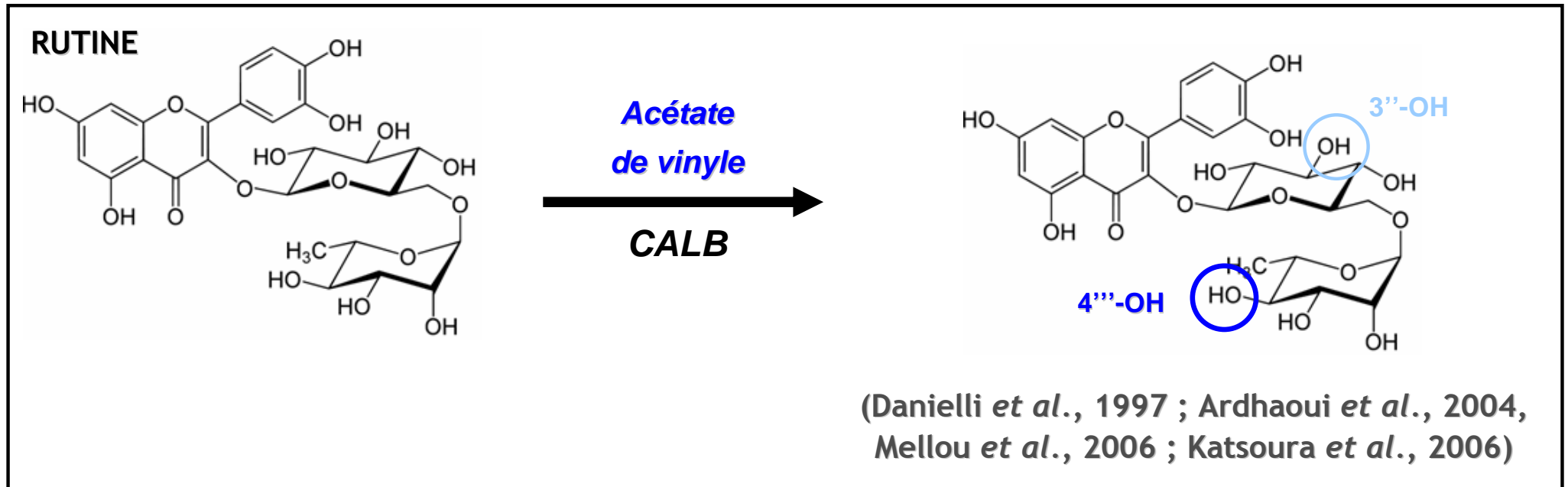


FLAVONOÏDE ACYLÉ
DE MANIÈRE
RÉGIOSÉLECTIVE

(R = chaîne acyle)

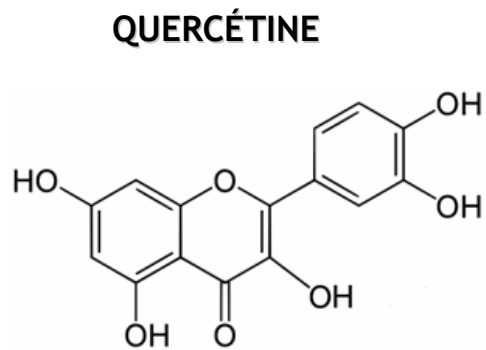
(Chebil *et al.*, 2006 ; Villneuve, 2007)

ACÉTYLATION DES FLAVONOÏDES GLYCOSILÉS RUTINE ET ISOQUERCITRINE



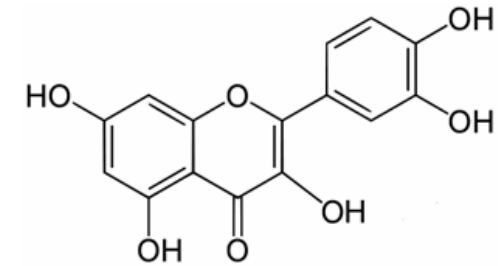
CALB = Lipase B de Candida antarctica

ACÉTYLATION DU FLAVONOÏDE AGLYCONE QUERCÉTINE



Acétate
de vinyle

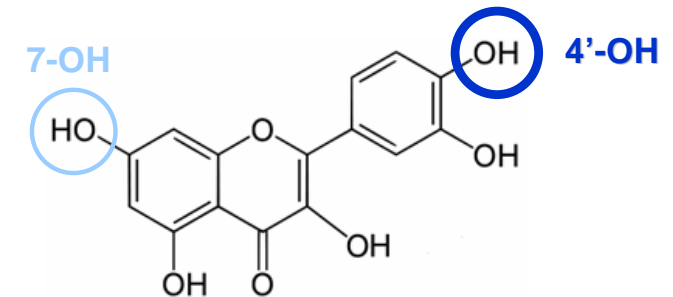
CALB



PAS DE PRODUIT DÉTECTÉ

(Ardhaoui *et al.*, 2004 ; Chebil *et al.*, 2007)

PCL

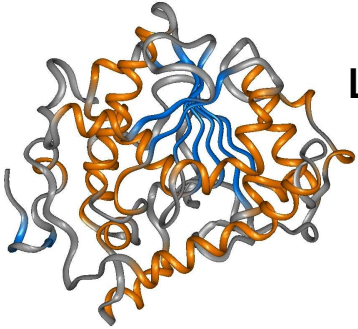


(Chebil *et al.*, 2007)

CALB = Lipase B de Candida antarctica / PCL = Lipase de Pseudomonas cepacia

LES LIPASES (EC 3.1.1.3)

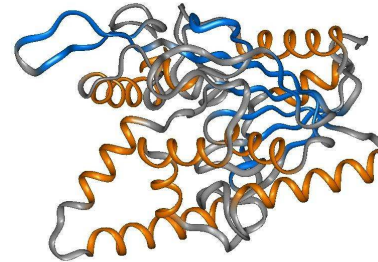
α/β -hydrolases (30-60 kDa)



Lipase B de Candida antarctica

ID PDB : 1LBS

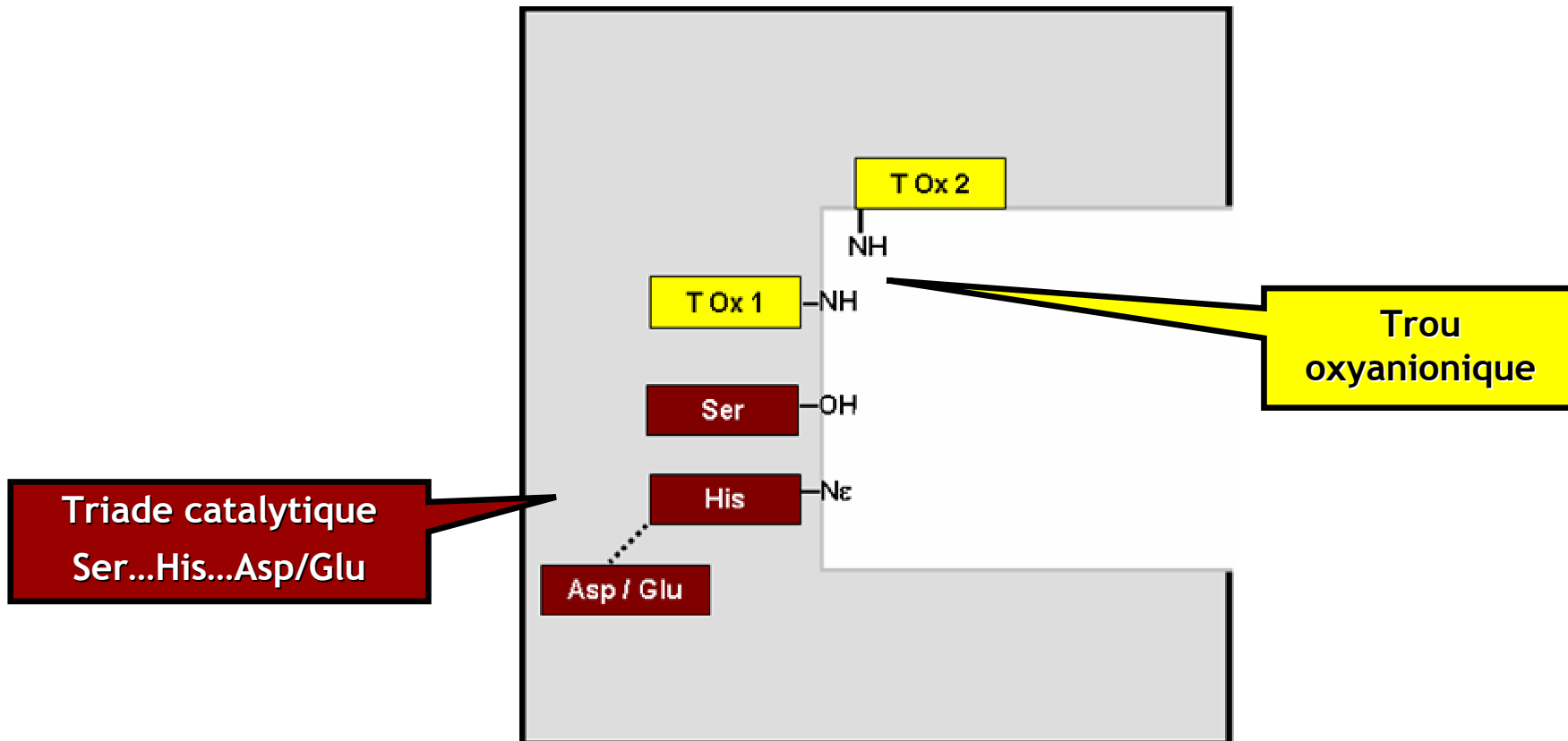
(Uppenberg *et al.*, 1994)



Lipase de Pseudomonas cepacia

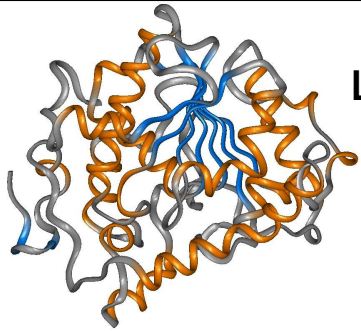
ID PDB : 3LIP

(Kim *et al.*, 1997)



LES LIPASES - CALB

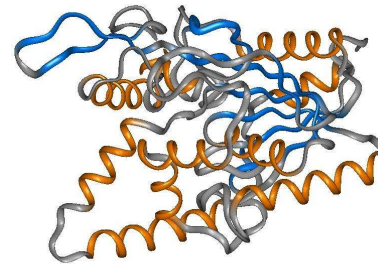
α/β -hydrolase



Lipase B de Candida antarctica

ID PDB : 1LBS

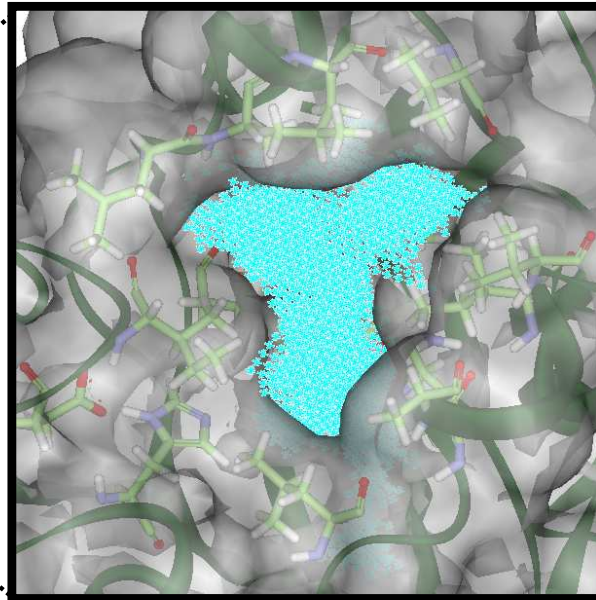
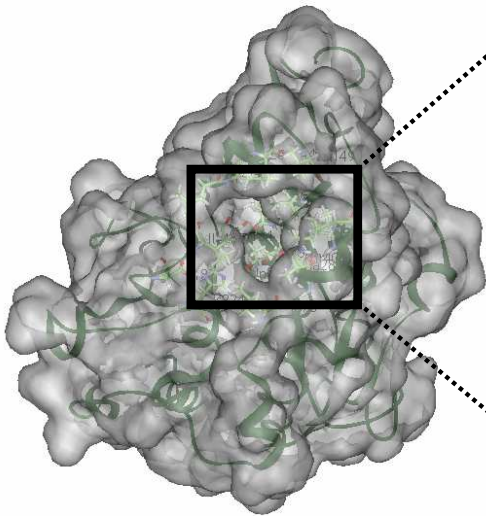
(Uppenberg *et al.*, 1994)



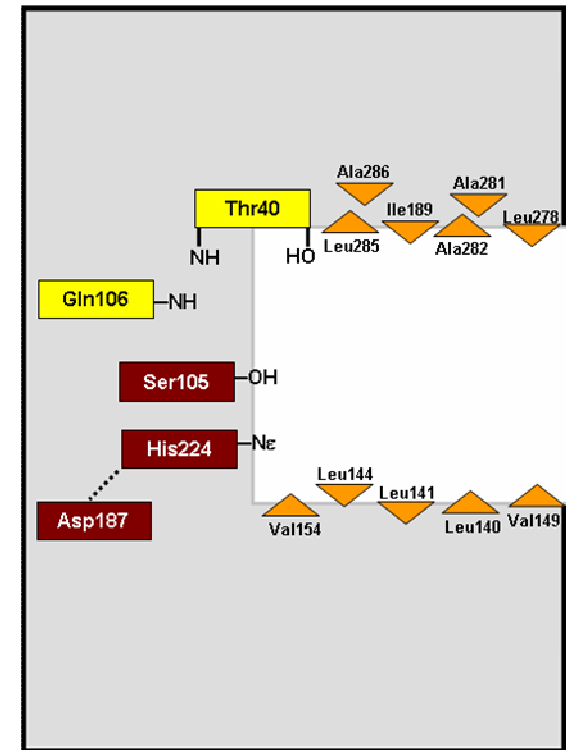
Lipase de Pseudomonas cepacia

ID PDB : 3LIP

(Kim *et al.*, 1997)



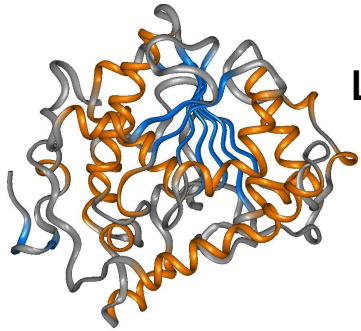
- Largeur max. : 10 Å
- Profondeur max. : 12 Å



Résidus **aliphatiques**
hydrophobes

LES LIPASES - PCL

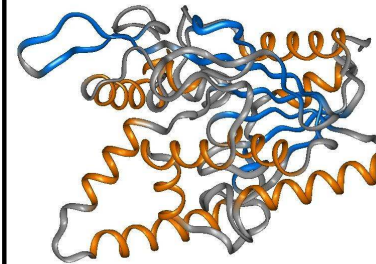
α/β -hydrolase



Lipase B de Candida antarctica

ID PDB : 1LBS

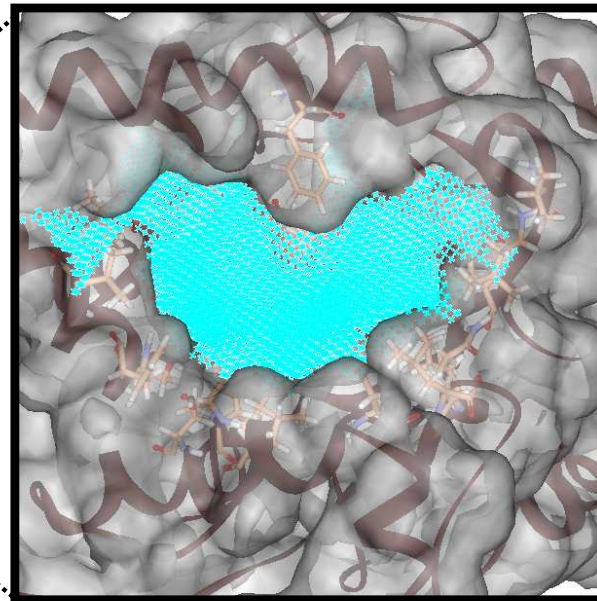
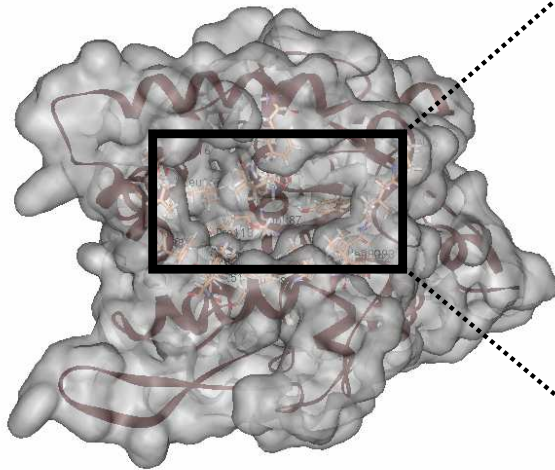
(Uppenberg *et al.*, 1994)



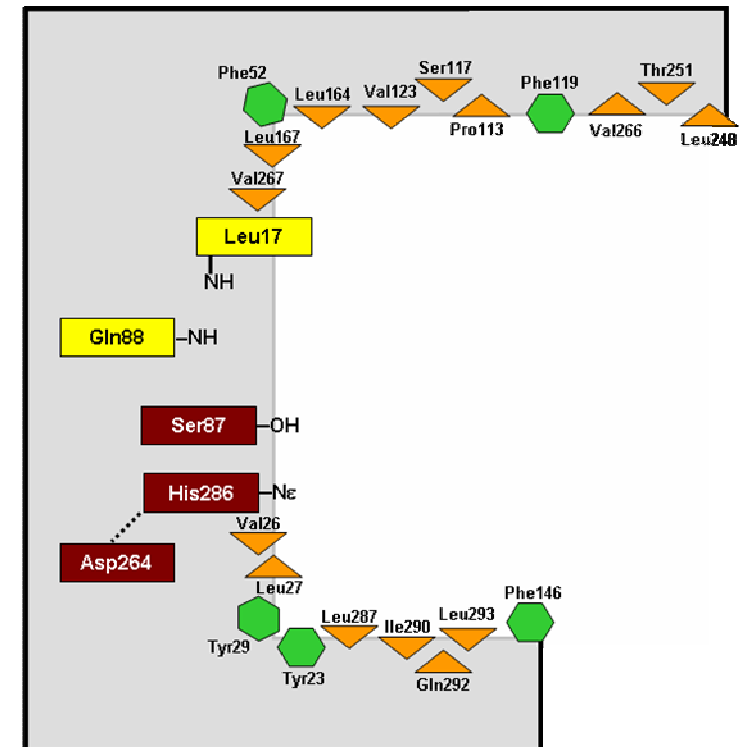
Lipase de Pseudomonas cepacia

ID PDB : 3LIP

(Kim *et al.*, 1997)

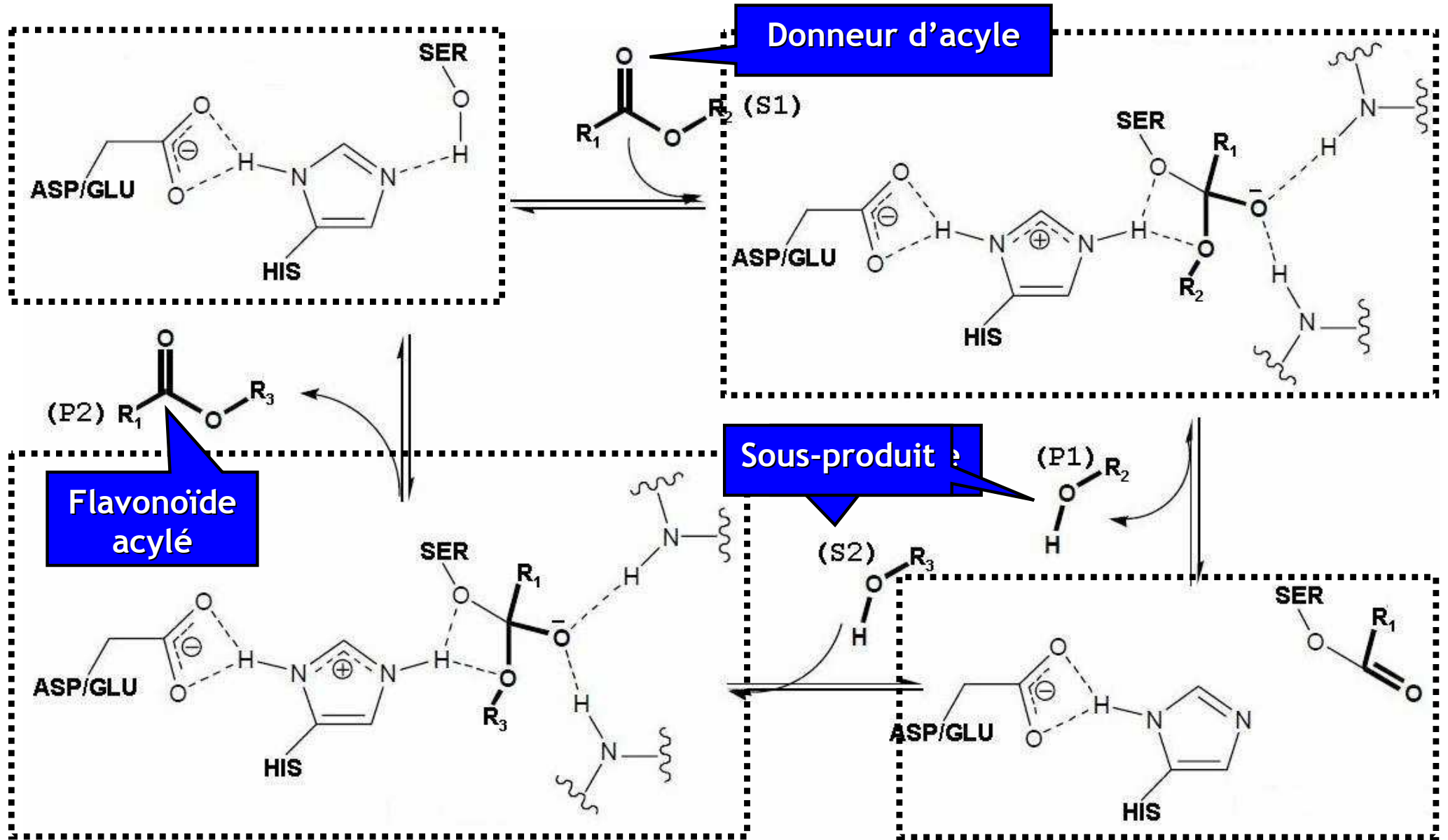


- Largeur max. : 17 Å
- Profondeur max. : 10 Å

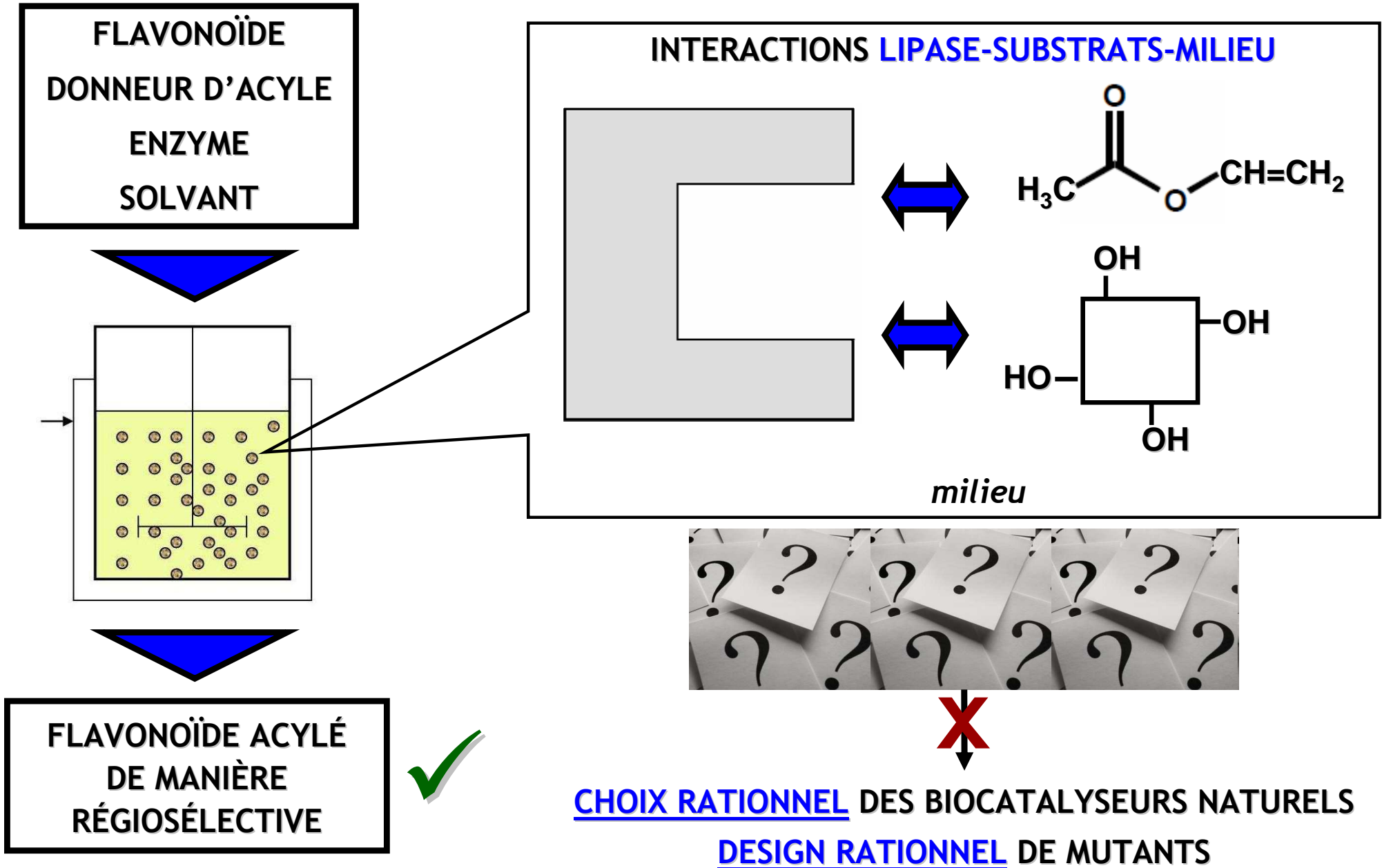


Résidus **aliphatiques**
hydrophobes et **aromatiques**

MÉCANISME CLASSIQUE DES LIPASES

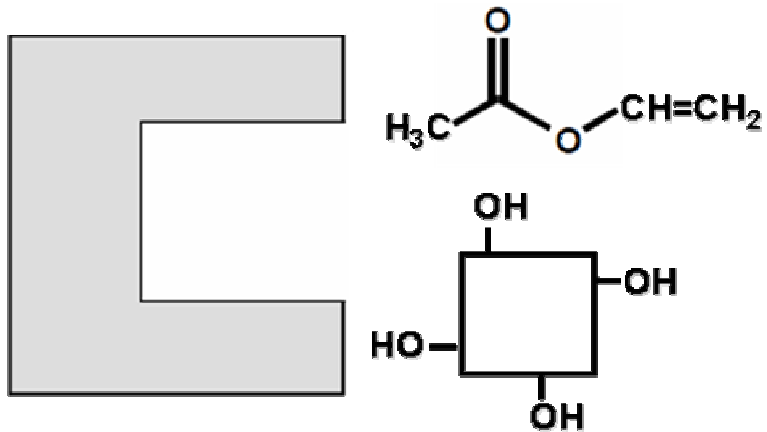


BASES MOLÉCULAIRES DE LA RÉGIOSÉLECTIVITÉ ET DE LA SPÉCIFICITÉ DES BIOPROCÉDÉS

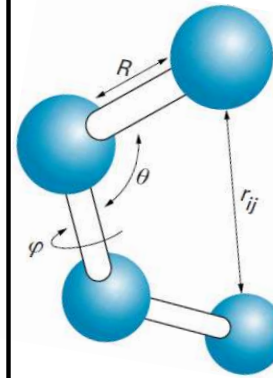


MODÉLISATION MOLÉCULAIRE

STRUCTURES DES PROTÉINES ET DES LIGANDS

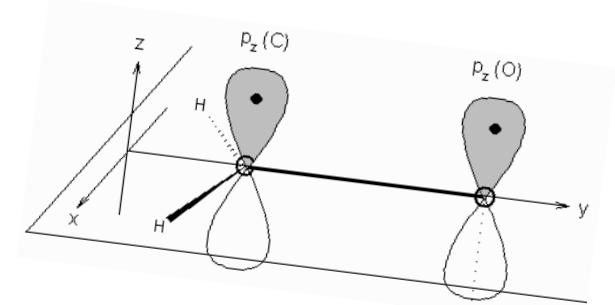


PHYSICO-CIMIE ET CHIMIE THÉORIQUE



$$V_{total} = f(R, \theta, \varphi, r_{ij})$$

$$H\psi = E\psi$$



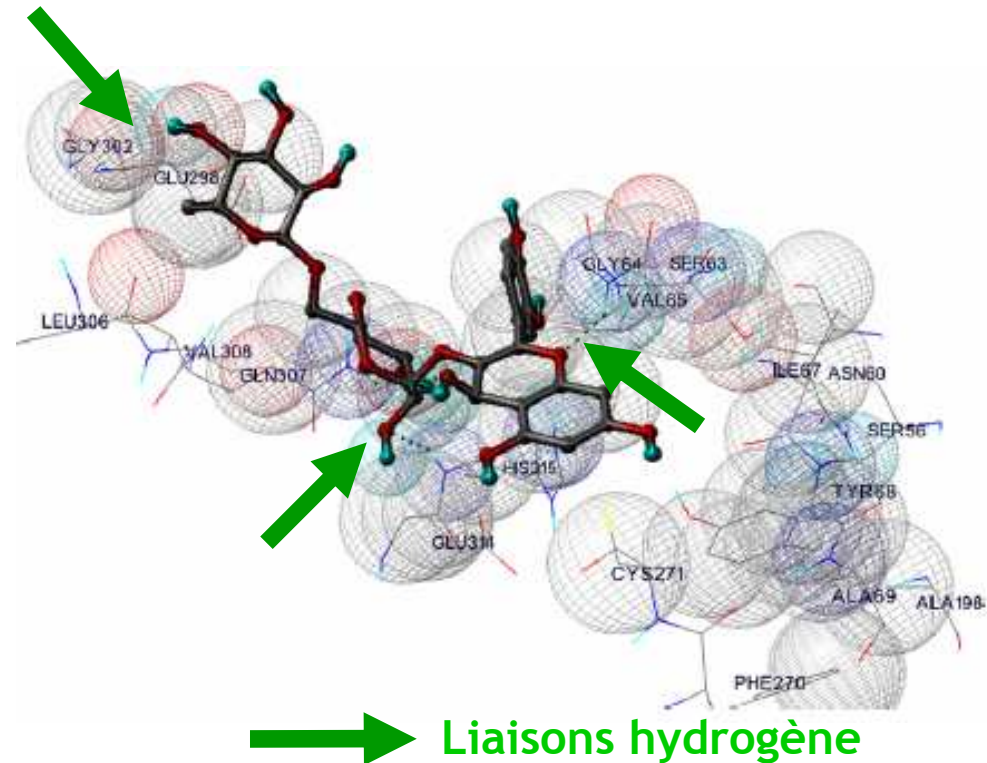
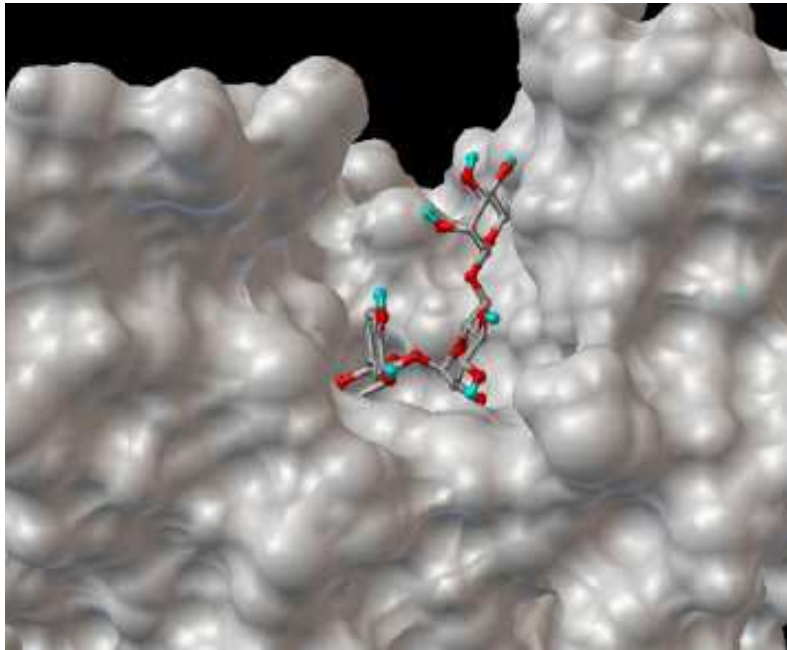
Mécanique moléculaire
Dynamique moléculaire
Calculs quantiques
Simulations de Docking



**COMPRENDRE, AU NIVEAU
MOLÉCULAIRE, LES MODES
D'INTERACTION
PROTÉINE-LIGAND**

Exemple 1 : INHIBITION D'UNE PROTÉINE PAR UN FLAVONOÏDE

INHIBITION DE LA PROTÉINE ARGININE-KINASE DES INSECTES PAR LE FLAVONOÏDE RUTINE

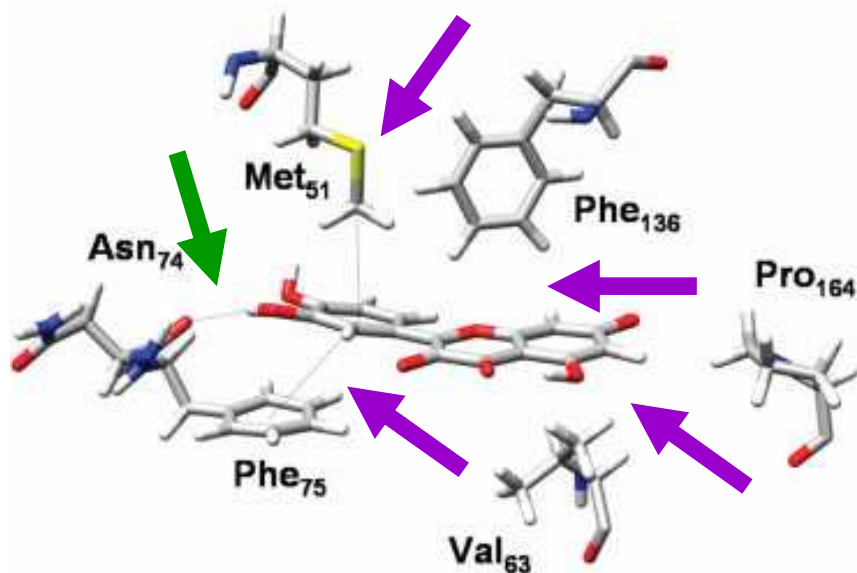


Proposition d'un mode
d'association favorable *via* des
simulations de DOCKING

(Wu *et al.*, 2009)

Exemple 2 : BIOCONVERSION ENZYMATIQUE D'UN FLAVONOÏDE

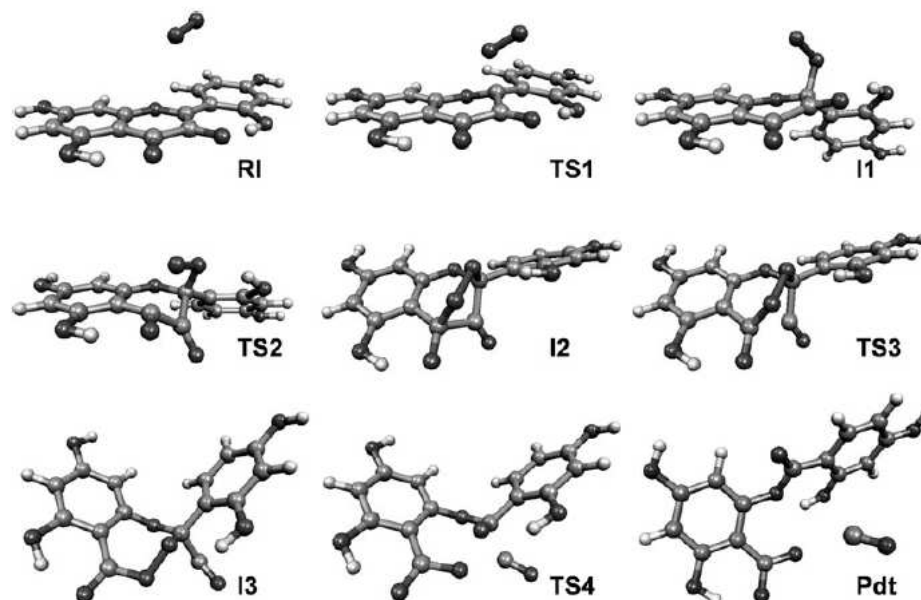
OXYGÉNOLYSE DU FLAVONOÏDE QUERCÉTINE PAR L'ENZYME 2,3-QUERCÉTINE-DIOXYGÉNASE



→ Liaisons hydrogène
→ Interactions hydrophobes

Évaluation des interactions et de la stabilité du complexe enzyme-flavonoïde *via* des simulations de DYNAMIQUE MOLECULAIRE

(Fiorucci *et al.*, 2006 et 2007)



Caractérisation électronique des états stationnaires et de transition *via* des simulations de CHIMIE QUANTIQUE

(Antonczak *et al.*, 2009)

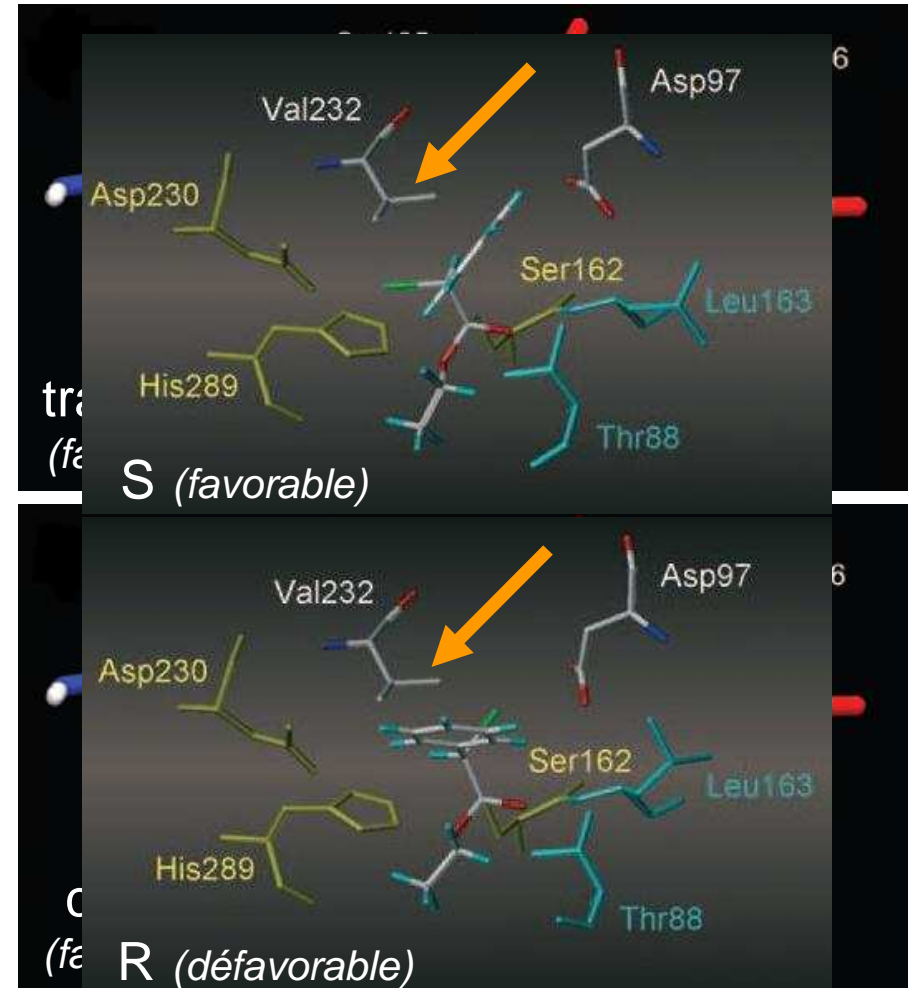
Exemple 3 : PROPRIÉTÉS DE SÉLECTIVITÉ DES LIPASES

ENANTIOSÉLECTIVITÉ / RÉGIOSÉLECTIVITÉ / SPÉCIFICITÉ / « PROMISCUITÉ »

(PROJET DE REVUE : De oliveira *et al.*, *Process Biochemistry*)

DISCRIMINATION DES STÉREOISOMÈRES
cis- ET *trans*- DE LA δ -VALÉROLACTONE
(δ -HL) PAR LA **LIPASE B DE CANDIDA**
ANTARCTICA (CALB)

RÉSOLUTION DES ÉNATIOMÈRES (R)-
ET (S)-2-BROMOPHÉNYLACÉTATE
D'ÉTYLE PAR LA **LIPASE DE**
YARROWIA **LIPOLYTICA** (YLL)



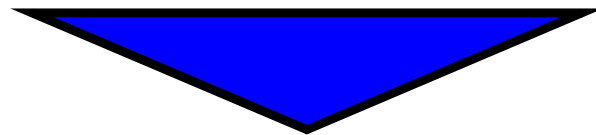
→ Liaisons H avec les résidus
→ V232 : discrimination entre R et S
du trou oxyanionique
(Bordes *et al.*, 2009)
(Veld *et al.*, 2009)

OBJECTIFS GÉNÉRAUX

Potentiel de la modélisation moléculaire

Connaissance expérimentale de la régiosélectivité

Disponibilité des structures 3D des lipases



**APPLIQUER DIFFÉRENTES APPROCHES DE SIMULATION MOLÉCULAIRE
POUR MIEUX COMPRENDRE COMMENT LES STRUCTURES DES FLAVONOÏDES
ET DES LIPASES INFLUENCENT LA SÉLECTIVITÉ DANS LA RÉACTION
D'ACÉTYLATION DE CES COMPOSÉS, CATALYSÉE PAR CES ENZYMES.**

STRUCTURE DE LA PRÉSENTATION

1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE

- DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES
- OBJECTIF GÉNÉRAL

2. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

- **OBTENTION DES STRUCTURES**
- **PROBLÉMATIQUE 1 : RÉGIOSÉLECTIVITÉ DU PROCÉDÉ**
- **PROBLÉMATIQUE 2 : SPÉCIFICITÉ ENZYMATIQUE**
- **PROBLÉMATIQUE 3 : RÉACTIVITÉ DES FLAVONOÏDES**

3. CONCLUSIONS / PERSPECTIVES

MÉTHODOLOGIE

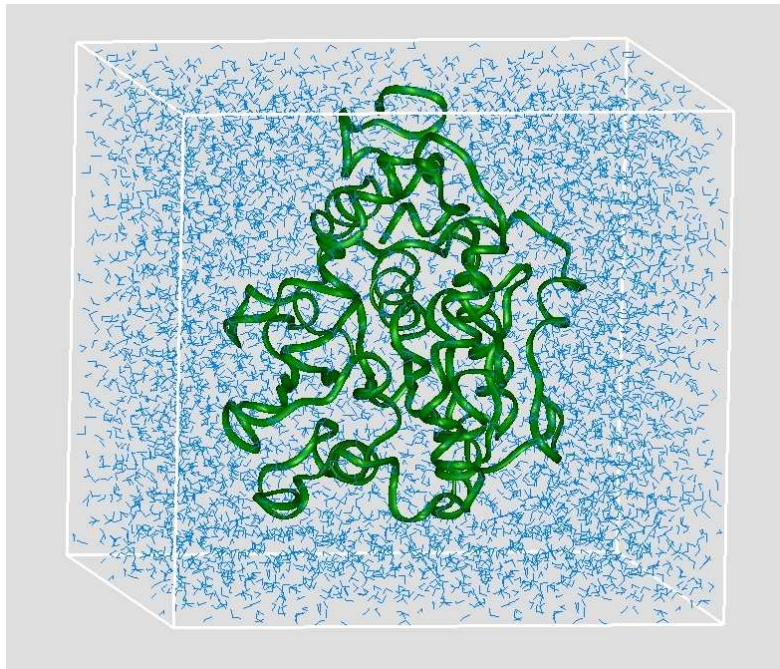
Structures des
LIPASES sur la PDB

Construction des
boîtes d'eau

Procédure de
relaxation

CALB - ID PDB : 1LBS
(Uppenberg *et al.*, 1994)
PCL - ID PDB : 3LIP
(Kim *et al.*, 1994)

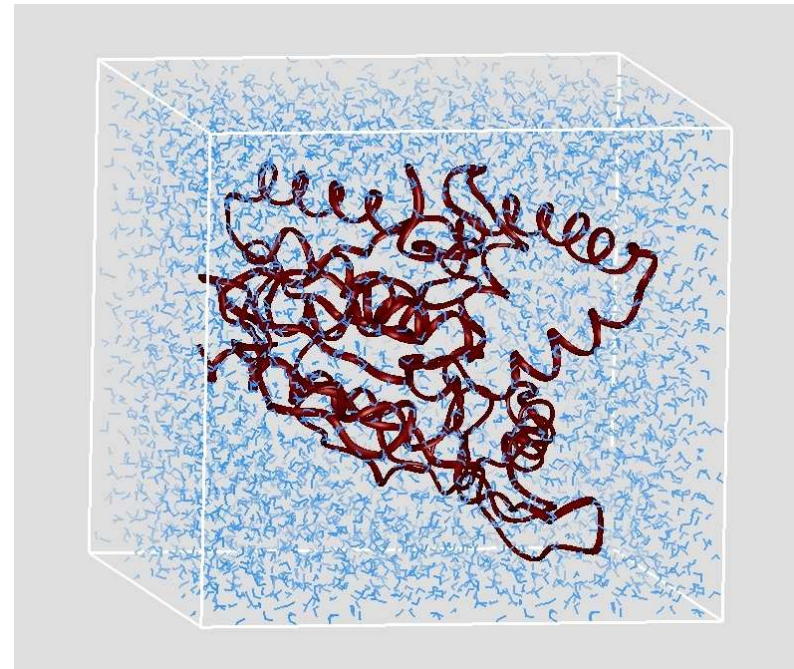
(Mackay *et al.*, 1990)



CALB

64 Å x 59 Å x 63 Å

6145 molécules d'eau



PCL

60 Å x 56 Å x 630 Å

4873 molécules d'eau

MÉTHODOLOGIE

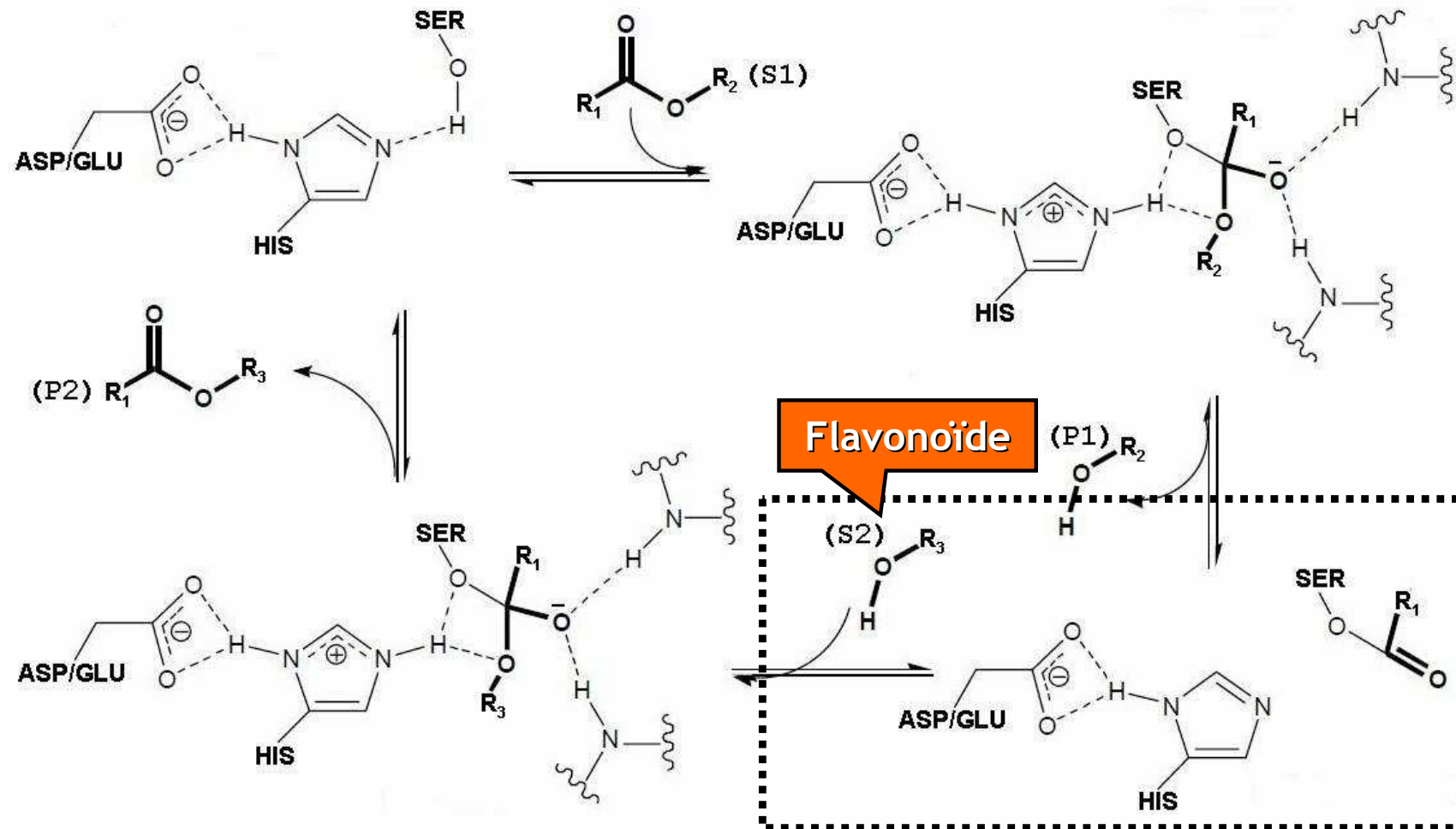
Structures des
LIPASES sur la PDB

Construction des
boîtes d'eau

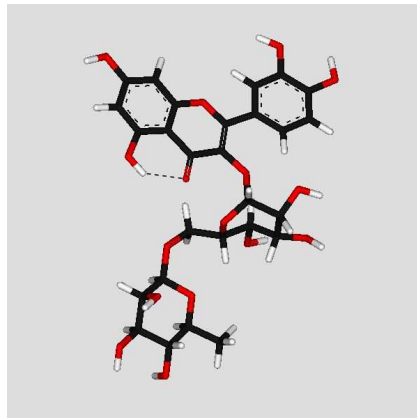
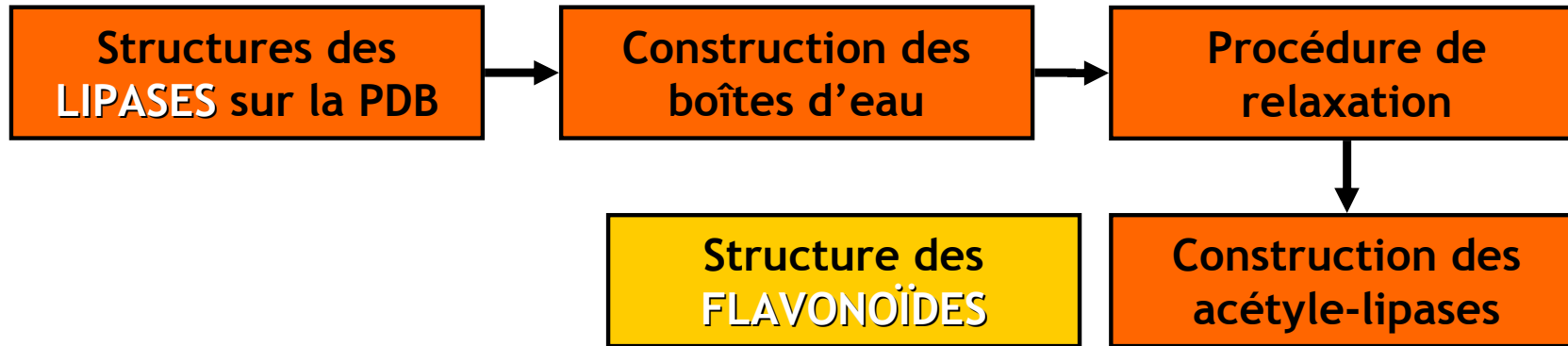
Procédure de
relaxation

Construction des
acétyl-lipases

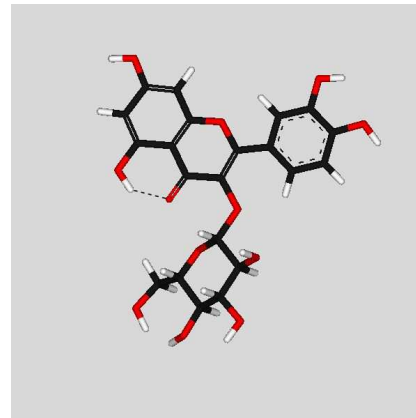
(Botta *et al.*, 2002 ;
Palocci *et al.* 2007)



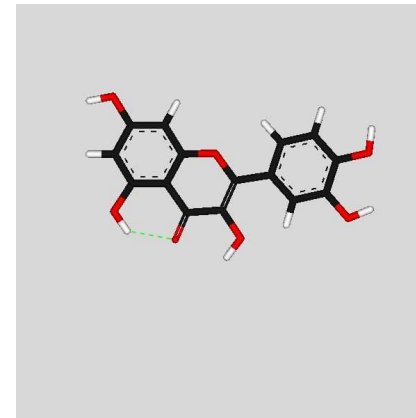
MÉTHODOLOGIE



Rutine

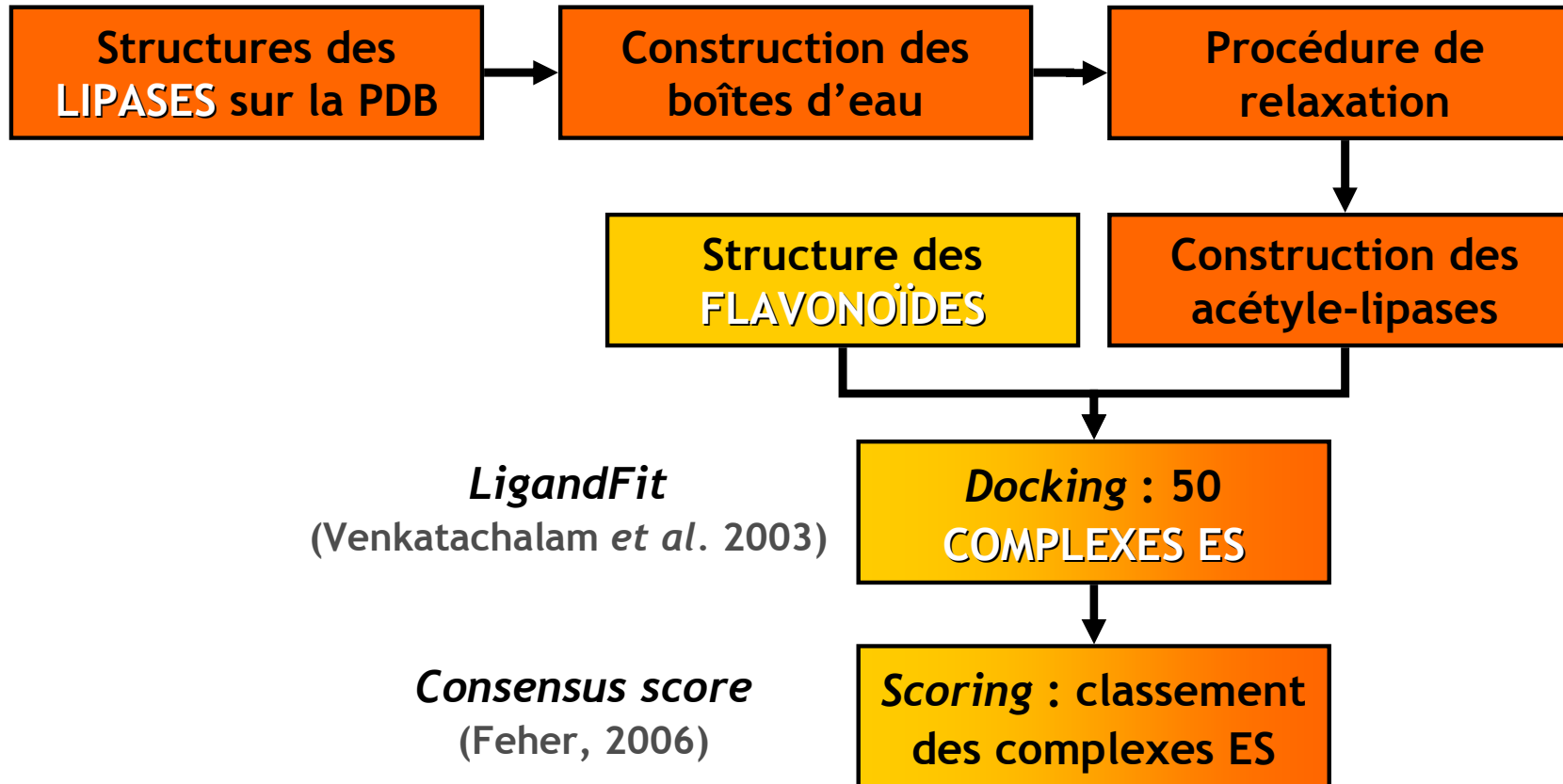


Isoquercitrine



Quercétine

MÉTHODOLOGIE



STRUCTURE DE LA PRÉSENTATION

1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE

- DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES
- OBJECTIF GÉNÉRAL

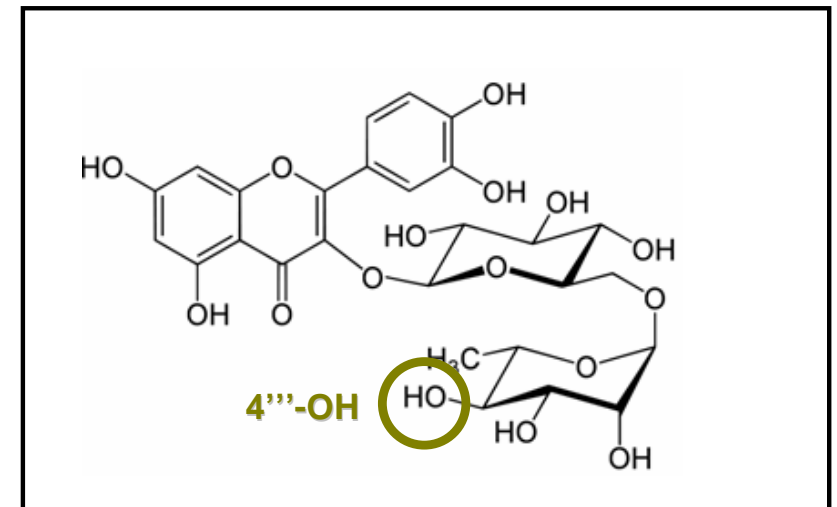
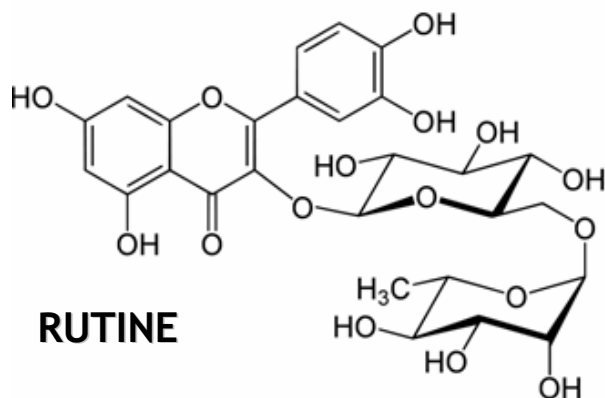
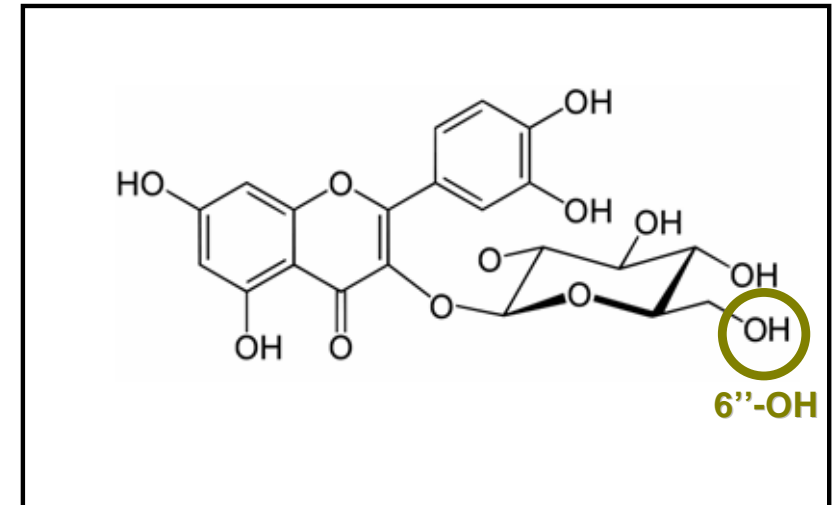
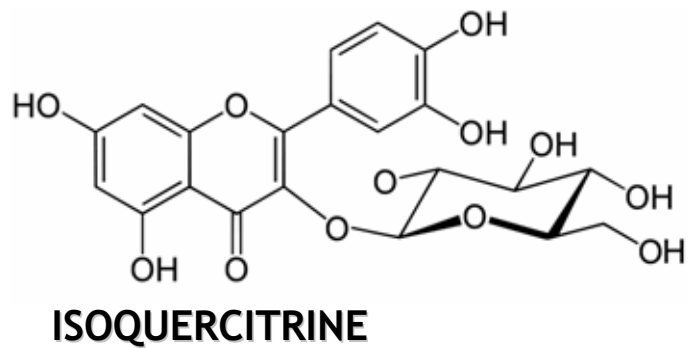
2. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

- OBTENTION DES STRUCTURES
- **PROBLÉMATIQUE 1 : RÉGIOSÉLECTIVITÉ DU PROCÉDÉ**
- PROBLÉMATIQUE 2 : SPÉCIFICITÉ ENZYMATIQUE
- PROBLÉMATIQUE 3 : RÉACTIVITÉ DES FLAVONOÏDES

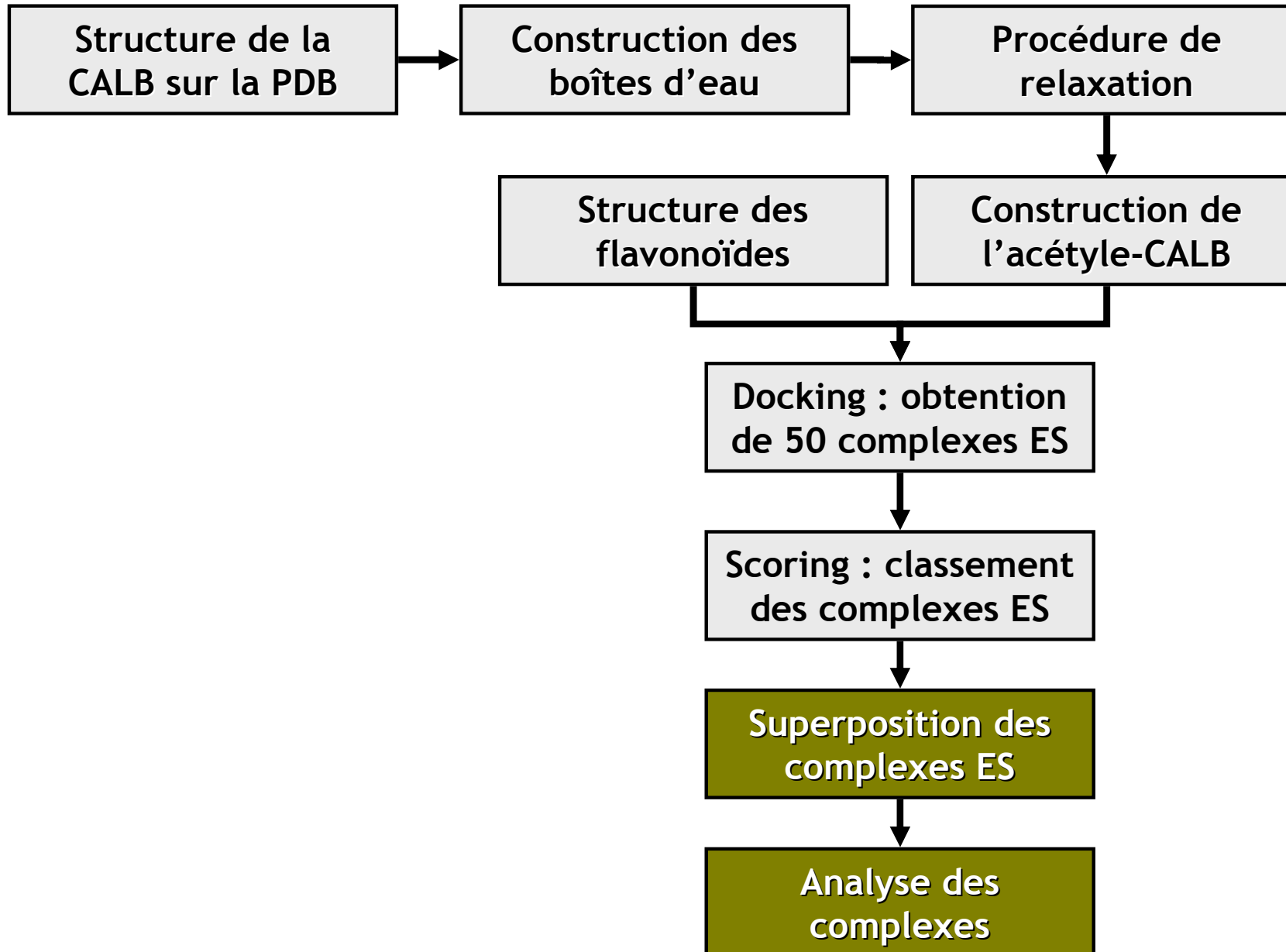
3. CONCLUSIONS / PERSPECTIVES

PROBLÉMATIQUE 1 : RÉGIOSÉLECTIVITÉ DU PROCÉDÉ

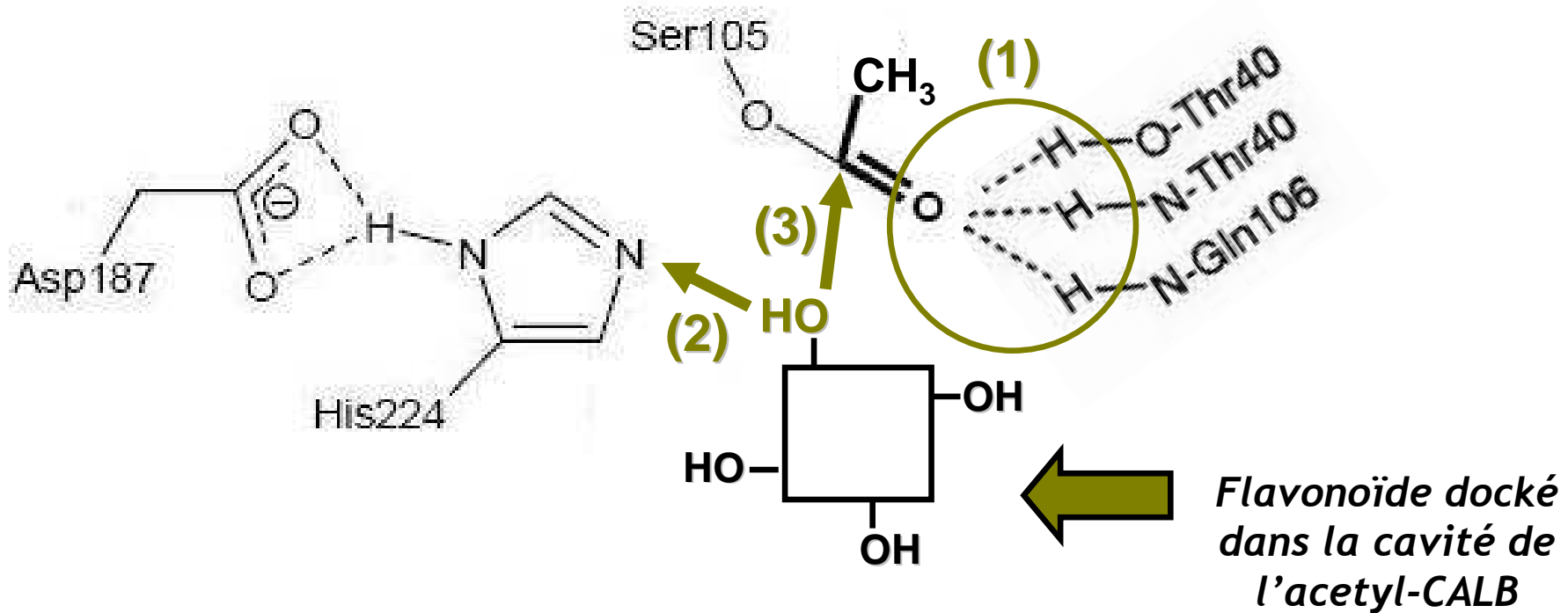
Comment les modes d'interaction enzyme-substrats influencent-ils la régiosélectivité observée lors de l'acétylation des flavonoïdes glycosylés isoquercitrine et rutine, catalysée par la lipase B de Candida antarctica (CALB) ?



MÉTHODOLOGIE

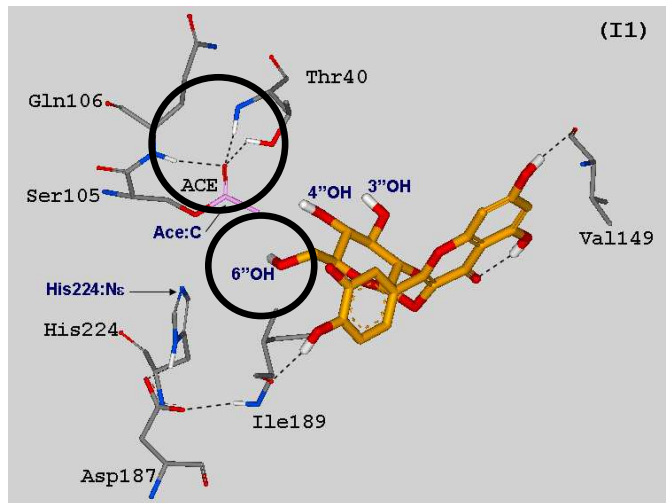


CRITÈRES À SATISFAIRE POUR QU'UN COMPLEXE SOIT CONSIDÉRÉ COMME POTENTIELLEMENT PRODUCTIF



- (1) Liaisons H entre ACE et les résidus Thr40 et Gln106 (Vallikivi *et al.*, 2005)
- (2) Transfert de proton : -OH du flavonoïde \rightarrow His224:N ϵ ($< 4 \text{ \AA}$) (Palocci *et al.*, 2007)
- (3) Attaque nucléophile : -O^- du flavonoïde \rightarrow Ace:C ($< 4 \text{ \AA}$) (Palocci *et al.*, 2007)

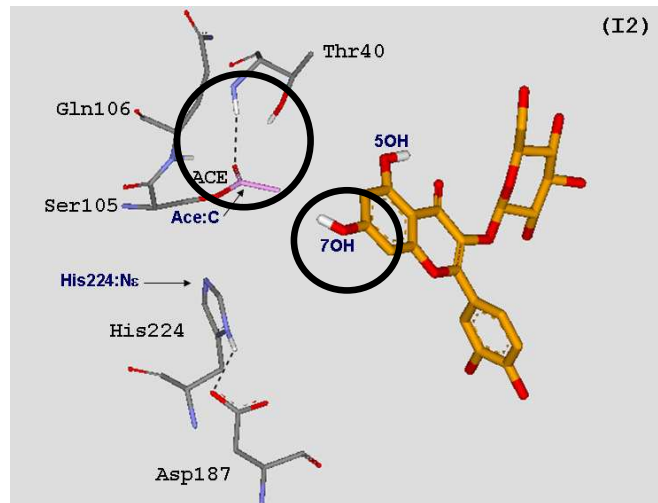
ISOQUERCITRINE / CALB - COMPLEXES RETENUS



- Acétate - 3 liaisons H ✓
- 6''-OH :
 - Ace:C - 3,5 Å ✓
 - His224:Ne - 4,0 Å ✓



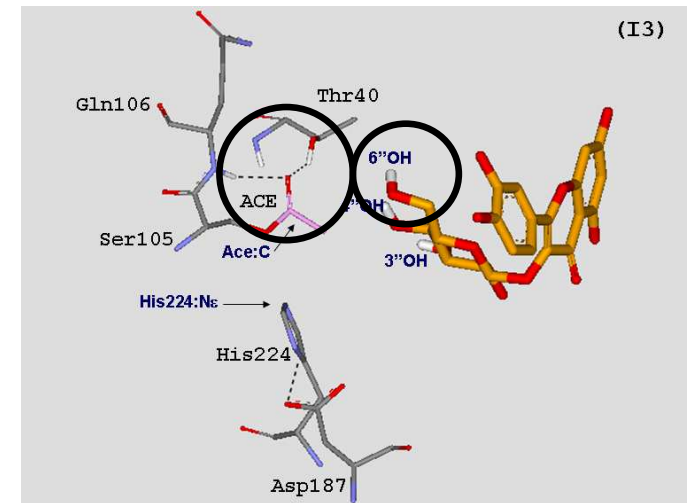
PRODUCTIF ✓



- Acétate - 1 liaison H ✗
- 7-OH :
 - Ace:C - 5,2 Å ✗
 - His224:Ne - 7,1 Å ✗



NON PRODUCTIF ✗

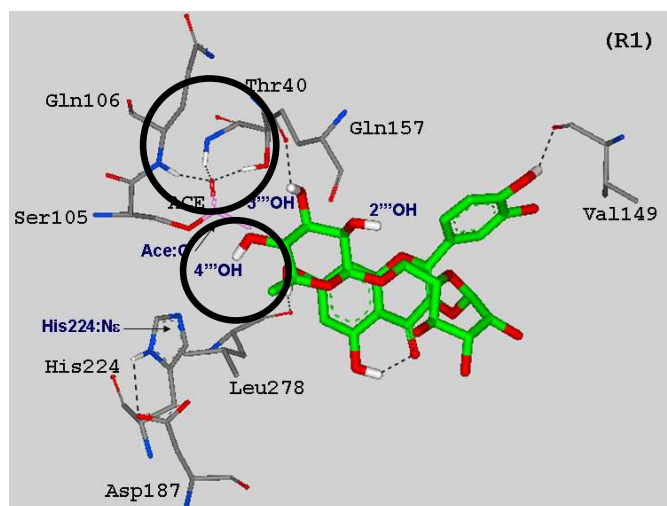


- Acétate - 2 liaisons H ✓
- 6''-OH :
 - Ace:C - 4,2 Å
 - His224:Ne - 5,9 Å ✗



NON PRODUCTIF ✗

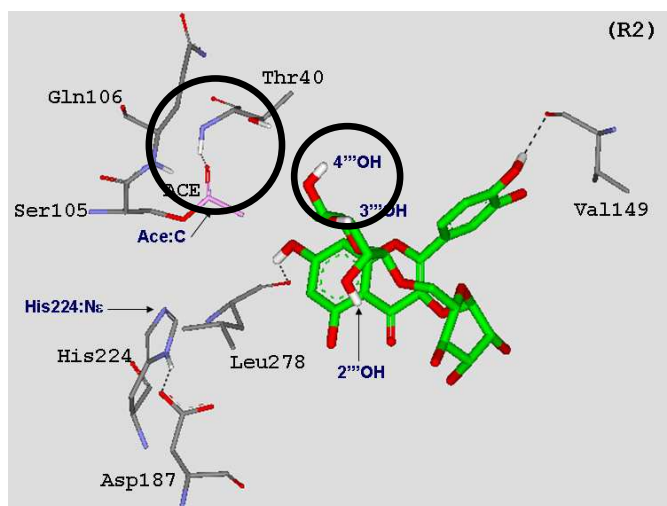
RUTINE / CALB - COMPLEXES RETENUS



- Acétate - 3 liaisons H ✓
- 4'''-OH :
 - Ace:C - 2,9 Å ✓
 - His224:Ne - 3,9 Å ✓



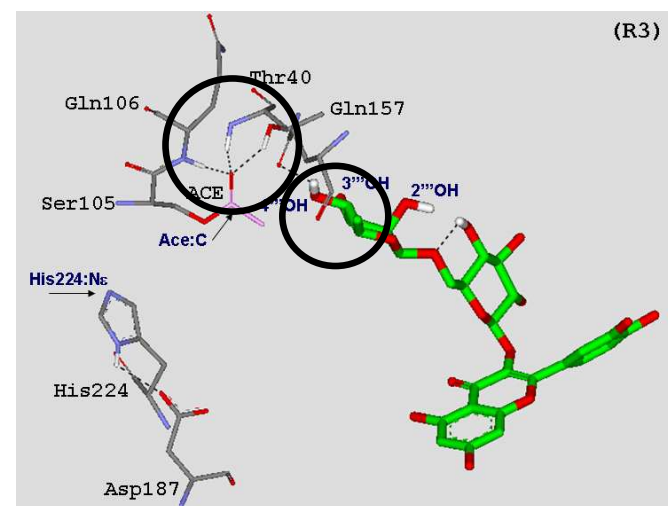
PRODUCTIF ✓



- Acétate - 1 liaison H ✗
- 4'''-OH :
 - Ace:C - 4,1 Å
 - His224:Ne - 7,8 Å ✗



NON PRODUCTIF ✗



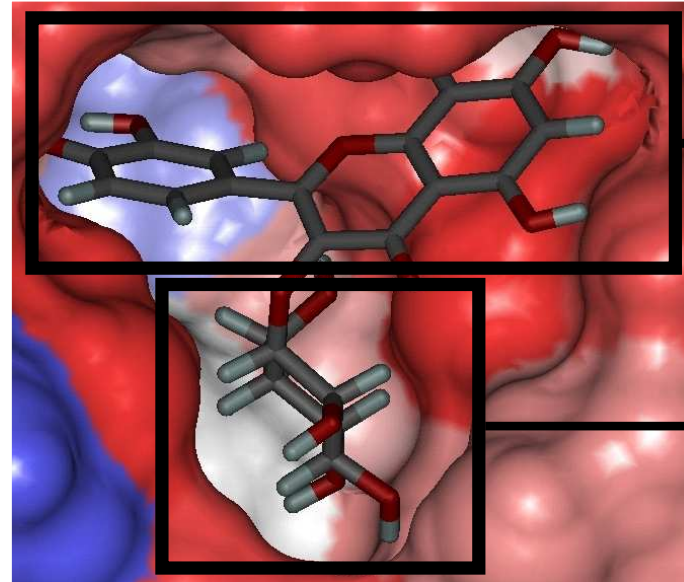
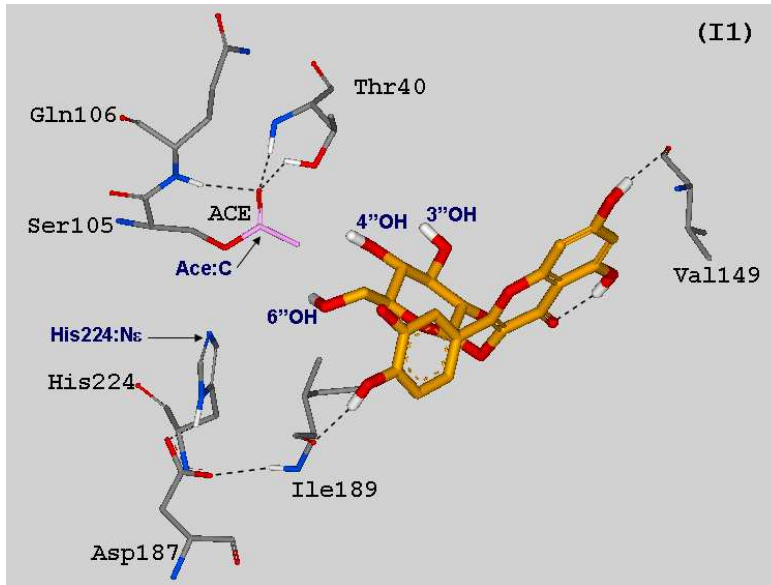
- Acétate - 3 liaisons H ✓
- 4'''-OH :
 - Ace:C - 3,7 Å
 - His224:Ne - 9,4 Å ✗



NON PRODUCTIF ✗

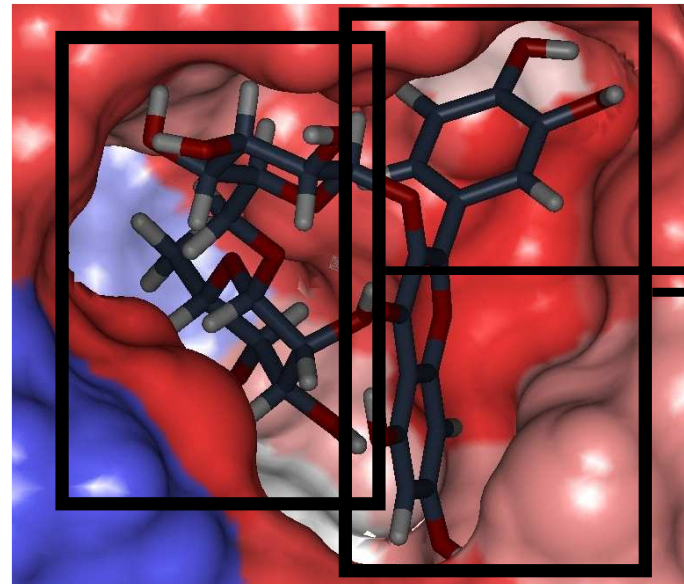
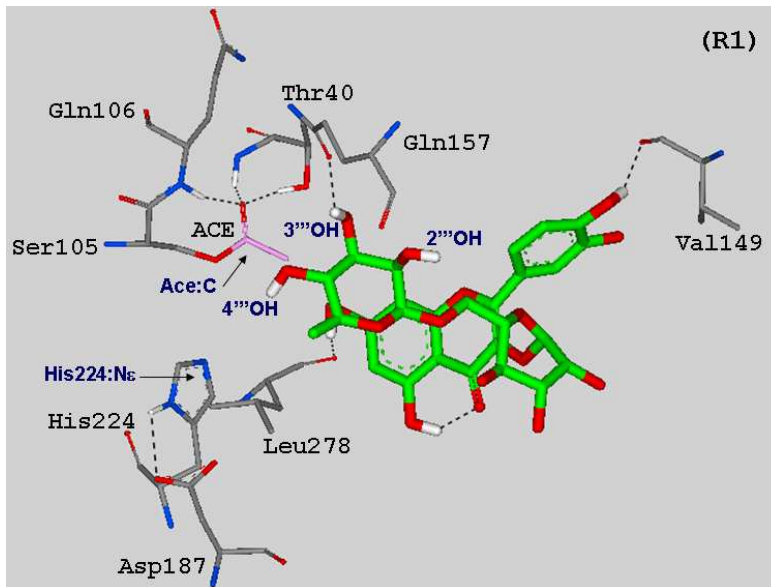
COMPLEXES PRODUCTIFS

ISOQUERCITRINE / CALB



PARTIE GLYCOSIDIQUE
PARVERS LE FOND
À ANCHORÉE
(HYDROPHILE)
(HYDROPHOBE)

RUTINE / CALB





A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B

Eduardo B. De Oliveira^a, Catherine Humeau^{a,*}, Latifa Chebil^a, Elaine R. Maia^b, François Dehez^c, Bernard Maignet^d, Mohamed Ghoul^a, Jean-Marc Engasser^a

^a Laboratoire Biocatalyse Bioprocédés (LBB), ENSAIA-INPL, Nancy Université, 2 av. de la Forêt d'Haye, 54500, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^b Laboratório de Estudos Estruturais Moleculares (LEEM), Instituto de Química, Universidade de Brasília, CP 4478, 70904-970, Brasília-DF, Brazil

^c Equipe de Dynamique des Assemblages Membranaires (EDAM), CNRS, Université Henri Poincaré, 7565, 54500, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^d Laboratoire Lorrain de Recherche en Informatique et ses Applications (LORIA), CNRS, Université Henri Poincaré, BP 239, 54506, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 December 2008

Received in revised form 23 January 2009

Accepted 27 January 2009

Available online 12 February 2009

Keywords:

Candida antarctica lipase B

Docking

Flavonoid acylation

Molecular modelling

Regioselectivity

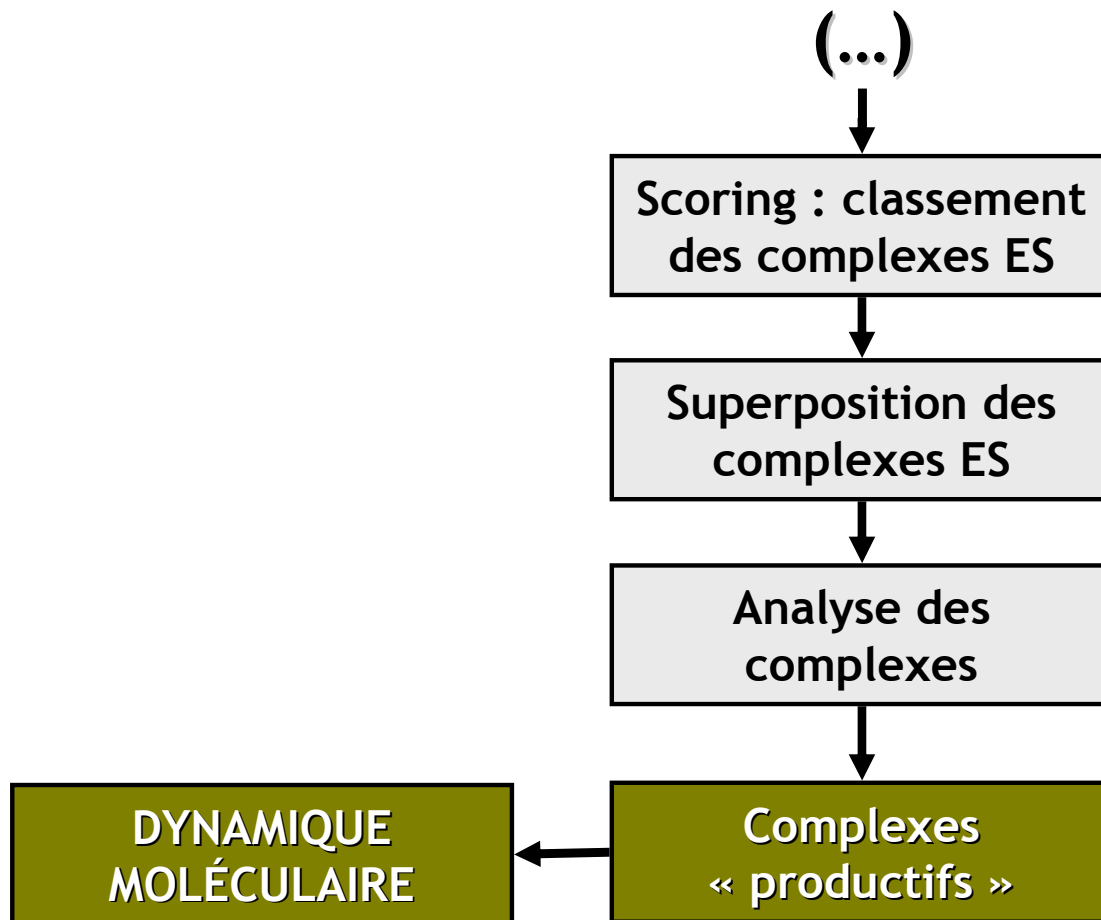
ABSTRACT

The regioselective behaviour of the *Candida antarctica* lipase B (CALB) towards two flavonoid glycosides, rutin and isoquercitrin, in the acetylation reaction was investigated through molecular modelling. A protocol constituted by a Monte Carlo-based docking procedure and classical force fields calculations was applied to find probable binding modes of the substrates inside the catalytic cavity and optimize the corresponding complexes. The analysis of these complexes allowed identifying productive ones (that means, those able to lead to the formation of the ester product) according to three parameters: (1) protein distortion; (2) stability of hydrogen bond interactions with the oxyanion hole residues; (3) localization of hydroxyl groups with regard to the region comprised between the catalytic histidine and serine residues. Results showed that the aglycon part of both rutin and isoquercitrin was localized at the entrance of the binding pocket, stabilized by hydrogen bond and hydrophobic interactions. The sugar part of the flavonoids was placed close to the pocket bottom. In particular, only the primary 6''-OH of the isoquercitrin glucose and the secondary 4'''-OH of the rutin rhamnose were expected to be acetylated, as they were the only ones to stabilize simultaneously near to the catalytic histidine and the acetate bound to the catalytic serine. These findings are in accordance with experimental data and give a suitable explanation, at an atomic level, of the regioselectivity of CALB in the flavonoid glycosides acetylation.

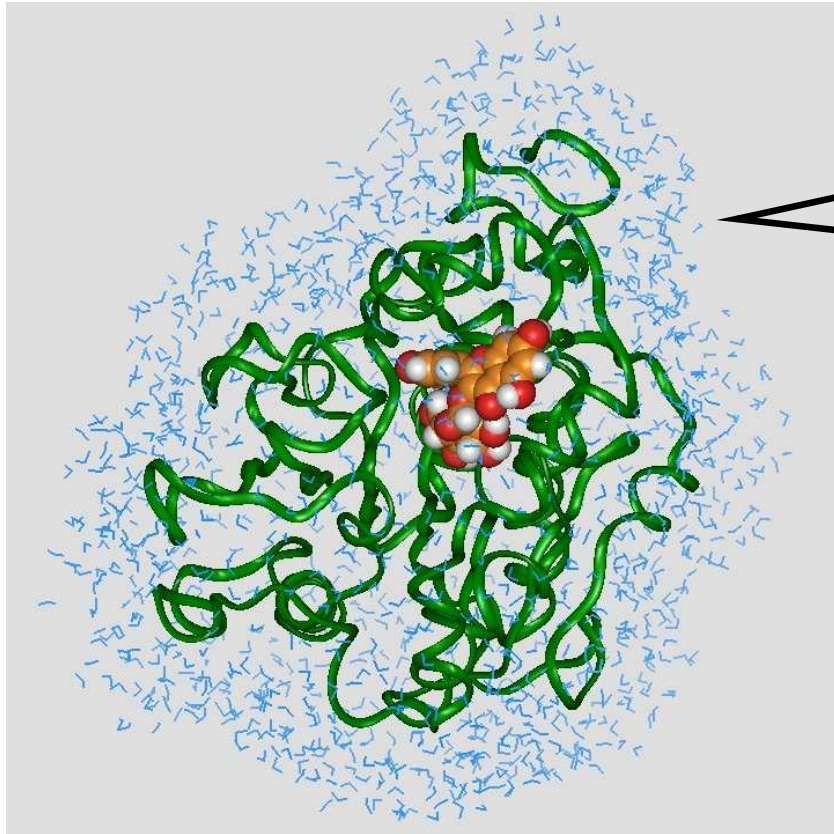
© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

STABILITÉ DES COMPLEXES IDENTIFIÉS COMME PRODUCTIFS

Les complexes identifiés comme productifs lors de l'analyse des résultats de docking présentent-ils une configuration stable au cours du temps ?



DYNAMIQUE MOLÉCULAIRE SUR LES COMPLEXES PRODUCTIFS



MOLÉCULES D'EAU

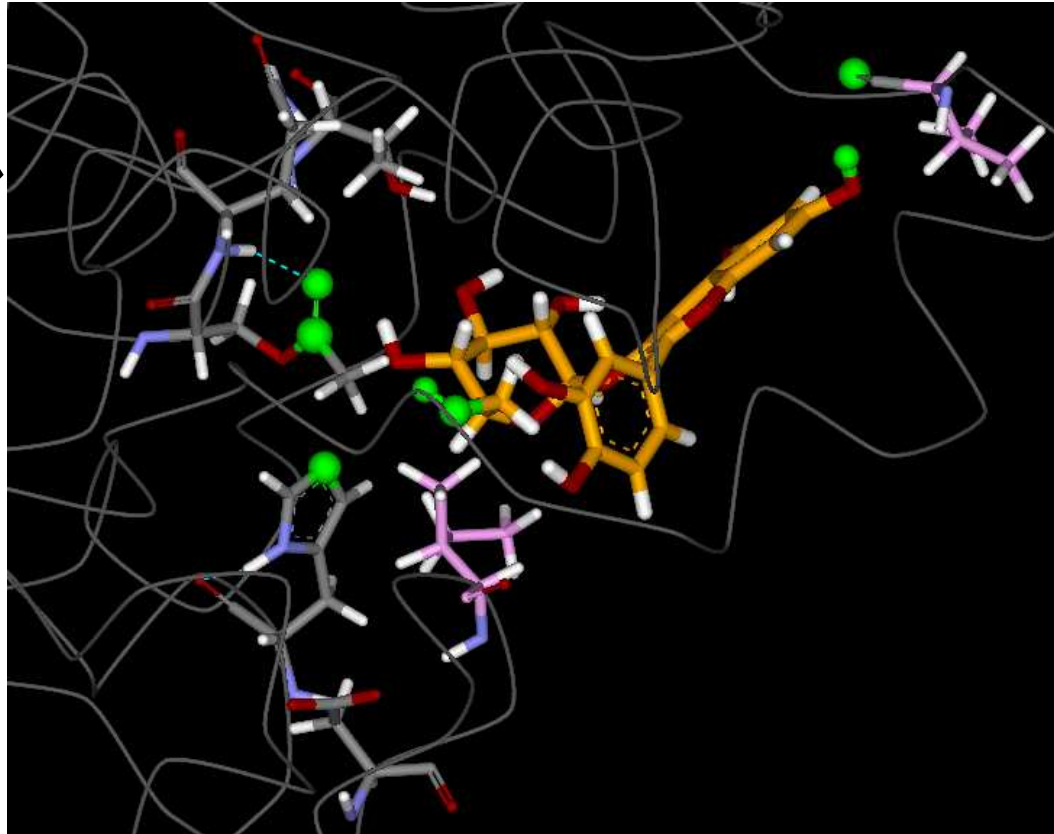
- Couche de 5 Å (1442 molécules)
- Conserver le milieu
- Alléger les calculs

PARAMÈTRES

- Champ de forces CHARMM
- Temps de trajectoire : 2 ns
- T = 300 K
- Intégrateur : Verlet-Leapfrog
- Cut-off : 12 Å (sphérique)
- Pas d'intégration (Δt) : 1 fs

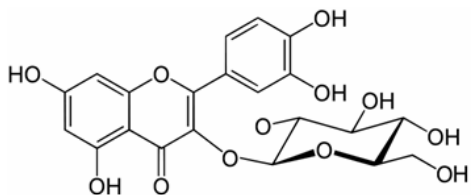
DYNAMIQUE MOLÉCULAIRE ISOQUERCITRINE / CALB

Oxygène de l'acétate (Ace:O) correctement orienté vers les résidus du trou oxyanionique (Thr40 et Gln106)



Partie aglycone stabilisée à l'entrée de la cavité : **liaisons H** et **interactions hydrophobes** (Val149, Ile189)

Isoquercitrine



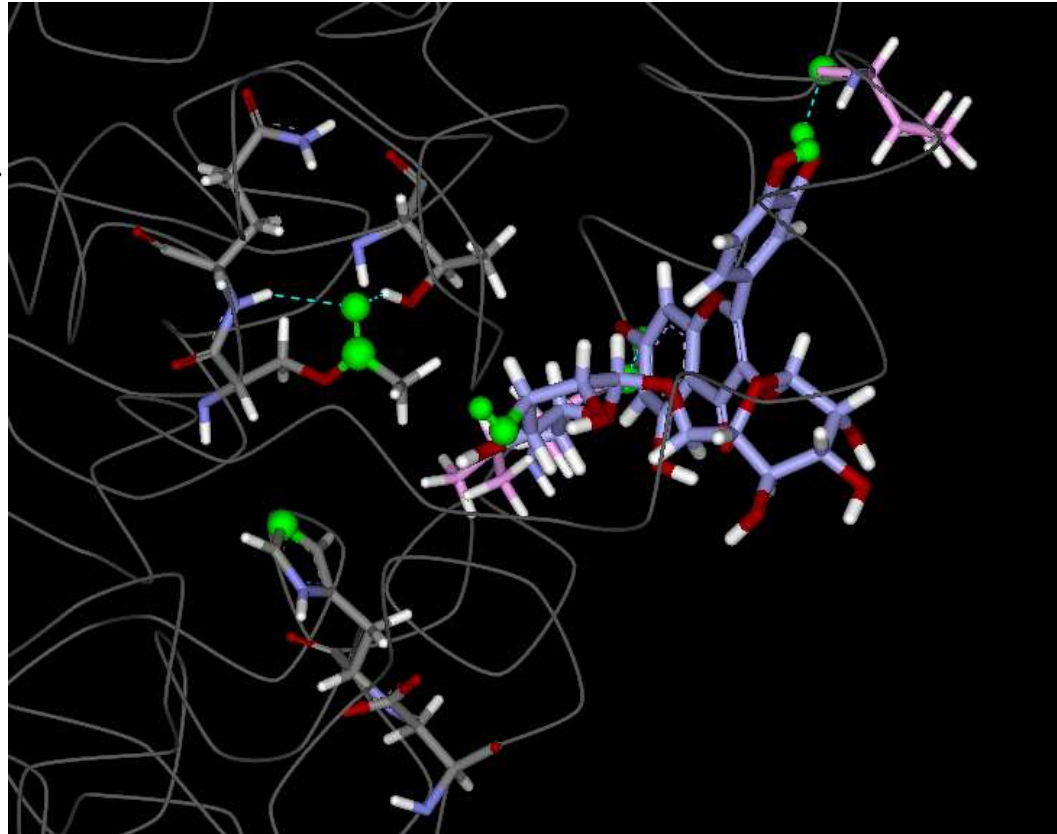
HYDROXYLE 6''-OH

- His224:N ϵ \approx 4,6 Å ($s_d \approx$ 0,15 Å)
- Ace:C \approx 4,2 Å ($s_d \approx$ 0,23 Å)

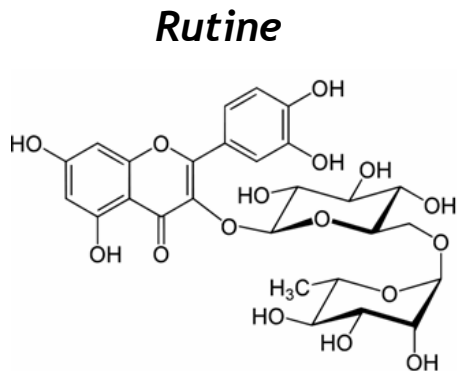
DYNAMIQUE MOLÉCULAIRE

RUTINE / CALB

Oxygène de l'acétate (Ace:O) correctement orienté vers les résidus du trou oxyanionique (Thr40 et Gln106)



Partie aglycone stabilisée à l'entrée de la cavité : **liaisons H** et **interactions hydrophobes** (Val149, Leu278)



HYDROXYLE 4'''-OH

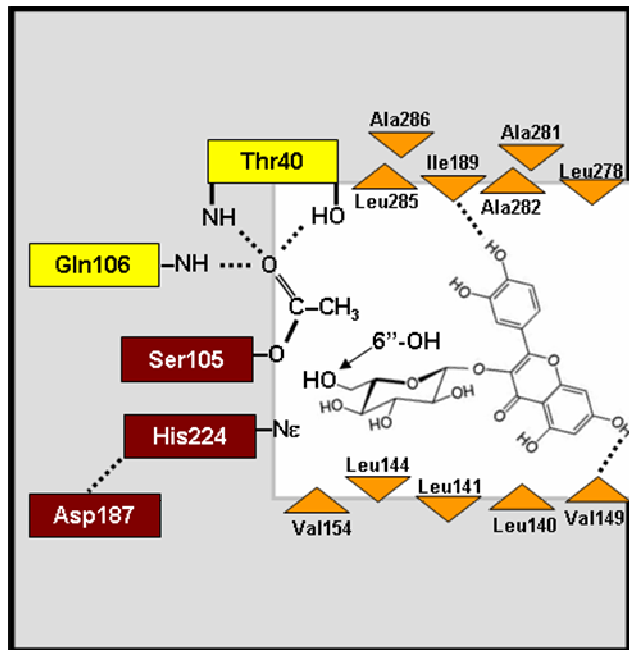
- His224 - *écartement vers le coeur de l'enzyme*
- His224:Ne $\approx 5,9 \text{ \AA}$ ($s_d \approx 0,38 \text{ \AA}$)
- Ace:C $\approx 4,2 \text{ \AA}$ ($s_d \approx 0,29 \text{ \AA}$)

PROBLÉMATIQUE 1 : RÉGIOSÉLECTIVITÉ DU PROCÉDÉ

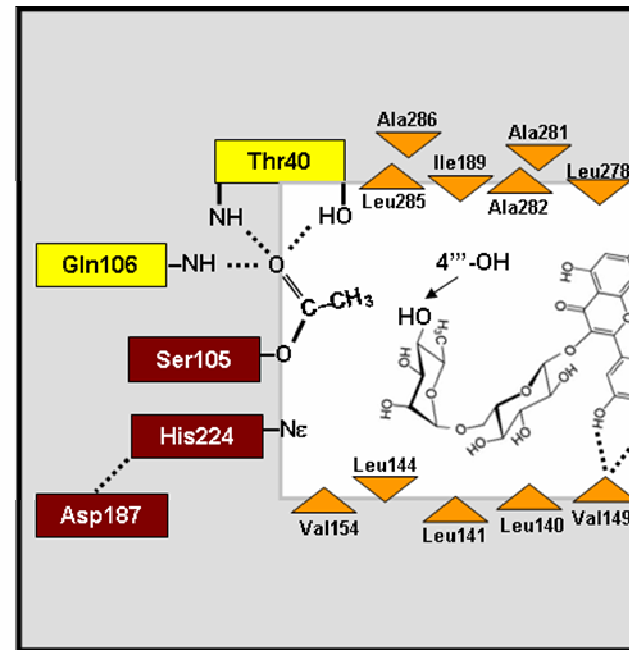
Comment les modes d'interaction enzyme-substrats influencent-ils la régiosélectivité observée lors de l'acétylation des flavonoïdes glycosylés isoquercitrine et rutine catalysée par la lipase B de Candida antarctica (CALB) ?

PROBLÉMATIQUE 1 : RÉGIOSÉLECTIVITÉ DU PROCÉDÉ

ISOQUERCITRINE / CALB



RUTINE / CALB



- *Partie aglycone à l'entrée de la cavité et partie glycosidique vers le fond.*
- *Oxygène de l'acétate → trou oxyanionique*
- *6''-OH de l'isoquercitrine et 4'''-OH de la rutin → résidus catalytiques.*
- *Distances OH-His et OH-Ace des complexes "productifs" → PRUDENCE !*

STRUCTURE DE LA PRÉSENTATION

1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE

- DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES
- OBJECTIF GÉNÉRAL

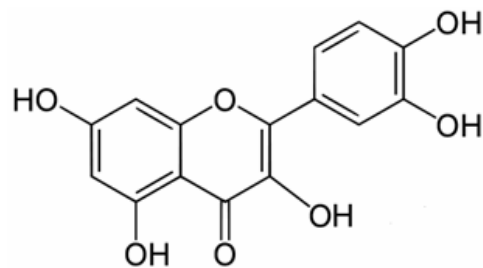
2. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

- OBTENTION DES DES STRUCTURES
- PROBLÉMATIQUE 1 : RÉGIOSÉLECTIVITÉ DU PROCÉDÉ
- **PROBLÉMATIQUE 2 : SPÉCIFICITÉ ENZYMATIQUE**
- PROBLÉMATIQUE 3 : RÉACTIVITÉ DES FLAVONOÏDES

3. CONCLUSIONS / PERSPECTIVES

PROBLÉMATIQUE 2 : SPÉCIFICITÉ ENZYMATIQUE

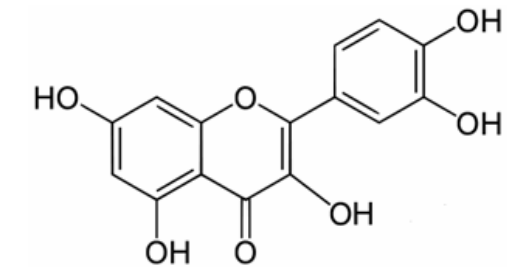
Comment les modes d'interaction enzyme-substrats peuvent-ils expliquer le fait que la lipase de *Pseudomonas cepacia* (PCL) catalyse l'acétylation du flavonoïde aglycone quercétine tandis que la CALB ne catalyse pas cette réaction ?



QUERCÉTINE

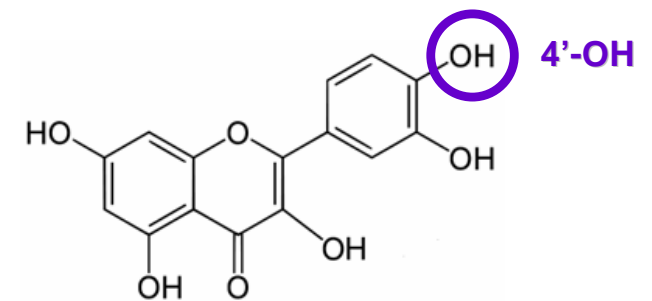
Acétate
de vinyle

CALB

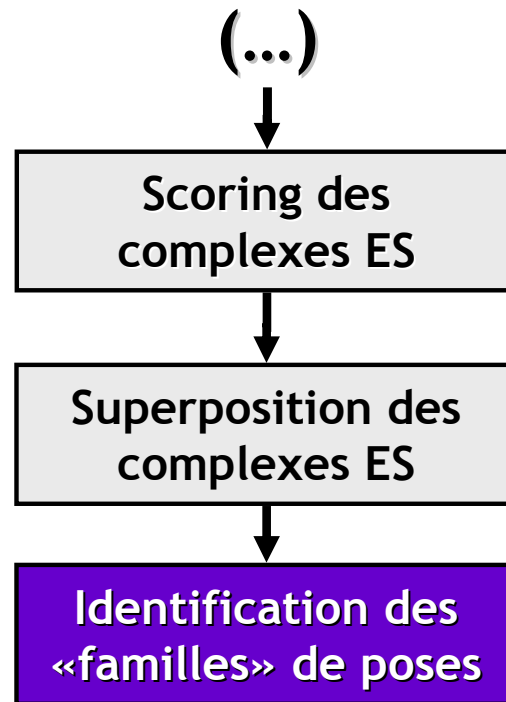


PAS DE PRODUIT DÉTECTÉ

PCL



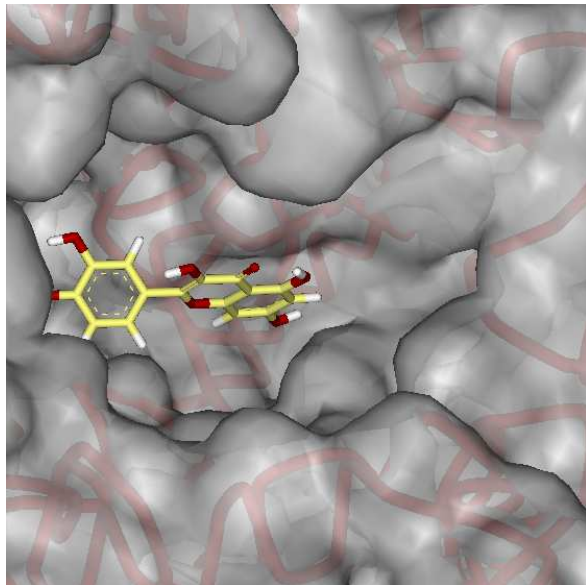
MÉTHODOLOGIE



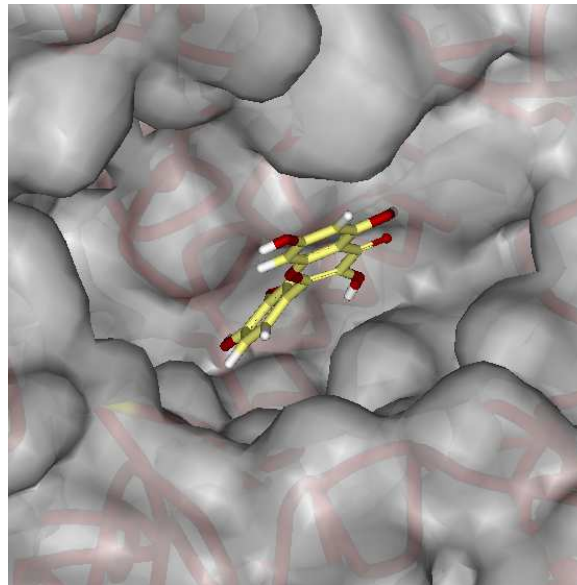
POSITIONS / ORIENTATIONS DE LA QUERCÉTINE

QUERCÉTINE / PCL

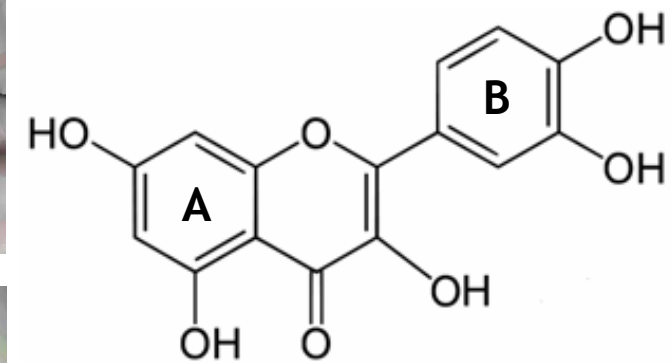
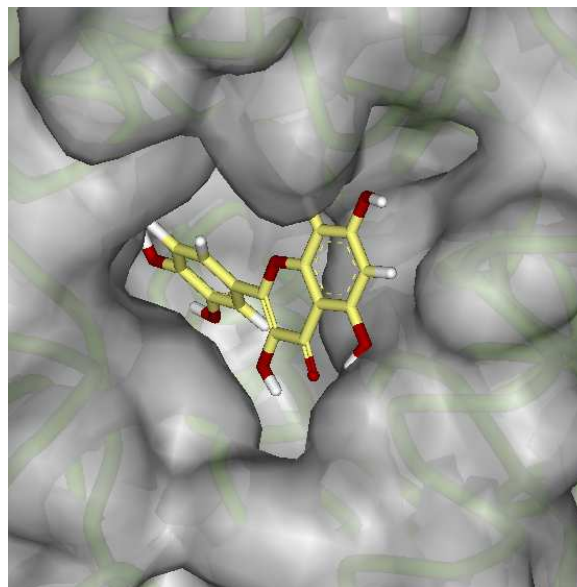
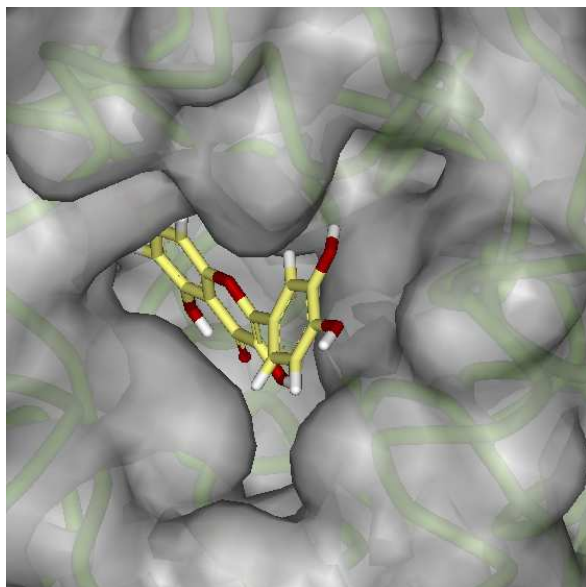
ORIENTATION A



ORIENTATION B

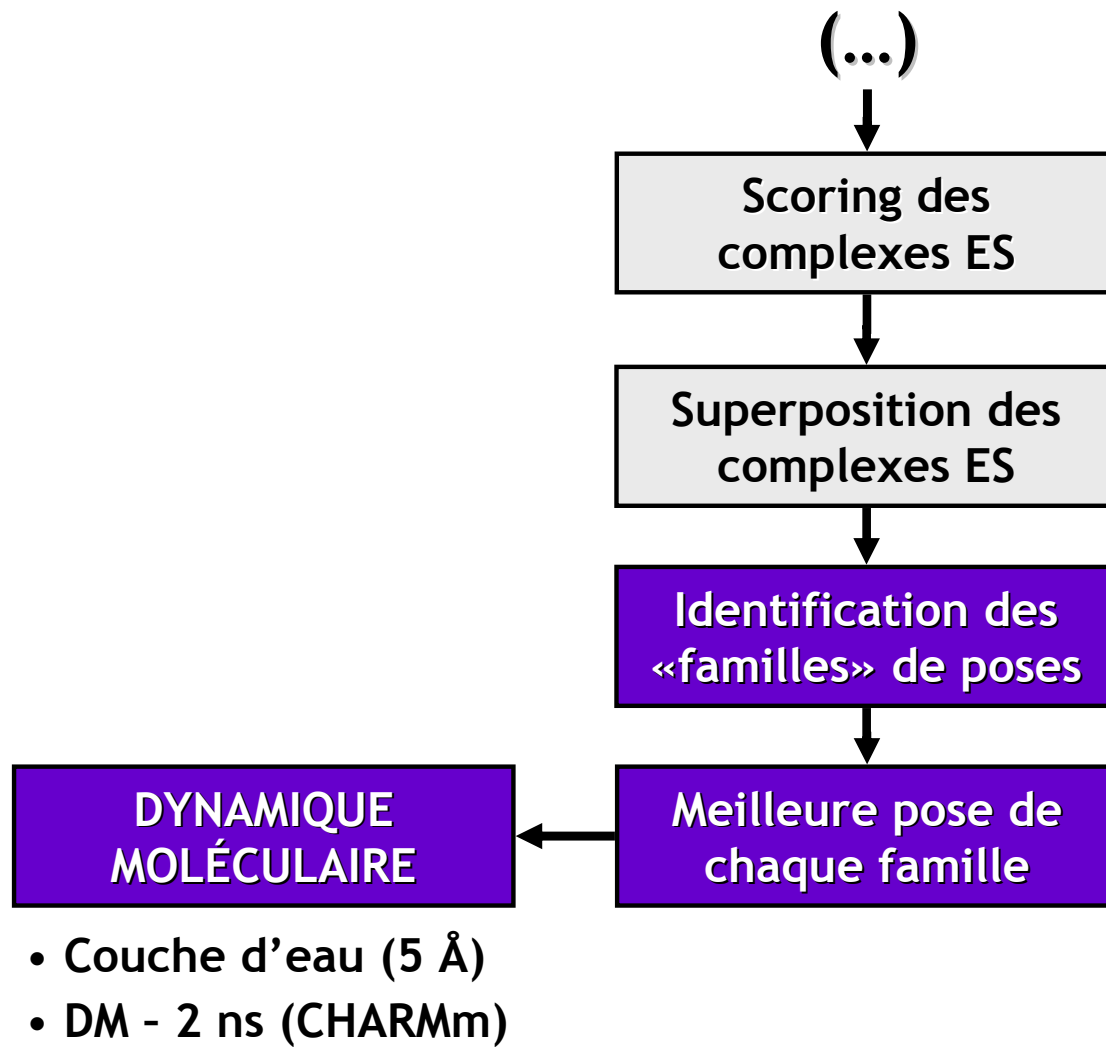


QUERCÉTINE / CALB



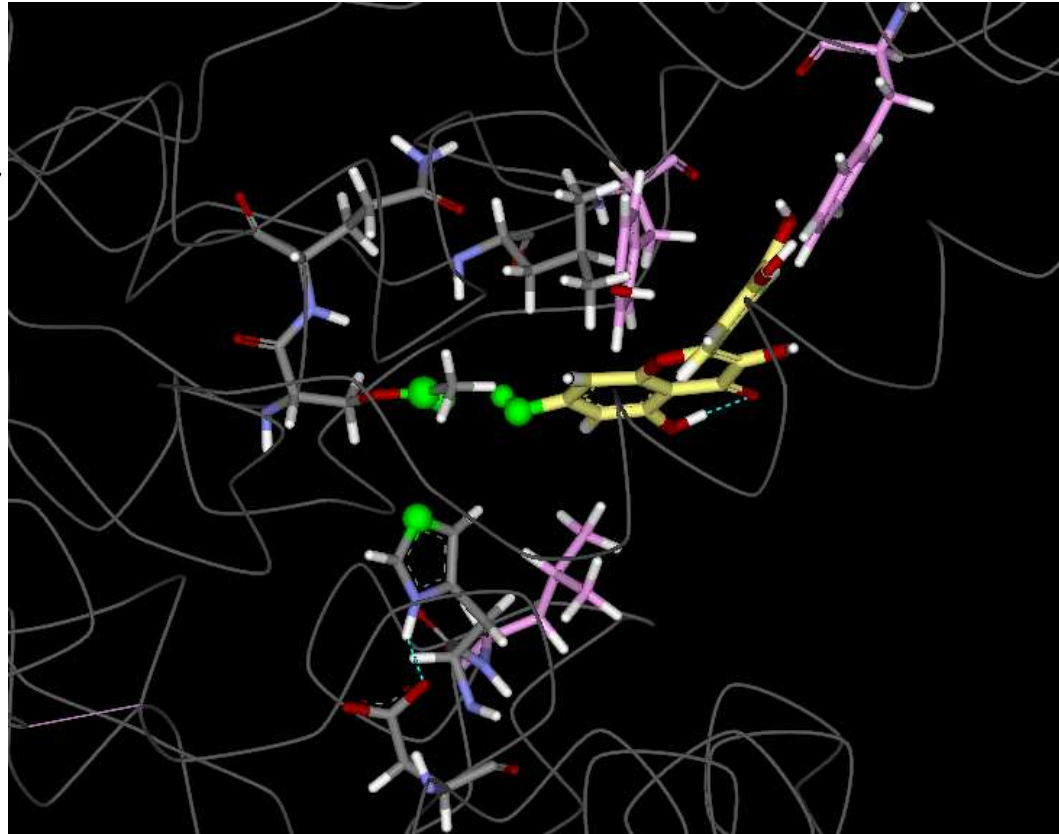
Quercétine

MÉTHODOLOGIE



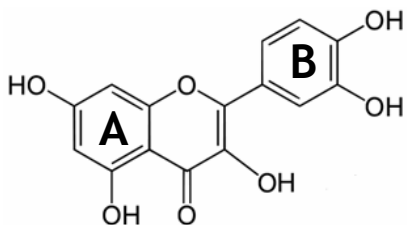
RÉSULTATS - QUERCÉTINE / PCL (orientation A)

Oxygène de l'acétate (Ace:O) pas correctement orienté vers les résidus du trou oxyanionique (Leu17 et Gln88).
Liaison H
7-OH...Ace:O



Interactions de la quercétine :
liaison H
(7-OH...Ace:O) et interactions hydrophobes (Tyr23, Phe146, Leu287).

Quercétine

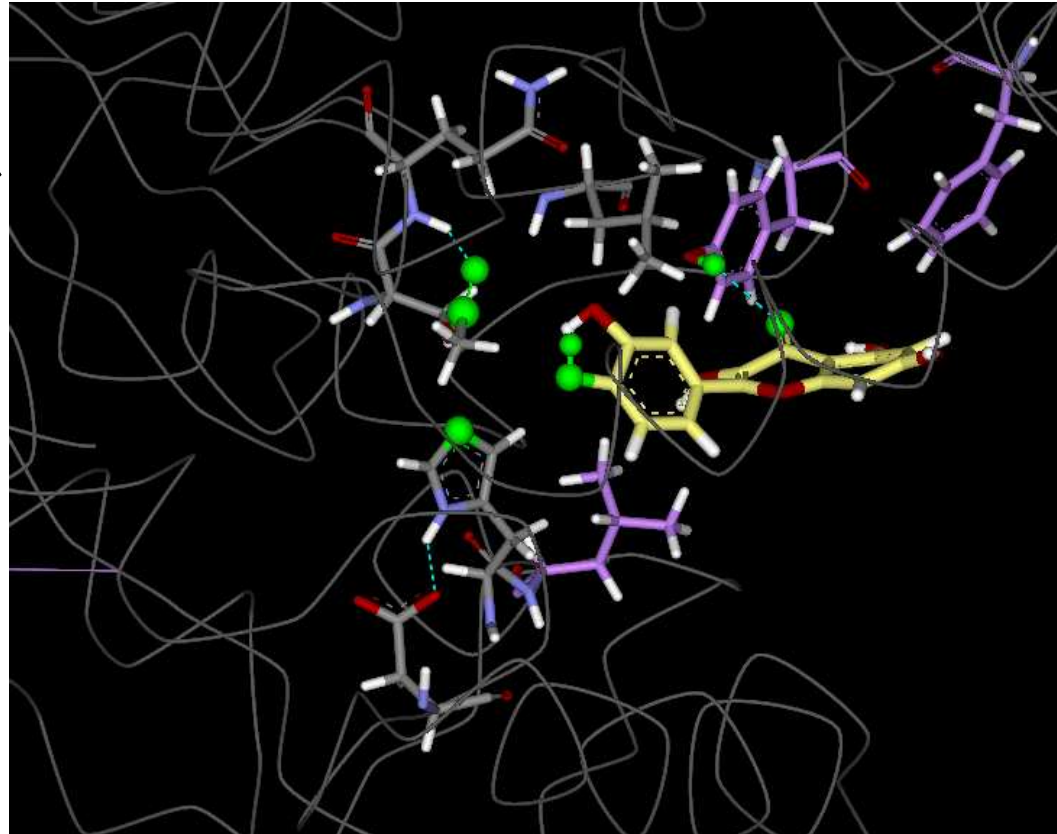


HYDROXYLE 7-OH

- His224:Ne $\approx 4,4 \text{ \AA}$ ($s_d \approx 0,35 \text{ \AA}$)
- Ace:C $\approx 4,6 \text{ \AA}$ ($s_d \approx 0,34 \text{ \AA}$)
- **Liaison H : 7-OH...Ace:O**

RÉSULTATS - QUERCÉTINE / PCL (ORIENTATION B)

Oxygène de l'acétate (Ace:O) correctement orienté vers les résidus du trou oxyanionique (Leu17 et Gln88).

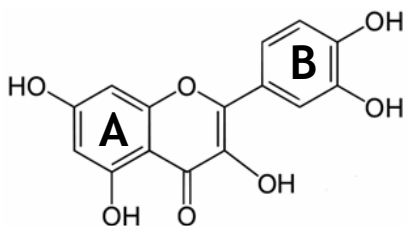


Interactions de la quercétine :
liaison H
(Tyr23:OH...4-O)
et interactions hydrophobes
(Tyr23, Phe146, Leu287).

HYDROXYLE 4'-OH

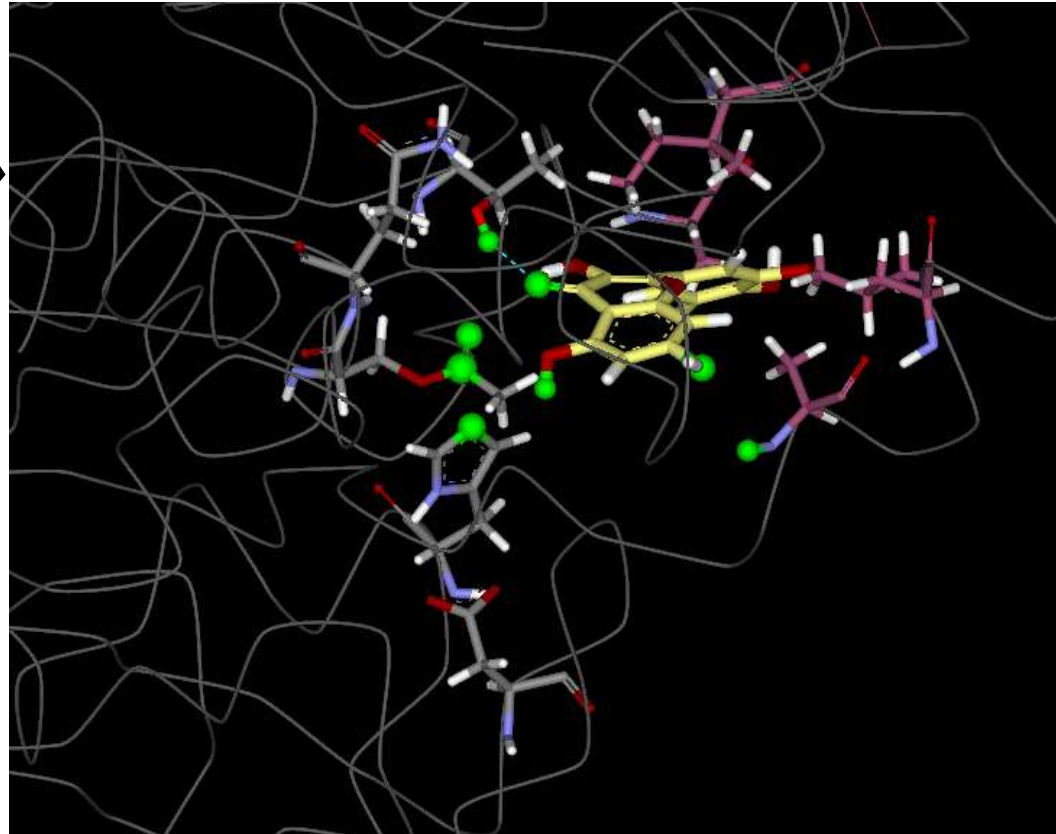
- His224:Ne $\approx 4,1 \text{ \AA}$ ($s_d \approx 0,20 \text{ \AA}$)
- Ace:C $\approx 3,7 \text{ \AA}$ ($s_d \approx 0,18 \text{ \AA}$)

Quercétine



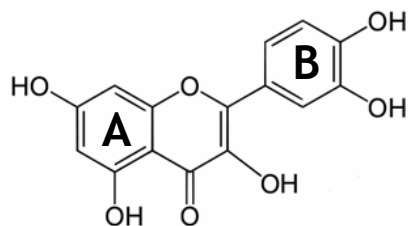
RÉSULTATS - QUERCÉTINE / CALB (ORIENTATION A)

Oxygène de l'acétate (Ace:O) pas correctement orienté vers les résidus du trou oxyanionique (Thr40 et Gln106)



Interactions de la quercétine :
liaisons H
(Thr40:OH...4-O,
Ala141:NH...7-OH)
et interactions hydrophobes
(Ala141, Leu144,
Ala282, Ile285).

Quercétine

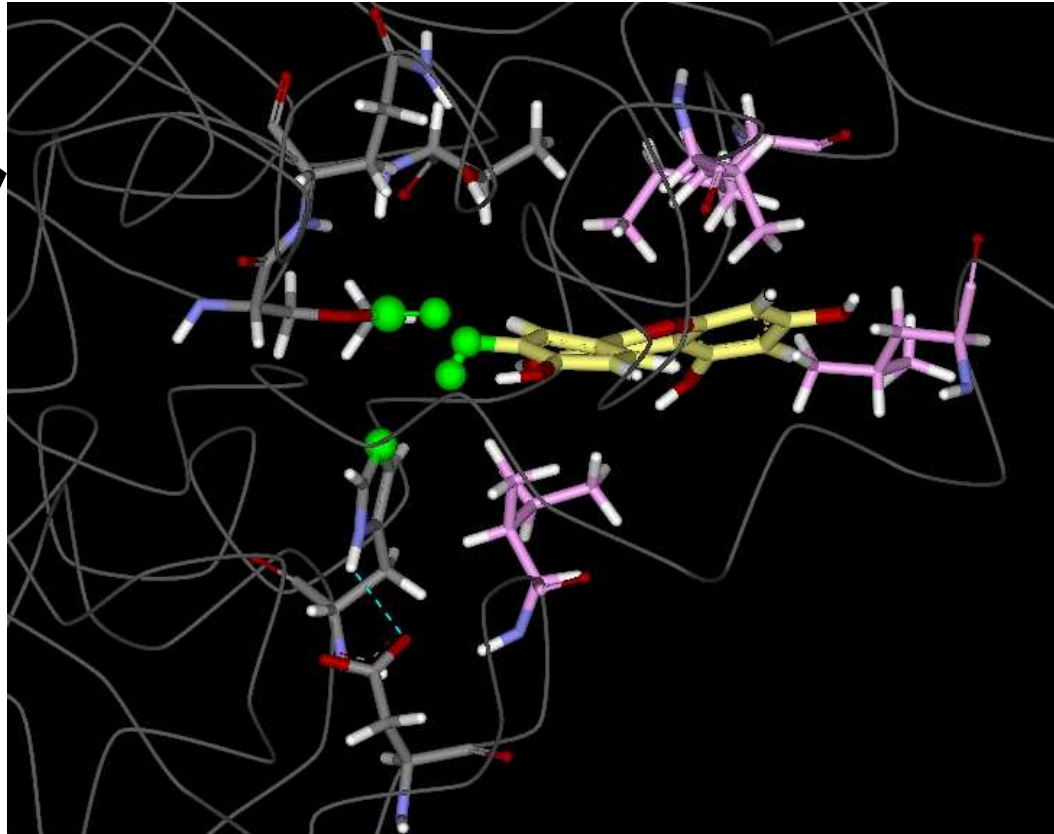


HYDROXYLE 5-OH :

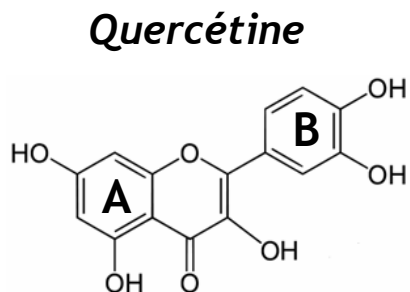
- His224:Ne $\approx 4,6$ Å ($s_d \approx 0,15$ Å)
- Ace:C $\approx 6,3$ Å ($s_d \approx 0,14$ Å)
- Liaison H intramoléculaire : 5-OH...4-O

RÉSULTATS - QUERCÉTINE / CALB (ORIENTATION B)

Oxygène de l'acétate (Ace:O) pas correctement orienté vers les résidus du trou oxyanionique (Thr40 et Gln106).
À ≈ 800 ps, rotation + **liaison H** 3'-OH...Ace:O.



Interactions de la quercétine : interactions hydrophobes (Leu144, Ala154, Ile189, Ile285).



HYDROXYLE 3'-OH :

- His224:Ne $\approx 4,8$ Å ($s_d \approx 0,18$ Å)
- Ace:C $\approx 3,9$ Å ($s_d \approx 0,19$ Å)
- **Liaison H** : 3'-OH...Ace:O

PROBLÉMATIQUE 2 : SPÉCIFICITÉ ENZYMATIQUE

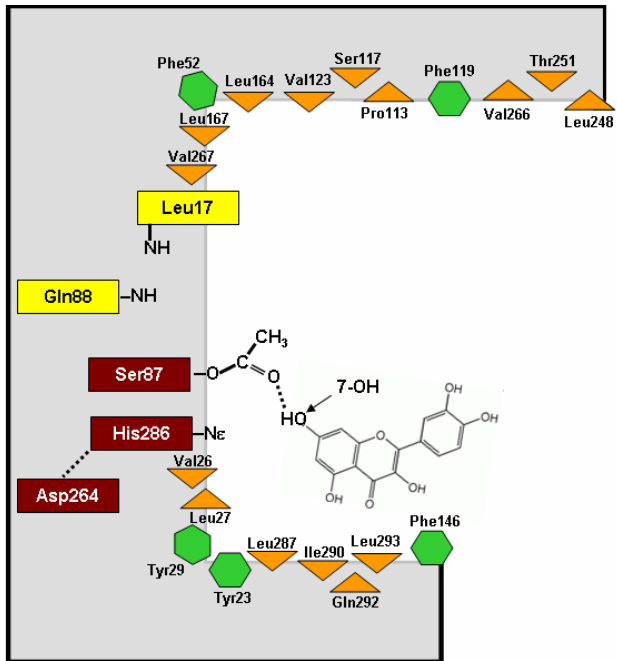
Comment les modes d'interaction enzyme-substrats peuvent-ils expliquer le fait que la lipase de Pseudomonas cepacia (PCL) catalyse l'acétylation du flavonoïde aglycone quercétine, tandis que la CALB ne catalyse pas cette réaction ?

PROBLÉMATIQUE 2 : SPÉCIFICITÉ ENZYMATIQUE

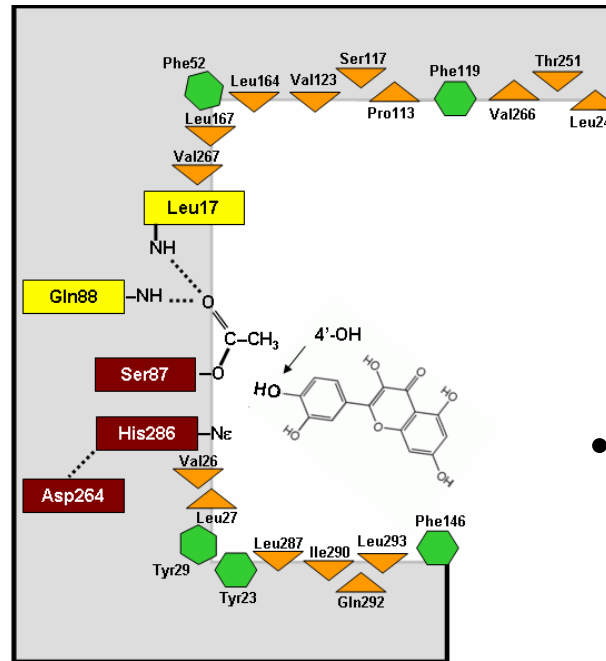
QUERCÉTINE / PCL

QUERCÉTINE / CALB

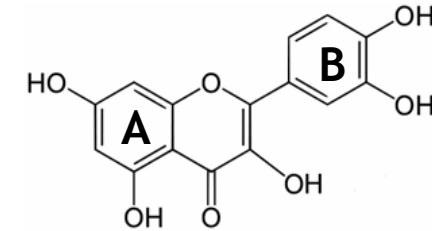
ORIENTATION A



ORIENTATION B



Quercétine



- *Seule l'orientation B de la quercétine, avec la PCL, conserve une configuration productive.*
- *Résidus aromatiques : interactions stabilisant les substrats dans la cavité catalytique.*

(De Oliveira et al., papier en révision)

STRUCTURE DE LA PRÉSENTATION

1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE

- DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES
- OBJECTIF GÉNÉRAL

2. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

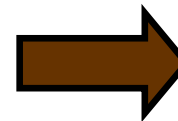
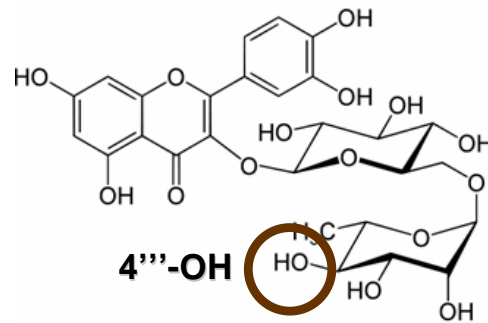
- OBTENTION DES STRUCTURES
- PROBLÉMATIQUE 1 : RÉGIOSÉLECTIVITÉ DU PROCÉDÉ
- PROBLÉMATIQUE 2 : SPÉCIFICITÉ ENZYMATIQUE
- **PROBLÉMATIQUE 3 : RÉACTIVITÉ DES FLAVONOÏDES**

3. CONCLUSIONS / PERSPECTIVES

PROBLÉMATIQUE 3 : RÉACTIVITÉ DES FLAVONOÏDES

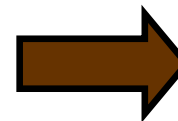
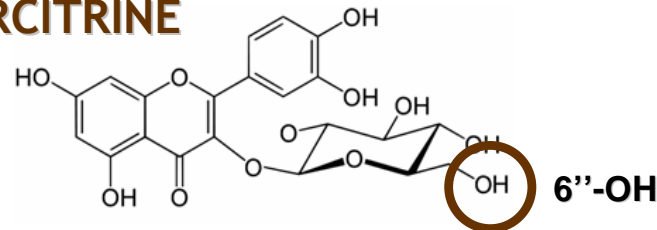
Dans le cas de la CALB, la nature des groupements hydroxyle (OH) des flavonoïdes qui atteignent les résidus catalytiques peut-elle aussi contribuer à la sélectivité ?

RUTINE



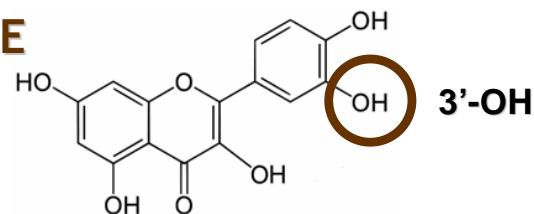
ALCOOL
SECONDAIRE

ISOQUERCITRINE



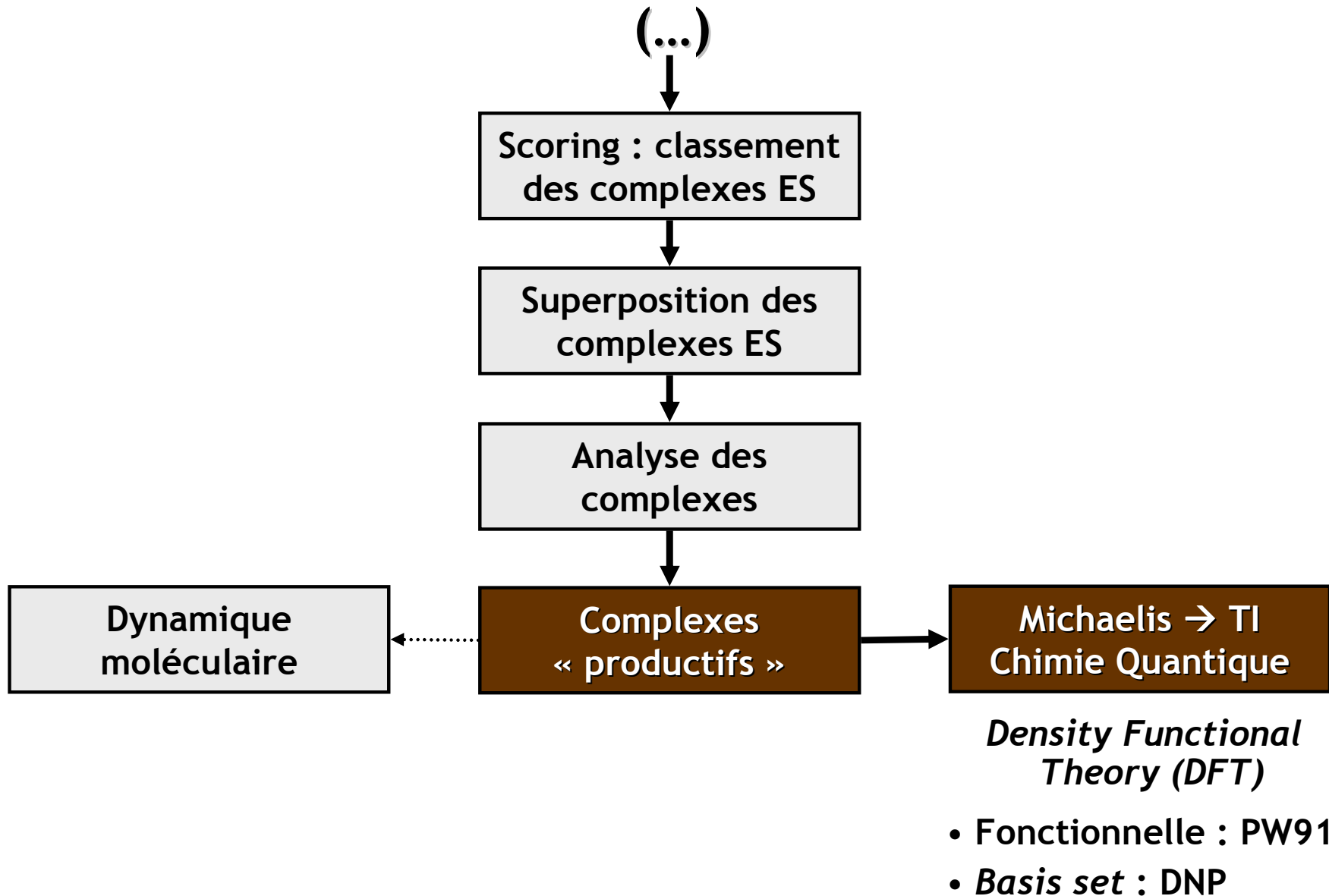
ALCOOL
PRIMAIRE

QUERCÉTINE



PHÉNOL

MÉTHODOLOGIE

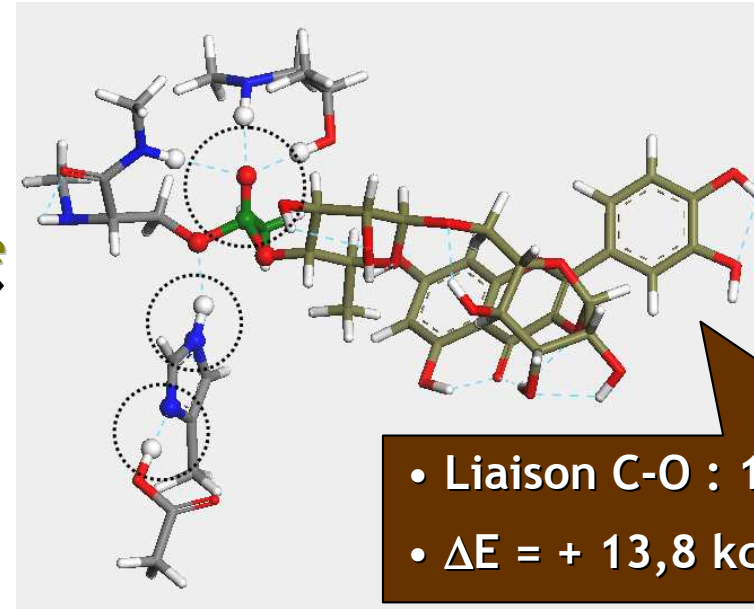
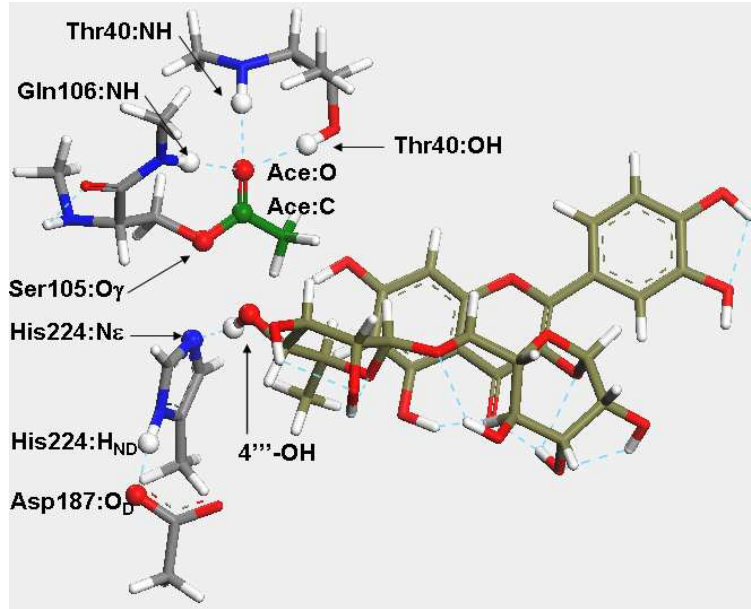


FLAVONOÏDES GLYCOSYLÉS : RUTINE ET ISOQUERCITRINE

Complexe de Michaelis

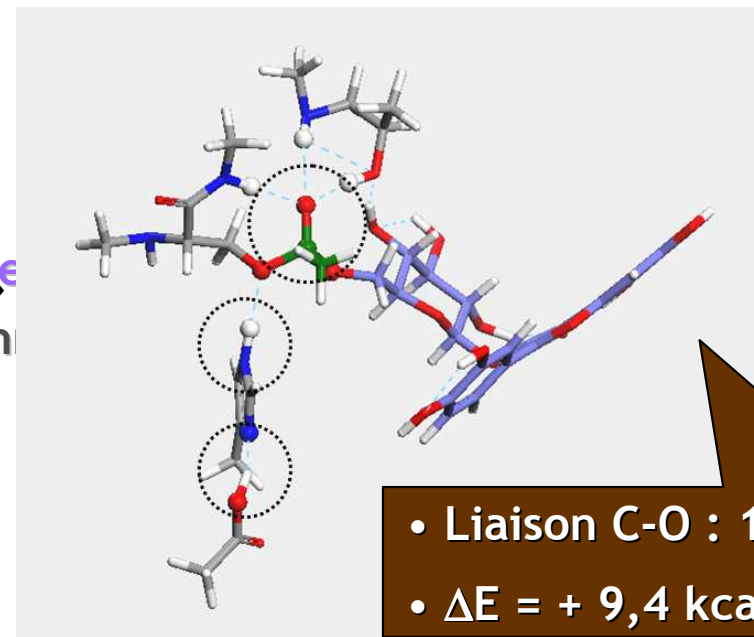
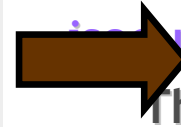
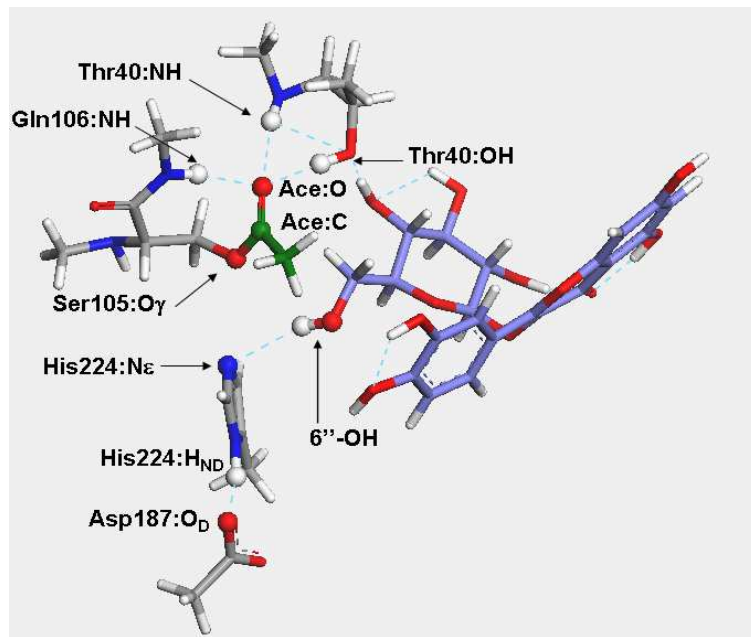
Intermédiaire tétraédrique

RUTINE



- Liaison C-O : 1,50 Å
- $\Delta E = + 13,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$

ISOQUERCITRINE



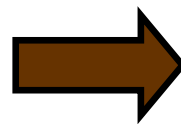
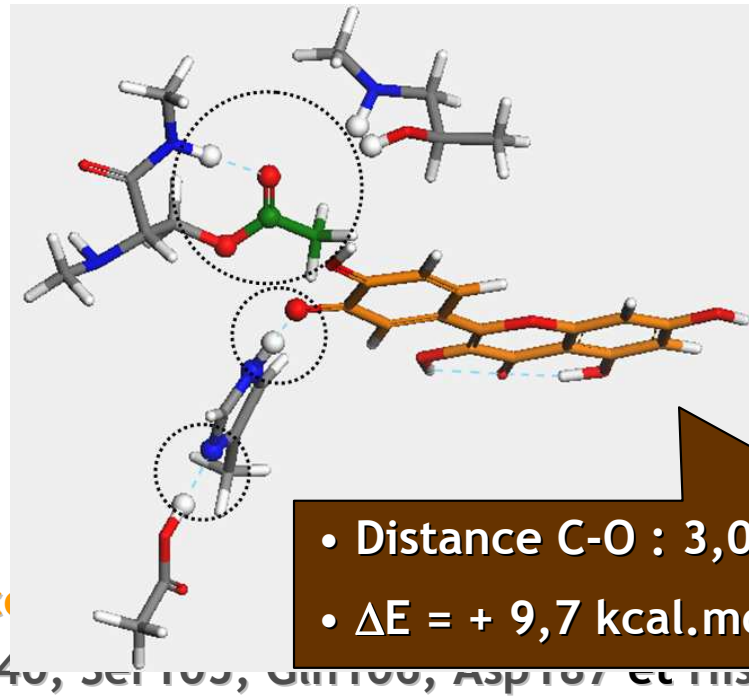
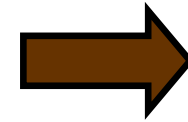
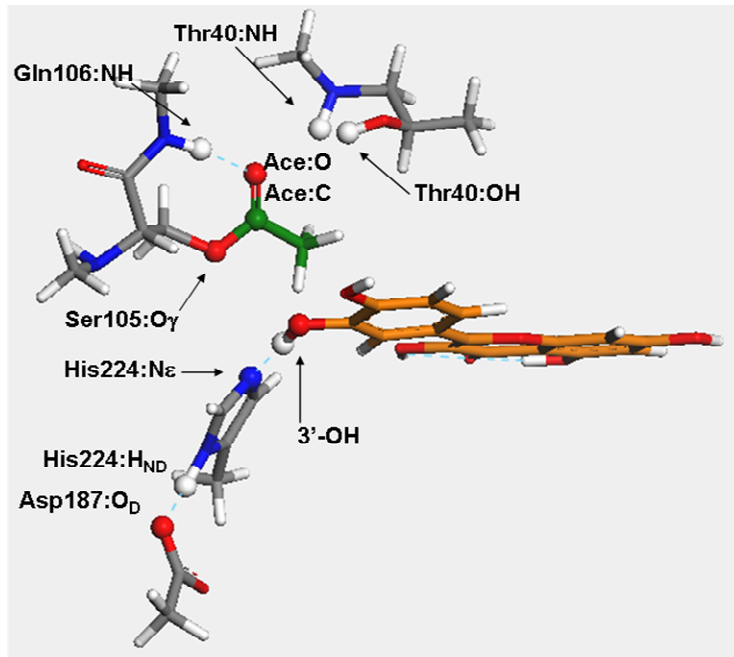
- Liaison C-O : 1,48 Å
- $\Delta E = + 9,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$

FLAVONOÏDE AGLYCONE : QUERCÉTINE

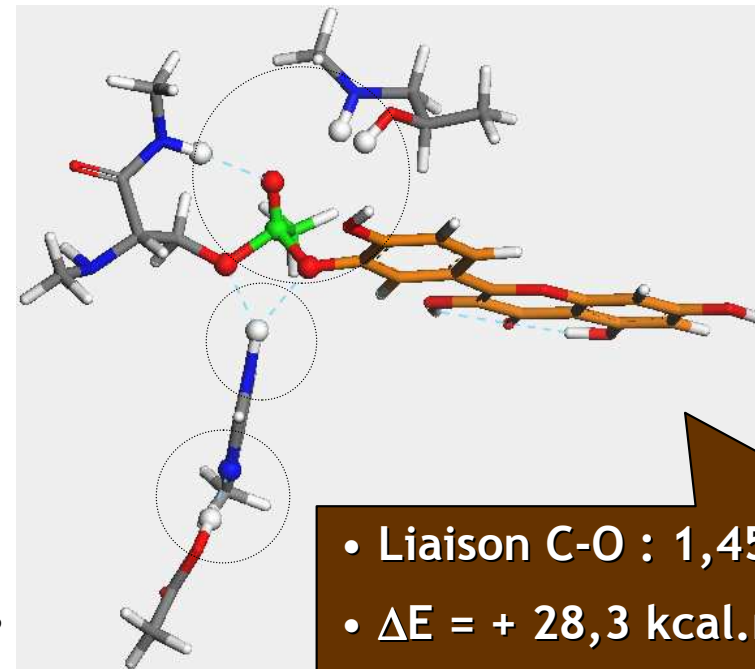
QUERCÉTINE

Intermédiaire tétraédrique non formé

Complexe de Michaelis



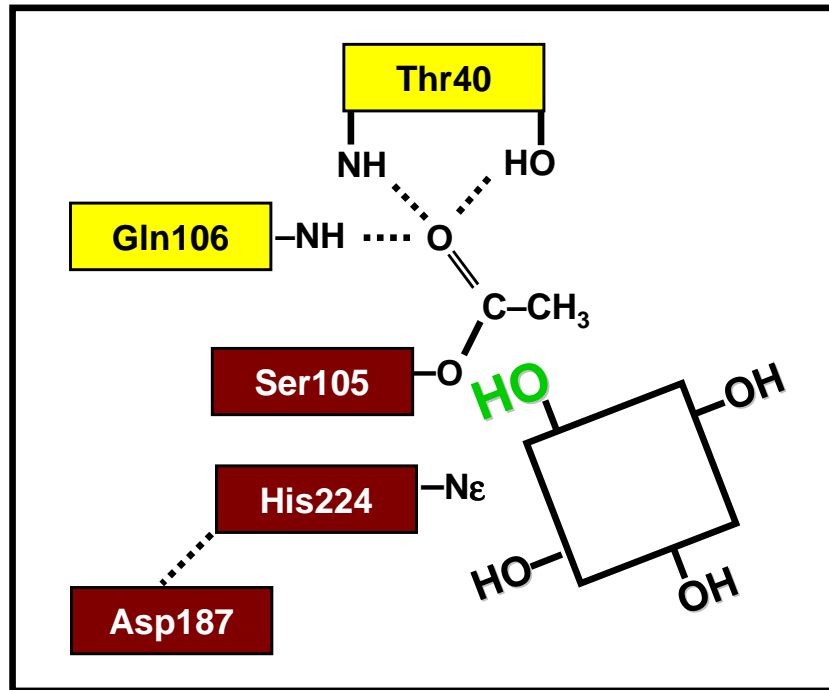
Intermédiaire tétraédrique



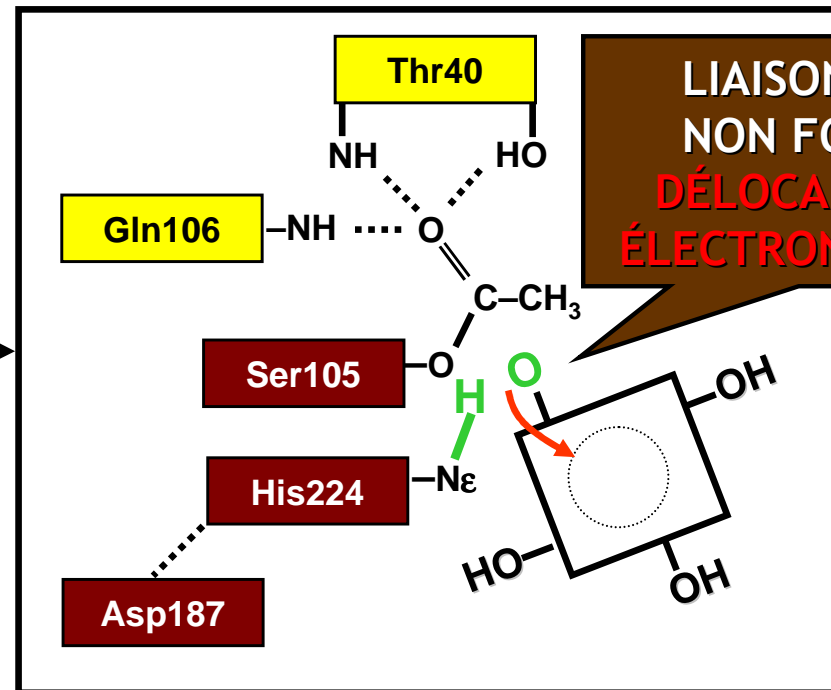
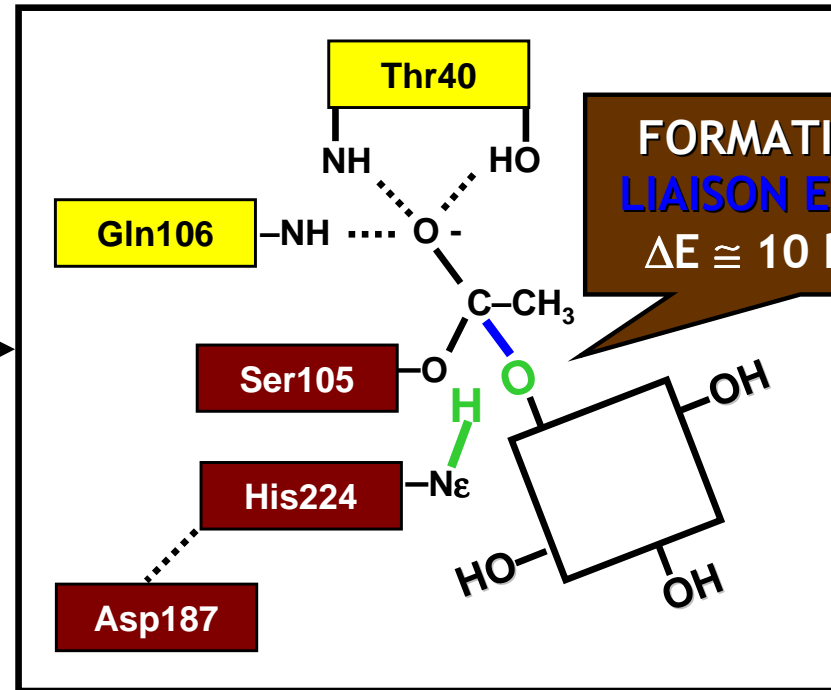
PROBLÉMATIQUE 3 : RÉACTIVITÉ DES FLAVONOÏDES

Dans le cas de la CALB, la nature des groupements hydroxyle (OH) des flavonoïdes qui atteignent les résidus catalytiques peut-elle aussi contribuer à la sélectivité ?

PROBLÉMATIQUE 3 : RÉACTIVITÉ DES FLAVONOÏDES



FONCTI FONCTION PHÉNOL



STRUCTURE DE LA PRÉSENTATION

1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE

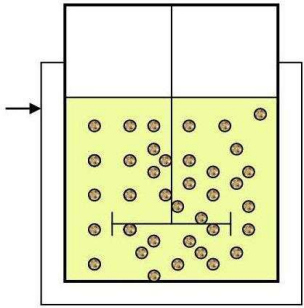
- DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES
- OBJECTIF GÉNÉRAL

2. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

- OBTENTION DES DES STRUCTURES
- PROBLÉMATIQUE 1 : RÉGIOSÉLECTIVITÉ DU PROCÉDÉ
- PROBLÉMATIQUE 2 : SPÉCIFICITÉ ENZYMATIQUE
- PROBLÉMATIQUE 3 : RÉACTIVITÉ DES FLAVONOÏDES

3. CONCLUSIONS / PERSPECTIVES

CONCLUSIONS / PERSPECTIVES

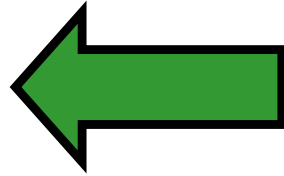


Résultats
expérimentaux
de biosynthèse

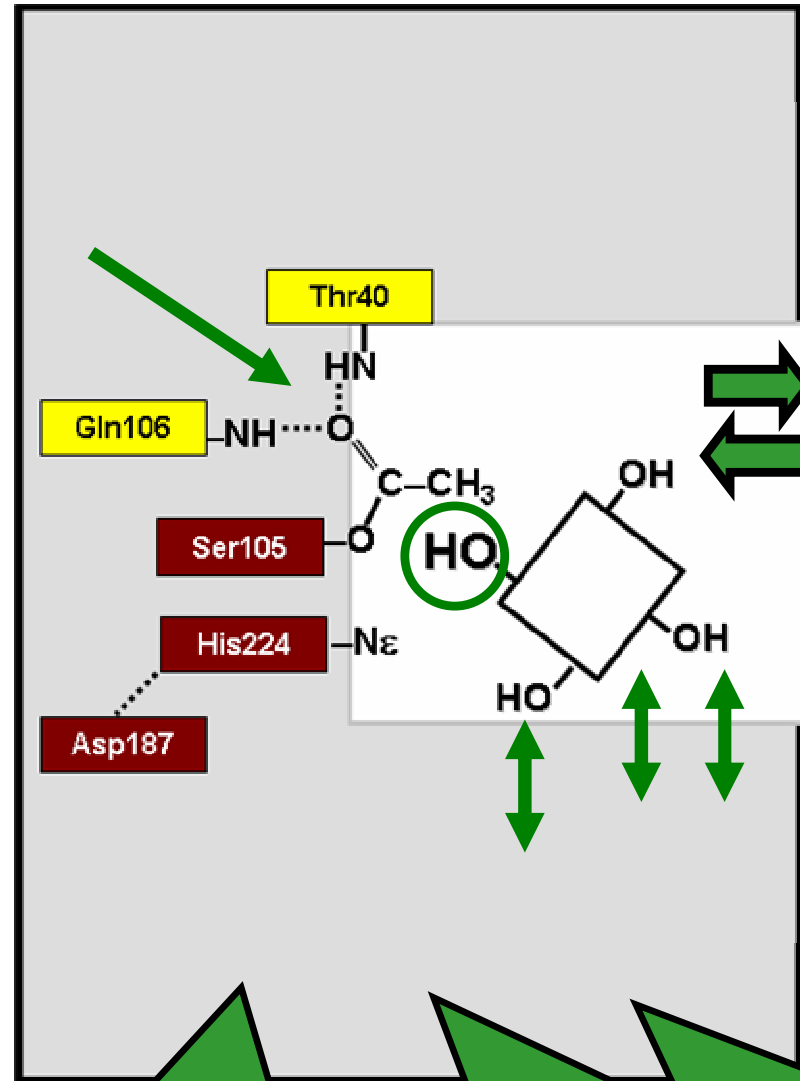
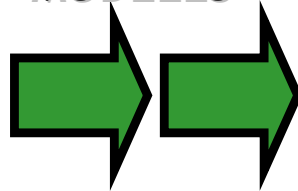


Outils de
modélisation
moléculaire

TESTER LE POUVOIR
PRÉDICTIF AVEC
D'AUTRES FLAVONOÏDES



ANALYSE DES
MODÈLES



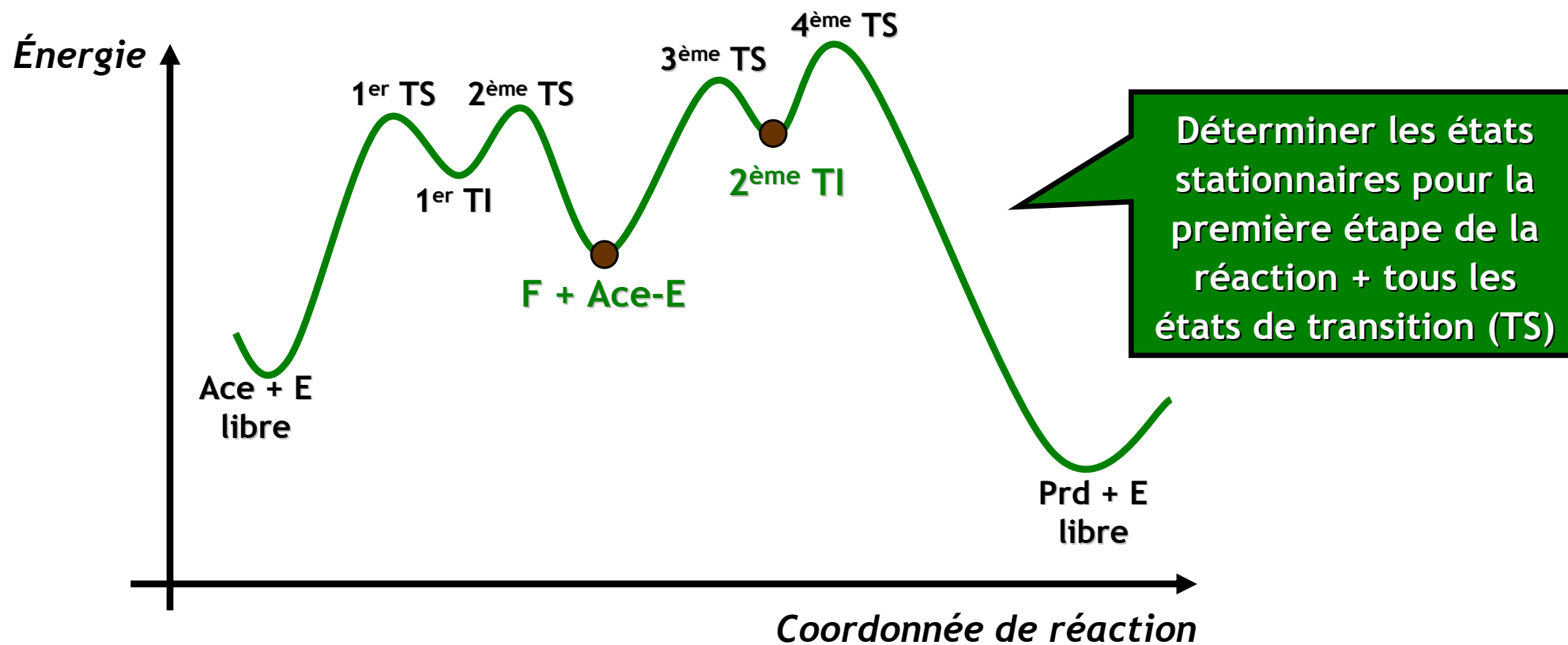
DOC DYN
Posi
orienta
flavo

DYNA
temp

CHIMIE QUANTIQUE :
Réactivité chimique des
groupements hydroxyle proches
des résidus catalytiques

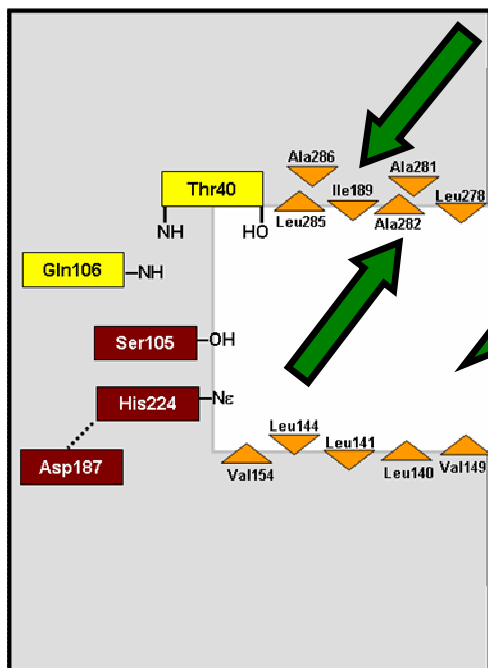
AUTRES PERSPECTIVES

- (1) Réactivité des substrats : profil énergétique complet des réactions (DFT)
- (2) Vérifications expérimentales *via* mutagénèse dirigée
- (3) Construction de modèles avec de donneurs d'acyle à chaîne plus longue
- (4) Construction de modèles en présence de solvants organiques
- (5) Application de simulations hybrides QM/MM

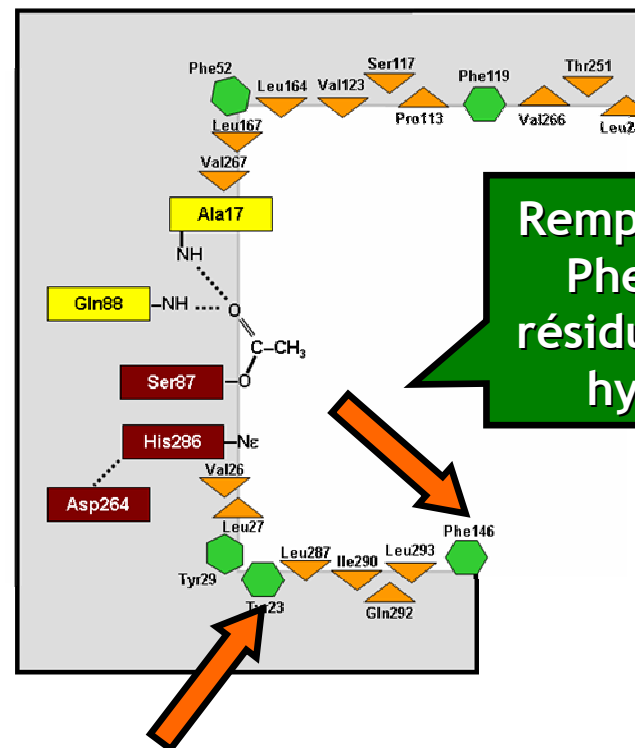


AUTRES PERSPECTIVES

- (1) Réactivité des substrats : profil énergétique complet des réactions (DFT)
- (2) Vérifications expérimentales *via* mutagenèse dirigée**
- (3) Construction de modèles avec de donneurs d'acyle à chaîne plus longue
- (4) Construction de modèles en présence de solvants organiques
- (5) Application de simulations hybrides QM/MM



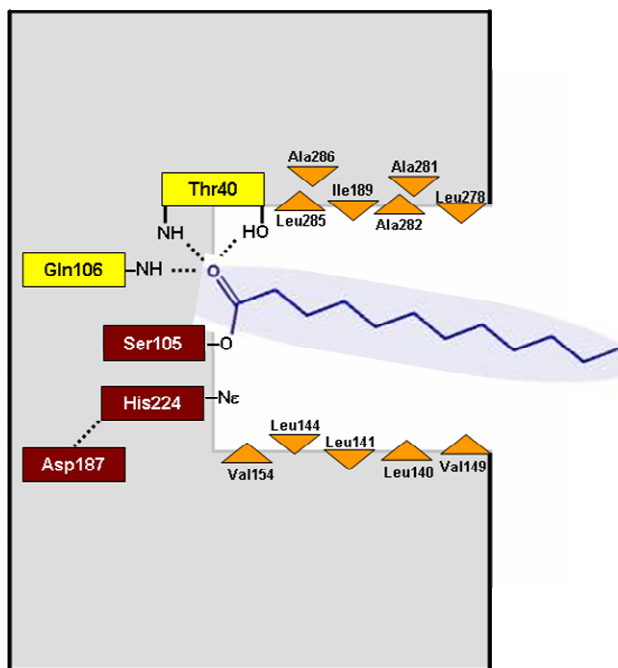
Remplacer Ile189 et Ala282 par des résidus aromatiques.



Remplacer Tyr23 et Phe146 par des résidus aliphatiques hydrophobes.

AUTRES PERSPECTIVES

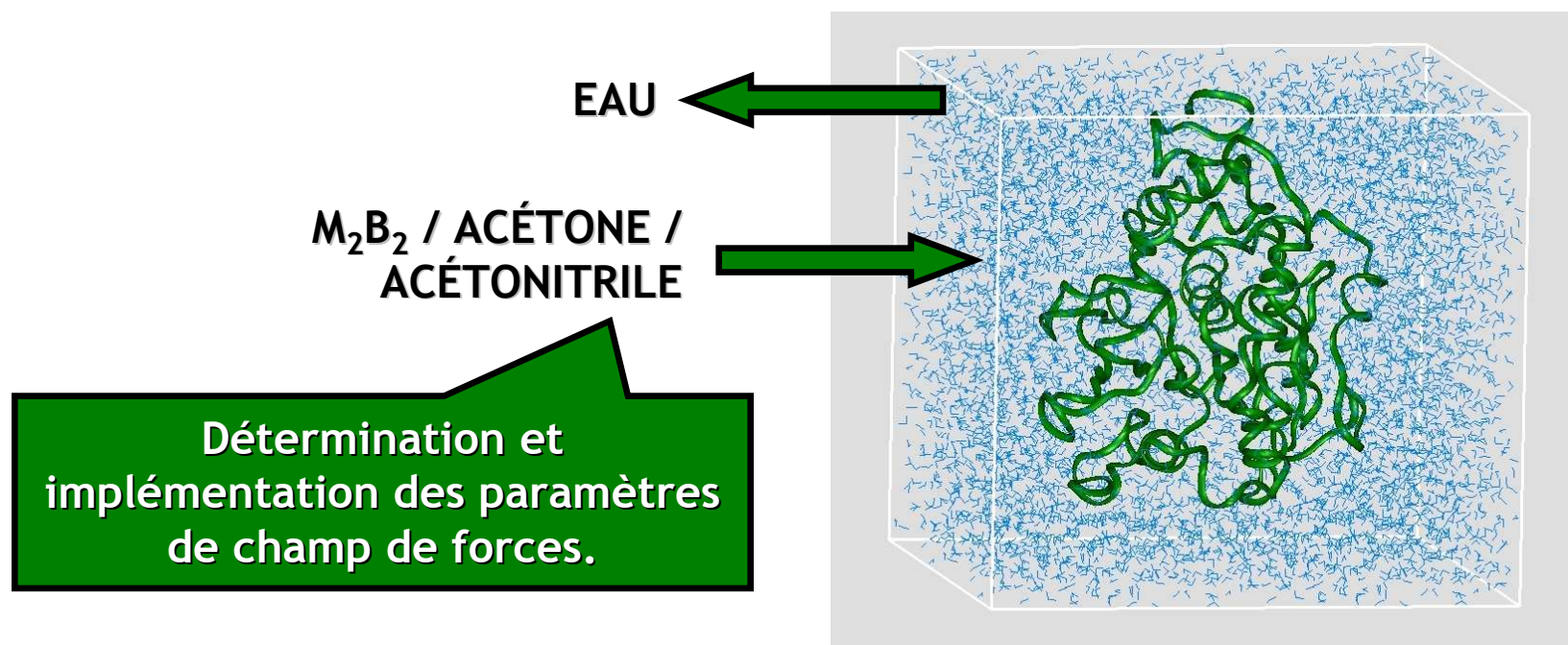
- (1) Réactivité des substrats : profil énergétique complet des réactions (DFT)
- (2) Vérifications expérimentales *via* mutagenèse dirigée
- (3) Construction de modèles avec de donneurs d'acyle à chaîne plus longue**
- (4) Construction de modèles en présence de solvants organiques
- (5) Application de simulations hybrides QM/MM



Disposition spatiale de la chaîne acyle et interactions formées par celle-ci.

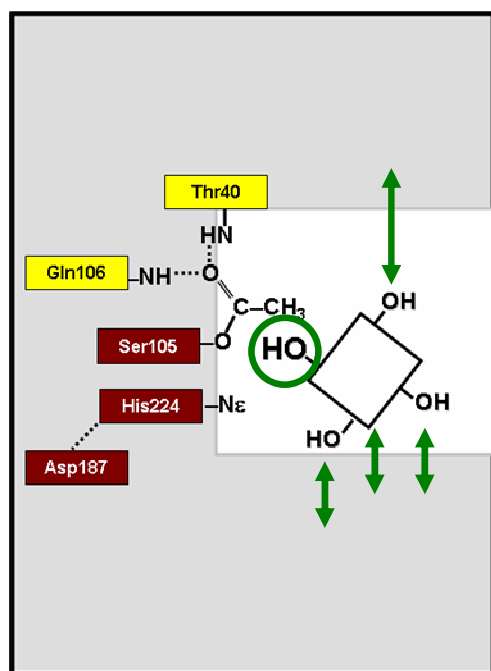
AUTRES PERSPECTIVES

- (1) Réactivité des substrats : profil énergétique complet des réactions (DFT)
- (2) Vérifications expérimentales *via* mutagénèse dirigée
- (3) Construction de modèles avec de donneurs d'acyle à chaîne plus longue
- (4) Construction de modèles en présence de solvants organiques**
- (5) Application de simulations hybrides QM/MM



AUTRES PERSPECTIVES

- (1) Réactivité des substrats : profil énergétique complet des réactions (DFT)
- (2) Vérifications expérimentales *via* mutagénèse dirigée
- (3) Construction de modèles avec de donneurs d'acyle à chaîne plus longue
- (4) Construction de modèles en présence de solvants organiques
- (5) Application de simulations hybrides QM/MM**



Evaluation de la réactivité du flavonoïde (par QM) et des interactions ES (par MM) au cours d'une même simulation.

ONT CONTRIBUÉ À CE TRAVAIL :

- Catherine HUMEAU ✓
- Elaine Rose MAIA ✓
- Evelyne RONAT ✓
- Jean-Marc ENGASSER ✓
- Mohamed GHOUΛ ✓
- Bernard MAIGRET ✓
- Gérald MONARD ✓
- Manuel RUIZ-LOPEZ ✓



MERCI !