Développement de catalyseurs d'oxydation bio-inspirés pour une chimie plus respectueuse de l'environnement

Yoann Roux

▶ **To cite this version:**

Yoann Roux. Développement de catalyseurs d'oxydation bio-inspirés pour une chimie plus respectueuse de l'environnement. Chimie inorganique. Université Paris-Saclay, 2015. Français. NNT : 2015SACLS142 . tel-01638199v1

HAL Id: tel-01638199

https://theses.hal.science/tel-01638199v1

Submitted on 20 Nov 2017 (v1), last revised 12 Jan 2018 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2015SACLS142

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à l'Université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE N° 571
Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes

Spécialité de doctorat : Chimie

Par

M. Yoann ROUX

Développement de catalyseurs d'oxydation bio-inspirés pour une chimie plus respectueuse de l'environnement

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 27 novembre 2015 :

Composition du Jury :

M. D. Mandon, Directeur de Recherche, Université de Bretagne Occidentale, Rapporteur

M. S. Ménage, Directeur de Recherche, CEA Grenoble, Rapporteur

M. B. Boitrel, Directeur de Recherche, Université de Rennes 1, Président du jury

Mme C. Aroulanda, Maître de Conférences, Université Paris-Sud, Examinatrice

M. F. Avenier, Maître de Conférences, Université Paris-Sud, Examinateur

M. J-P. Mahy, Professeur, Université Paris-Sud, Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie respectueusement Messieurs Stéphane Ménage, Dominique Mandon et Bernard Boitrel qui ont accepté de juger mon travail.

Je tiens ensuite à remercier M. Salmon, Directeur du Laboratoire de Chimie Bio-organique et Bio-inorganique, pour son accueil au sein de son équipe.

J'aimerais remercier plus particulièrement mon Directeur de thèse M. Jean-Pierre Mahy, pour m'avoir permis de réaliser mon doctorat au sein de son groupe. Sa confiance et son expertise ont été précieuses.

Par ailleurs, cette thèse n'aurait pas été possible sans mon co-encadrant M. Frédéric Avenier, rédacteur du projet. Tout au long de ce travail de recherches, son intérêt pour mes résultats positifs comme négatifs m'a permis de garder une forte motivation. Je lui adresse toute ma reconnaissance pour ses conseils avisés et ses qualités humaines.

Mes remerciements s'adressent également à Mme Christie Aroulanda, dont l'expertise en RMN a été très formatrice. Je la remercie du temps qu'elle a pu m'accorder dans cette collaboration.

Enfin, je remercie l'ensemble de l'équipe, ses permanents, post-doctorants et thésards, avec lesquels j'ai pu partager de bons moments au quotidien, enrichissant ces trois années de thèse de beaucoup d'émotions. Je garderai en mémoire de nombreuses anecdotes vécues en compagnie d'Alexandre Tréhoux, remarquable « compagnon de paillasse », Wadih Gathas, véritable « Clayden », ainsi que Khaled Cheaib, étonnant « cristalliseur ».

Sommaire

Abréviations 10

Introduction générale 14

Chapitre I : Introduction bibliographique 17

I) Les hydroxylases à fer ou à cuivre associées à un partenaire de type réductase 17

I-A) Les systèmes héminiques de type cytochrome P450 17

I-B) Les systèmes non-héminiques binucléaires de fer et de cuivre : le cas de l'enzyme méthane monooxygénase (MMO) 24

I-B-1) La méthane monooxygénase dite soluble (MMOs) 24

I-B-2) La méthane monooxygénase dite « particulaire » (MMOp) 27

I-B-3) D'autres enzymes binucléaires à fer ou à cuivre utilisant une sous-unité réductase. 28

I-C) Les systèmes non-héminiques mononucléaires à fer ou à cuivre 29

I-C-1) Les mononucléaires de fer 29

I-C-1-a) Les catéchols dioxygénases 30

I-C-1-b) Les Rieske dioxygénases 32

I-C-1-c) Les systèmes α-cétoglutarate dépendant (α-KG) 34

I-C-1-d) Les hydroxylases biopterin-dépendantes 36

I-C-1-e) Les enzymes ayant des propriétés particulières 37

I-C-2) Les enzymes mononucléaires de cuivre 39

I-C-2-a) Les monooxygénases 39

I-C-2-b) Les oxydases 39

II) Catalyse d'oxydation bio-inspirée

II-A-I) Catalyse d'oxydation bio-inspirée utilisant des oxydants chimiques dans les solvants organiques 40

II-A-1) Catalyseurs d'oxydation inspirés des cytP450 40

II-A-2) Catalyseurs d'oxydation inspirés de la MMO(s ou p) 42

II-A-3) Catalyseurs d'oxydation inspirés des enzymes mononucléaires non-héminiques à fer ou à cuivre 44

II-A-4) Catalyseurs de type macromoléculaire 46

II-4-1-a) La catalyse homogène 46

II-4-1-b) La catalyse hétérogène 47

II-B) Catalyse d'oxydation bio-inspirée utilisant le dioxygène dans les solvants organiques 49

II-B-1) Les matériaux réalisant des réactions d'oxydation avec O_2 en solvant organique 49

II-B-2) Les systèmes moléculaires réalisant des réactions d'oxydation avec O_2 en solvant organique 50

II-B-2-a) Les systèmes à base de métalloporphyrines 50

II-B-2-b) Les systèmes à base de cuivre 51

II-B-2-c) Les systèmes à base de fer 53

II-B-2-d) Les systèmes macromoléculaires 55

II-C) Catalyse d'oxydation bio-inspirée fonctionnant dans l'eau 57

II-C-1) Les systèmes utilisant des oxydants chimiques 57

II-C-1-a) Les systèmes moléculaires 57

II-C-1-b) Les systèmes supramoléculaires 58

II-C-1-c) L'élaboration de nouveaux biocatalyseurs hybrides 61

II-C-2) Les systèmes utilisant O_2 62

II-C-3) Les polyéthylèneimines (PEI) en tant que modèles d'architectures protéiques 68

II-D) Conclusion 71

Chapitre II : Description du projet 81

Chapitre III : Synthèse et caractérisation des différentes matrices polymériques 84

I) Synthèses des polymères fonctionnalisés 84

II) Quantification des polymères PEI fonctionnalisés par RMN ^1H 88

II-A) Présentation de la méthode 88

II-B) Gamme étalon et expériences de corrélations 94

II-C) Quantification : étude cinétique 94

II-D) Spectres typiques et quantification des PEIFg synthétisés 98

III) Conclusion 103

Chapitre IV : Synthèse des catalyseurs d'oxydation 105

I) Synthèse des ligands et des complexes mononucléaires de fer(III) et de fer(II) 105

I-A) Synthèse des ligands 105

I-B) Synthèse et caractérisation des complexes mononucléaires de fer 108

I-B-1) Complexes de fer(III) 108

I-B-2) Complexes de fer(II) 110

I-B-3) Autre complexe de Fe(II) synthétisé 113

II) Synthèse de ligands homoditopiques pour la synthèse de complexes binucléaires de fer(III) 115

III) Synthèse des ligands porphyriniques et des complexes métalliques correspondants 116

III-A) Synthèse des porphyrines base libre 116

III-B) Synthèse des complexes de porphyrines. 117

IV) Autres complexes disponibles au laboratoire et utilisés au cours de cette thèse 118

IV-A) Métalloporphyrines 118

IV-B) Complexes binucléaires de fer 119

IV-C) Complexes mononucléaires de cuivre 119

V) Conclusion 120

Chapitre V : Catalyse d'oxydation avec H_2O_2 122

I) Réactions d'oxydation catalysées par des complexes mononucléaires de fer(II) : comparaison des réactions réalisées dans MeCN et dans H_2O 122

II) Catalyse des réactions d'oxydation par des complexes mononucléaires de fer(II) dans l'eau en présence de polymère fonctionnalisé (PEIF) 125

II-A) Incorporation du catalyseur dans le polymère 125

II-B) Oxydation de divers substrats par H_2O_2 catalysée par Fe(II)BPMENG dans l'eau en présence de polymère fonctionnalisé. 128

II-C) Catalyse d'oxydation avec des complexes binucléaires de fer 129

II-D) Catalyse d'oxydation avec des porphyrines de fer et de manganèse 129

III) Conclusion 131

Chapitre VI : Réalisation de la partie réductase 133

I) Choix du cofacteur redox 133

I-A) Complexes de ruthénium photoactivables 133

I-B) La FMN, une molécule naturelle 135

II) Construction d'une réductase artificielle par incorporation de la FMN dans un PEI fonctionnalisé (PEIF) 137

II-A) Incorporation de la FMN dans le polymère PEIFg 0.20/0.30 137

II-B) Etude de la réduction de la FMN par NADH dans l'eau 138

III) Conclusion 150

Chapitre VII : Assemblage de l'enzyme artificielle 152

I) Utilisation de complexes de ruthénium photosensibles 152

II) Utilisation de la FMN incorporée au sein des polymères 153

II-A) Réduction de porphyrines de manganèse(III) 153

II-A-1) Utilisation du polymère PEIFg 0.20/0.30 153

II-A-2) Etudes de l'influence du pH sur la réduction de Mn^{III}TPyP 158

II-A-3) Influence de la nature des polymères sur la réduction des porphyrines de manganèse (III) 159

II-B) Etude de la réduction des métalloporphyrines Mn(III)TMPyP, Mn(III)TPPS et Fe(III)TDCPP 165

III) Réduction de complexes métalliques non-héminiques 168

III-A) Réduction du complexe de cuivre $[Cu^{II}(TPA)H_2O](OTf)_2$ 168

III-A-1) Suivi de la réduction par UV-visible 168

III-A-2) Suivi de la réduction par RPE 170

III-B) Réduction d'un complexe binucléaire de fer $[Fe^{III}_2(N\text{-}EtHPTB)(CH_3O)(CH_3OH)(H_2O)_2](ClO_4)_4$ 172

IV) Conclusion 173

Chapitre VIII : Catalyse d'oxydation utilisant O_2 dans l'eau 176

I) Association d'un complexe de ruthénium photosensible avec un complexe binucléaire de fer comme catalyseur 176

II) Utilisation de la réductase artificielle associée avec les métalloporphyrines (« synzyme ») 178

II-A-1) Etude impliquant le polymère fonctionnalisé PEIFg 0.20/0.30 178

II-A-2) Influence de la nature des polymères modifiés sur l'oxydation du thioanisole par O_2 catalysée par Mn(III)TF_5PP 179

II-A-3) Oxydation d'autres substrats par O_2 catalysée par le « synzyme »..... 180

III) Utilisation de la réductase artificielle associée à des complexes non-héminiques de cuivre et de fer..... 182

III-A) Oxydation du thioanisole par O_2 dans l'eau, catalysée par des complexes non-héminiques de cuivre et de fer, en présence de PEIFg 0.20/0.30..... 182

III-A-1) Influence des proportions de PEIFg 0.20/0.30 sur l'activité catalytique des complexes non-héminiques de cuivre et de fer..... 182

III-A-2) Influence du pH sur l'activité catalytique en présence de PEIFg 0.20/0.30 des complexes non-héminiques de cuivre et de fer..... 183

III-B) Influence de la nature des polymères sur l'oxydation du thioanisole par O_2..... 184

III-B-1) Réaction de catalyse d'oxydation se déroulant dans l'eau distillée..... 184

III-B-2) Influence du pH sur la catalyse en milieu tamponné..... 189

III-B-3) Etudes cinétiques de la réaction d'oxydation du thioanisole catalysée par les deux complexes Fe^{III}_2(HTPDP) et Cu^{II}TPA..... 191

III-B-4) Catalyse d'oxydation sur de nouveaux substrats..... 193

IV) Conclusion..... 193

CHAPITRE IX : Conclusion générale et perspectives..... 196

I) Conclusion générale..... 196

II) Perspectives..... 198

Partie expérimentale..... 200

I) Matériels et Méthodes..... 200

I-A) Spectroscopie d'absorption électronique UV/visible..... 200

I-B) Spectrométrie de masse..... 200

I-C) Diffraction des rayons X..... 200

I-D) Spectroscopie de résonnance magnétique nucléaire (RMN)..... 201

I-D-1) RMN ^{1}H et ^{13}C des ligands..... 201

I-D-2) RMN ^{1}H des polymères..... 201

I-E) Spectroscopie électronique de fluorescence..... 201

I-F) Chromatographie en phase gazeuse (GC)..... 201

I-G) Electrochimie 201
I-H) Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) 201
I-I) Irradiation 202

II) Synthèse des ligands 202

II-A) Synthèse du ligand N,N'-dimethyl-N,N'-bis(2-(3,5-diméthyl-4-méthoxy-pyridylméthyl)éthane-1,2-diamine (BPMENméthoxy ou 1) 202
II-B) Synthèse du ligand *N*,*N*'-diméthyl-*N*,*N*'-bis(2-pyridylméthyl)-éthane-1,2-diamine (BPMEN ou 2) 203
II-C) Synthèses du ligand *N*,*N*'-diméthyl-*N*,*N*'-bis(2-pyridylmethyl)-N-(3-guanidino (amino) propane)éthane-1,2-diamine (BPMENG) 204

II-C-1) Etape 1 : synthèse du composé **3** 204
II-C-2) Etape 2 : synthèse du composé **4** 205
II-C-3) Etape 3 : synthèse du composé **5** 205
II-C-4) Etape 4 : synthèse du composé **6** 206
II-C-5) Etape 5 : synthèse du composé **7** 207
II-C-6) Etape 7 : Synthèse du produit final **BPMENG** 208

II-D) Synthèse du ligand porphyrine TPyP 209

III) Synthèse des complexes 210

III-A) Synthèse des complexes portant un ligand de type BPMEN 210

III-A-1) Synthèse du complexe $[Fe^{III}(BPMEN)Cl_2]PF_6$ 210
III-A-2) Synthèse du complexe $Fe^{II}(BPMEN)Cl_2$ 211
III-A-3) Synthèse du complexe $[Fe^{II}(BPMEN)(CH_3CN)_2](SbF_6)_2$ 212
III-A-4) Synthèse du complexe $[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENméthoxy)_2Cl_2](CHCl_3)_4\,Cl_2$ 213
III-A-5) Synthèse du complexe $[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENG)_2Cl_2]Cl_4$ 214
II-A-6) Synthèse du complexe $[Fe^{II}BPMENGCl_2]Cl$ 214
III-A-7) Synthèse du complexe $[Fe^{II}(BPMENG)(CH_3CN)_2](SbF_6)_3$ 215

III-B) Complexes de type porphyrine 216

III-B-1) Synthèse du complexe $Fe^{III}TPyPCl$ 216
III-B-2) Synthèse du complexe $Fe^{III}TMPyPCl$ 217

IV) Synthèse des polymères modifiés 218

IV-A) Preuve de concept 218

IV-A-1) Preuve de concept de la guanidilation des amines primaires 218

IV-A-2) Preuve de concept de la fonctionnalisation des amines primaires et secondaires par l'acide 4-(bromométhyl)benzoïque 219

IV-B) Synthèse des polymères fonctionnalisés 220

V) Expériences réalisées sur l'enzyme artificielle 223

V-A) Incorporation de la FMN 223

V-A-1) Expérience UV-Visible 223

V-A-2) Expérience de fluorescence 223

V-B) Incorporation du catalyseur dans le polymère 223

V-B-1) UV-Visible 224

V-B-2) Fluorescence des porphyrines 224

V-C) Expériences de réduction 224

V-C-1) Caractérisation de la réduction de la FMN par UV-Visible 224

V-C-2) Caractérisation de la réduction et de l'oxydation des métalloporphyrines par UV-Visible 225

V-C-3) Caractérisation de la réduction et de l'oxydation du complexe de cuivre $[Cu^{II}(HGPBP)Cl]ClO_4$ par RPE et UV-Visible 225

V-C-4) Caractérisation de la réduction du complexe de fer $[Fe^{III}_2(N\text{-}EtHMPTB)(CH_3OH)_2(H_2O)_2](ClO_4)_4$ 226

V-D) Electrochimie 227

VI) Expérience de catalyse 227

VI-A) Pousse seringue 227

VI-B) Photo-catalyse 227

VI-C) Enzyme artificielle 227

VI-D) Traitement des catalyses et conditions de GC des substrats 228

ANNEXES 230

I) Données cristallographiques 230

II) Données RMN 238

Abréviations

1D ou 2D : Une ou deux dimension(s)
3,5 DBTC : 3,5-ditertbutylcatechol
2,4 DTBP : 2,4ditert-butylphenol
6-HPA : 1,2-bis[2-{bis(2-pyridylméthyl)aminométhyl}-6-pyridyl]éthane
7-NEtppz : 3,3'-(1,4-diazepane-1,4-diyl)bis[1-(4-ethylpiperazine-1-yl)propan-2-ol]
4,5-PCD : Protocatéchuate-4,5-dioxygénase
4-Rpy : Dérivé de pyridine
α-KG : α-cétoglutarate
Å : Angstrom
aa : Acide(s) aminé(s)
AAAH : Hydroxylase d'acides aminé aromatiques
ACCO : Acide 1-Aminocyclopropane-1-carboxylique oxydase
AcOEt : Acétate d'éthyle
ADN : Acide désoxyribonucléotide
AgCl : Chlorure d'argent
$AgSbF_6$: Hexafluoroantimonate d'argent
AMO : Ammoniaque mono-oxygénase.
AO : Amine oxidase
AQ : Temps d'acquisition
Ar : Aromatiques
bac : 2,6-Bis(aminométhyl)-*p*-cresol
BDPTZ : 1,4-bis(2,2'-dipyridylméthyl)phthalazine.
BH_4 : Tétrahydrobioptérine
Bn_2en : *N,N*-dibenzyl-éthylènediamine
Bn-TPEN : (*N*-benzyl-*N,N',N''*-tris(2-pyridylméthyl)-1,2-diaminoéthane)
bpa : Bis(2-pyridylméthyl)amine
Bpbpa : *N*-(4-((5H-dipyrido[3,2-c:2',3'-e]azépin-6(7H)-yl)méthyl)benzyl)-1-(pyridin-2-yl)-N-(pyridin-2-ylméthyl) méthanamine)
BphC : 2,3-dihydroxybiphényl-1,2-dioxygénase
BPMCN : (*N,N'*-bis-(2-pyridylméthyl)-N,N'-dimethyl-*trans*-1,2-diaminocyclohexane
BPMEN : *N*,*N*'-diméthyl-*N*,*N*'-bis(2-pyridylmethyl)-*N*-éthane, 1,2-diamine)
BPMENG : *N*,*N*'-diméthyl-*N*,*N*'-bis(2-pyridylmethyl)-*N*-(3-guanidino(amino)propane) éthane-1,2-diamine
BPMENméthoxy : *N,N'*-diméthyl-*N,N'*-bis(2-(3,5-diméthyl-4-méthoxy-pyridylméthyl)éthane-1,2-diamine
bpy : 2,2'-bipyridine,
BSP : 6,6'-((1*E*,1'*E*)-([1,1'-binaphthalène]-2,2'-diylbis(azanylylidène))bis(méthanylylidène))bis(2-(tertbutyl)-4-(phénylthio)phénol)
Bu_4 : Tétra-*tert*-butyl
CaOx : Catéchol oxidase
CAS : Clavaminate synthase
Cat : Catalyseur
$CDCl_3$: Chloroforme deutéré
CF_3CO_2Me : Acide trifluoroacétique méthylé
$CHCl_3$: Chloroforme
CH_3OH : Méhanol
ChPCl : p-*méso*-tetrakis-[*0*-((3-hydroxy-5-cholenyl)amido)phényl)porphyrine
ClO_4 : Perchlorate
CO_2 : Dioxyde de carbone

CO : Monoxide de carbone
Cp* : Pentaméthylcyclopentadiènyle
CPR : Cytochrome P450 réductase
CTAHS : Cétyltriméthylammonium
Cyb_5 : Cytochrome b_5
CYB5R : Cytochrome b_5 réductase
cytP450 : Cytochrome P450
DAOCS : Déacétoxycephalosporine C synthase
DβM : Dopamine β-monooxygénase
DBT : Dibenzothiophène
DCM : Dichlorométhane
DDQ : 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DELTA : Temps de diffusion
dfp : 2,6-Diformylpyridyl
DHPR : NADPH dépendante dihydroptérine réductase
DHA : 9,10-dihydroanthracène
DHP : Dihexadécylphosphate
DMF : Diméthylformamide
DMS : Diméthylsulfure
Dnbpn : *N,N'*-dinéopentyl-*N,N'*-bis(2-pyridylméthyl)-1,2-éthanediamine
DODAC : Chlorure de diméthyl-dioctadécylammonium
DOHDA·Br : Bromure de di-(11-hydroxyundecyl)diméthylammonium
DOSY : Diffusion Ordered SpectroscopY
DPPC : dipalmitoyl phosphocholine
E° : Potentiel d'oxydoréduction
ee : Excès énantiomérique
ESI-MS HR : Spectrométrie de masse haute résolution
EXAFS : Extended X-Ray Absorption Fine Structure
FAD : Flavine adénine dinucléotide
FID : Free Induction Decay
FMN : Flavine mononucléotide
[G-3]COO^- : Troisième génération de dendrimères couplant des ligands terphényle carboxylate
GO : Galactose oxydase
GPZ : Gradient de polarité le long de l'axe Z
h : Heure(s)
H_2 : Dihydrogène
H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
HBF_4 : Acide tétrafluoroborique
HBPMP : 2,6-bis[(bis(2-pyridylméthyl)amino)méthyl]-4-méthylphenol
HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1- pipérazine éthane sulfonique
hfacac : Hexafluoroacétylacetone
HGO : Homogentisate 1,2-dioxygénase
HGPBP : 1-(bis((2-pyridyl)methyl)amino))-3-((guanidino)amino) propan-2-ol
HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPCD : Homoprotocatechuate 2,3 dioxygénase
HPPD : 4-hydroxyphényl pyruvate dioxygénase
HTPDP : *N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylméthyl)-2-hydroxy-1,3-diaminopropane
Hq : Hydroquinone
kDa : Kilodalton
$KHSO_5$: Hydrogénopersulfate de potassium
KIE : Effet isotopique cinétique
KPF_6 : Hexafluorophosphate de potassium

L :	Ligand
L^{Ph4} :	*N,N,N',N'*-tetrakis[(1-méthyl-2-phényl-4-imidazolyl)méthyl]-1,3-diamino-2-propanolate)
M :	$mol.L^{-1}$
m-CPBA :	Acide *méta*-chloroperbenzoïque
MCOs :	Oxydases à cuivre multiple
MDH :	Méthanol déshydrogénase
Mebipym :	2-méthyl-2,2'-bipyrimidine
MeCN :	Acétonitrile
MeOH :	Méthanol
MES :	Acide 2-(*N*-morpholino)éthane sulfonique
MHz :	Mégahertz
min. :	Minute(s)
MMOB :	Sous-unité régulatrice de la MMOs
MMOH :	Sous-unité hydroxylase de la MMOs
MMOR :	Sous-unité réductase de la MMOs
MMOs :	Méthane monooxygénase soluble
MMOp :	Méthane monooxygénase particulaire (membranaire)
MOF :	Metal organic framework (matériaux de métaux organiques)
[mono] :	Concentration en monomère
MPC :	Métapyrocatécholase
NaOH :	Hydroxyde de sodium
$N(Et)_3$:	Triéthylamine
N-EtHPTB :	*N,N,N',N'*-tetrakis(*N*-éthyl-2-benzimidazolylméthyl)-2-hydroxy-1,3-diaminopropane
N4Py :	*N*,*N*-bis(2-pyridylméthyl)-bis(2-pyridyl)méthylamine)
$NaBH_4$:	Tétrahydruroborate de sodium
$NaBH_3CN$:	cyanoborohydrure de sodium
NAD(P)H :	Nicotinamide adénine dinucléotide (phopsphate)
NaOCl :	Hypochlorite de sodium
NDO :	Naphtalène 1,2 dioxygénase
NIH-shift :	Migration d'hydrogène intramoléculaire
nm :	Nanomètre
N-ter :	*N*-terminal
O_2 :	Dioxygène
O_2Car^{Tol} :	2,6-di(*p*-tolyl)benzoate
OAc :	Acétate
OTf :	Triflate
Ox :	Oxydé(e)
PCA :	Pyridine carboxaldoxime
Pc^t :	Phtalocyanine
PEI :	Polyéthylèneimine
PEIF :	Polyéthylèneimine modifiée
PEIFac :	Polyéthylèneimine modifiée avec des groupements carboxylate et octyle
PEIFg :	Polyéthylèneimine modifiée avec des groupements guanidinium et octyle
PEO :	Oxyde de polyéthylène
pH :	Potentiel hydrogène
Ph_3CCO_2 :	Acide triphényléthanoïque
Phen :	2-[4'-carboxyphenyl)]-imidazo[4,5-f]-[1,10]- phénanthroline
PHEOH :	Phénylalanine hydroxylase
PhIO :	Iodosylbenzène
PHM :	Peptidiglycine monooxygénase alpha hydroxylante
PMO :	Polysaccharide monooxygénase

PPh_3 : Triphénylphosphine
ppm : Partie par million
PPO : Oxyde de polypropylène
POM : Polyoxométallate
PS : Polystyrène
Rf : Rapport frontal
RMN : Résonance magnétique nucléaire
Ru(II) * : Ruthénium (II) à l'état excité
S/B : Signal/ bruit
SbF_6^- : Hexafluoroantimonate
SHC : Catalyseur hybride supramoléculaire
Sq : Semiquinone
T : Tesla
TDCPP : *méso*-5,10,15,20-tétra-2,6-dichlorophénylporphyrine
TauD : Taurine /alpha-KG-dioxygénase
TAPP : *méso* -5,10,15,20-tétraaminophénylporphyrine
TβM : Tyramineβ-monooxygénase
t-BuOOH : Hydroperoxyde de tert-butyl
TD : Time Domain
TDCPyP : *méso*-5,10,15,20-tétra-2,6-dichloropyridinylporphyrine
Teta : *N,N'*-(1-hydroxybenzyl)triéthyltétramines
TFA : Acide trifluoroacétique
THF : Tétrahydrofurane
TMC : 1,4,8,11-tétraméthyl-1,4,8,11-tétraazacyclotétradecane
TPA : Tris[(2-pyridyl)méthyl]amine)
TMPyP : *méso* -5,10,15,20-tétraméthylpyridininium porphyrine
TPF_5P : *méso* -5,10,15,20-tétrapentafluoropyridineporphyrine
TPPS : *méso* -5,10,15,20-tétrapyridinesulfonateporphyrine
TPyP : *méso* -5,10,15,20-tétrapyridinylporphyrine
TOMA : Trioctylammoniumtris(hydroxyméthyl)méthylamine
TON : Turn over number = nombre de cycle catalytique
Trp 677 : Tryptophane 677
TrpOH : Tryptophane hydroxylase
Ty : Tyrosinase
TyrOH : Tyrosine hydroxylase
WATERGATE : WATER-suppression by GrAdient-Tailored Excitation

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Depuis une trentaine d'années, les réactions d'oxydation réalisées de façon sélective jouent un rôle très important dans l'industrie chimique (agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique, etc…). C'est en effet le deuxième procédé le plus utilisé après les réactions de polymérisation et contribue à 30 % de la production de l'industrie chimique mondiale.[1] De nos jours encore, de nombreuses réactions d'oxydation se font à des températures et pressions élevées (comme par exemple la synthèse industrielle du méthanol à partir du méthane)[2] ou utilisent des oxydants toxiques à base de métaux lourds (cérium, chrome, etc…) qui sont la plupart du temps solubles uniquement dans les solvants organiques et qui produisent beaucoup de déchets. Dans le contexte actuel d'une prise de conscience mondiale de la nécessité de diminuer la production de déchets chimiques ainsi que l'utilisation de métaux lourds et toxiques, est né un concept méthodologique nommé chimie bio-inspirée,[3] l'objectif étant de s'inspirer des processus naturels les plus efficaces, de façon à concevoir des catalyseurs adaptés à un développement durable. Dans cette optique, s'inspirer des enzymes est rapidement apparu comme une évidence, notamment concernant le développement de nouveaux procédés d'oxydation éco-compatibles. Parmi ces enzymes, les métalloenzymes de type monooxygénase sont capables de réaliser des réactions d'oxydation sélective variées, par activation réductrice du dioxygène, et ce de manière très efficace (plusieurs milliers de cycles catalytiques). Malheureusement, l'utilisation directe de ces enzymes dans les procédés chimiques (bioconversion) est très limitée par des problèmes majeurs liés au clonage des gènes et à la stabilité des protéines. La volonté de s'inspirer de ces enzymes, et plus particulièrement de leur site actif, est donc vite apparue comme une solution de choix pour le développement de la chimie bio-inspirée.[4] Le but ultime est d'arriver à se rapprocher des conditions dans lesquelles les enzymes catalysent les réactions d'oxydation, tout en gardant une efficacité et une sélectivité importante.[5] Le développement de catalyseurs bio-inspirés mimant l'activité des enzymes, en étant capables d'utiliser directement le dioxygène en tant qu'oxydant, le tout dans l'eau, est donc un enjeu majeur pour profiter à la fois de la spécificité de l'enzyme et de la robustesse des catalyseurs synthétisés. Seuls quelques exemples de complexes de fer pouvant activer le dioxygène ont été étudiés[6,7,8,9] et parmi ceux-ci, seuls quelques-uns permettent de transférer un atome d'oxygène par activation d'une liaison C-H d'un substrat.[10,11,12,13] Cependant, aucun d'entre eux ne peut fonctionner comme un catalyseur à proprement parler, car ils ne réalisent pas plusieurs cycles catalytiques. En effet, ils manquent tous d'une source efficace d'électrons et de protons. En outre, la plupart de ces systèmes ont été développés dans des solvants organiques, ce qui constitue un problème majeur pour l'industrie chimique en matière de traitement des déchets. Le développement de nouveaux procédés utilisant l'eau comme solvant est donc un autre point important à prendre en considération. À notre connaissance, seuls quelques modèles le permettent.[14,15,16,17] C'est dans ce contexte que notre projet, visant à développer des systèmes catalytiques artificiels solubles dans l'eau et prenant en compte à la fois l'activation du dioxygène, l'apport spécifique d'électrons, ainsi que la disponibilité de protons au cours de la catalyse, a vu le jour. Afin d'atteindre notre objectif, nous proposons de concevoir des systèmes catalytiques

macromoléculaires solubles dans l'eau comprenant à la fois un centre métallique catalytique permettant d'activer O_2, et un cofacteur redox permettant d'acheminer les électrons d'un réducteur sacrificiel naturel vers le centre catalytique.

Dans la suite de ce manuscrit, la partie introduction bibliographique s'intéressera aux métalloenzymes et plus particulièrement aux hydroxylases à fer et à cuivre catalysant des réactions d'oxydation par activation réductrice du dioxygène de l'air, ainsi qu'à leurs modèles bio-inspirés.

Références

(1) Thayer, A. M. *Chem Eng News* **1992**, *70* (10), 27.

(2) *http://www.societechimiquedefrance.fr*.

(3) Hermans, I.; Spier, E. S.; Neuenschwander, U.; Turrà, N.; Baiker, A. *Top. Catal.* **2009**, *52* (9), 1162.

(4) Que, L.; Tolman, W. B. *Nature* **2008**, *455* (7211), 333

(5) Mayr, H.; Ofial, A. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (12), 1844.

(6) Thibon, A.; England, J.; Martinho, M.; Young, V. G.; Frisch, J. R.; Guillot, R.; Girerd, J.-J.; Münck, E.; Que, L.; Banse, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (37), 7064.

(7) Hong, S.; Lee, Y.-M.; Shin, W.; Fukuzumi, S.; Nam, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (39), 13910.

(8) Siewert, I.; Limberg, C. *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15* (40), 10316.

(9) Costas, M.; Mehn, M. P.; Jensen, M. P.; Que, L. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (2), 939.

(10) Ménage, S.; Galey, J.-B.; Dumats, J.; Hussler, G.; Seité, M.; Luneau, I. G.; Chottard, G.; Fontecave, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (51), 13370.

(11) Yamashita, M.; Furutachi, H.; Tosha, T.; Fujinami, S.; Saito, W.; Maeda, Y.; Takahashi, K.; Tanaka, K.; Kitagawa, T.; Suzuki, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (1), 2.

(12) Tshuva, E. Y.; Lee, D.; Bu, W.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (11), 2416.

(13) Zhao, M.; Helms, B.; Slonkina, E.; Friedle, S.; Lee, D.; DuBois, J.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Fréchet, J. M. J.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (13), 4352.

(14) Groves, J. T.; Ungashe, S. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (21), 7796.

(15) Schenning, A. P. H. J.; Hubert, D. H. W.; Van Esch, J.; Feiters, M. C.; Nolte, R. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33* (23-24), 2468.

(16) Schenning, A. P. H. J.; Spelberg, J. H. L.; Hubert, D. H. W.; Feiters, M. C.; Nolte, R. J. M. *Chem. - Eur. J.* **1998**, *4* (5), 871.

(17) Van Esch, J.; Roks, M. F. M.; Nolte, R. J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108* (19), 6093.

CHAPITRE I

Chapitre I : Introduction bibliographique

Ce chapitre introduira en premier lieu différentes familles d'hydroxylases avec des activités mono- et dioxygénase,[1,2] réalisant des réactions d'oxydation par activation réductrice du dioxygène grâce à un partenaire de type réductase. L'étude se poursuivra par une présentation non exhaustive de différents systèmes bio-inspirés fonctionnant avec des oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), pour nous focaliser par la suite sur les systèmes utilisant le dioxygène (O_2) comme source d'atomes d'oxygène. Enfin, nous terminerons par une présentation des catalyseurs fonctionnant dans l'eau.

I) Les hydroxylases à fer ou à cuivre associées à un partenaire de type réductase

I-A) Les systèmes héminiques de type cytochrome P450

Les cytochromes P450 (cytP450) représentent une des plus grandes familles d'enzymes avec plus de 18000 séquences identifiées dans toutes les branches de la vie.[3] C'est une enzyme ubiquitaire, réalisant des réactions d'oxydation impliquées dans de nombreux procédés vitaux comme, par exemple, la biosynthèse de stéroïdes ou de lipides, la dégradation de xénobiotiques afin de faciliter leur excrétion et la métabolisation de certains médicaments.[4,5] Il existe de nombreux types de cytP450.[6] Ici, nous ne nous intéressons qu'aux cytP450 à activité monooxygénase qui sont les plus répandus. Les cytP450 à activité monooxygénase possèdent un même groupe prosthétique, la protoporphyrine IX de fer(III), qui est liée à la protéine par une liaison de coordination entre son ion fer(III) et un atome de soufre d'un résidu cystéinate **(Schéma I.1).**

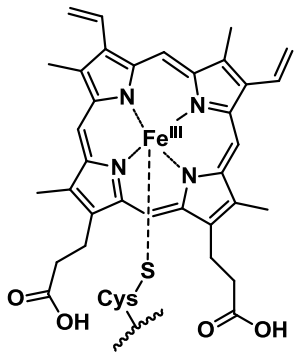


Schéma I.1 : Protoporphyrine IX de fer (III) lié à la protéine via une cystéine (hème).

La sélectivité et la réactivité des différents cytP450 vis-à-vis de leurs substrats, vont être contrôlées par l'architecture des structures tertiaires de ces protéines, principalement au niveau des différents sites actifs.[7] En effet, chaque acide aminé (aa) proche de l'hème joue un rôle fonctionnel au niveau de la catalyse (liaison et positionnement du substrat, stabilisation d'un état

d'oxydation du fer). De nombreuses structures tridimensionnelles de cytP450 obtenues par diffraction des rayons X, comme celles des cytP450$_{cam}$[8,9] et P450$_{BM-3}$[10], existent. Presque toutes sont des structures de cytP450 bactériens, car ceux-ci sont solubles dans l'eau alors que les cytP450 de cellules eucaryotes sont la plupart du temps membranaires, et donc difficiles à purifier. Toutefois, l'activité monooxygénase de ces deux types de cytP450 étant très similaire, ces structures vont nous renseigner aussi bien sur le mécanisme réactionnel des cytP450 bactériens que des cytP450 de cellules eucaryotes. Tout d'abord, les cytP450 sont des monooxygénases, c'est à dire qu'ils ne transfèrent qu'un seul atome d'oxygène sur un substrat donné. Ils catalysent cette réaction par activation réductrice du dioxygène de l'air, suivant un cycle catalytique qui a été presque totalement caractérisé dans le cas du cytP450cam, grâce à de nombreuses structures cristallines et données spectroscopiques de ses différents intermédiaires.[11] La dernière caractérisation en date étant celle de l'espèce fer(IV) radical cation du cytP450 CYP119 découverte par le groupe de Green et Rittle en 2010.[12] D'une manière générale, le cycle catalytique décrit pour le cytP450cam est communément accepté comme identique pour tous les cytP450 **(Figure I.1)**.

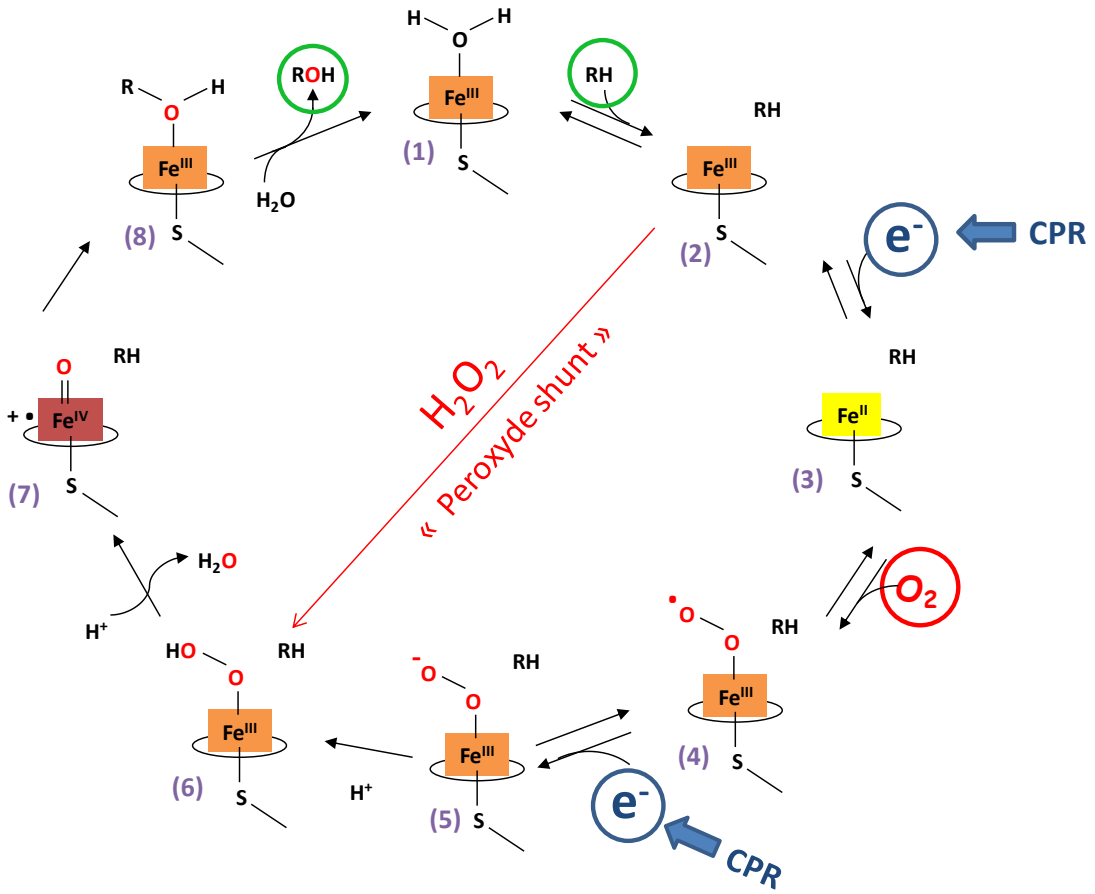


Figure I.1 : Cycle catalytique du cytP450cam, les couleurs différencient les différents états redox de l'hème.[11]

La première étape est la liaison et l'orientation de la molécule de substrat au site actif de l'enzyme, à proximité immédiate de l'hème. Le substrat ainsi lié induit un changement de conformation du site actif, entraînant le départ de la molécule d'eau, ce qui change également l'état de spin électronique du Fe(III) qui passe de bas spin (**Complexe 1**), à haut spin (**Complexe 2**).[13] Ce changement de spin entraîne un abaissement du potentiel d'oxydo-réduction (redox) de l'hème d'environ 100 mV,[14] ce qui favorise le transfert d'un électron provenant de la NADPH cytP450 réductase (CPR). Ce premier électron permet la réduction du Fe(III) en Fe(II) (**Complexe 3**). Une fois sous forme Fe(II), l'hème va être capable de fixer le dioxygène de l'air (qui est à l'état triplet et n'interagit donc pas avec l'hème Fe(III)), pour former un intermédiaire Fe(III)-superoxo **(4),** qui par transfert d'un deuxième électron va donner un intermédiaire Fe(III)-peroxo **(5).** Le groupement peroxo formé dans l'étape précédente est rapidement protonné par une molécule d'eau ou par des chaînes latérales d'acides aminés proches, formant ainsi un intermédiaire Fe(III)-hydroperoxo **(6).** Le transfert d'un deuxième proton à l'atome d'oxygène distal provoque l'hétérolyse de la liaison O-O, entraînant la libération d'une molécule d'eau et la formation d'une espèce Fe(IV) radical cation hautement réactive **(7)**.[12] En fonction du substrat et du cytP450 considérés, une grande variété de réactions peuvent-être catalysées : hydroxylations de liaisons C-H, époxydations d'alcènes, oxydations d'hétéroatomes (N, S), N et O-dé-alkylations.[15] Le mécanisme de ces oxydations est maintenant communément accepté comme étant un mécanisme appelé «oxygen rebound», postulé par Groves dès 1976 (**Schéma I.2**).[16,17,18]

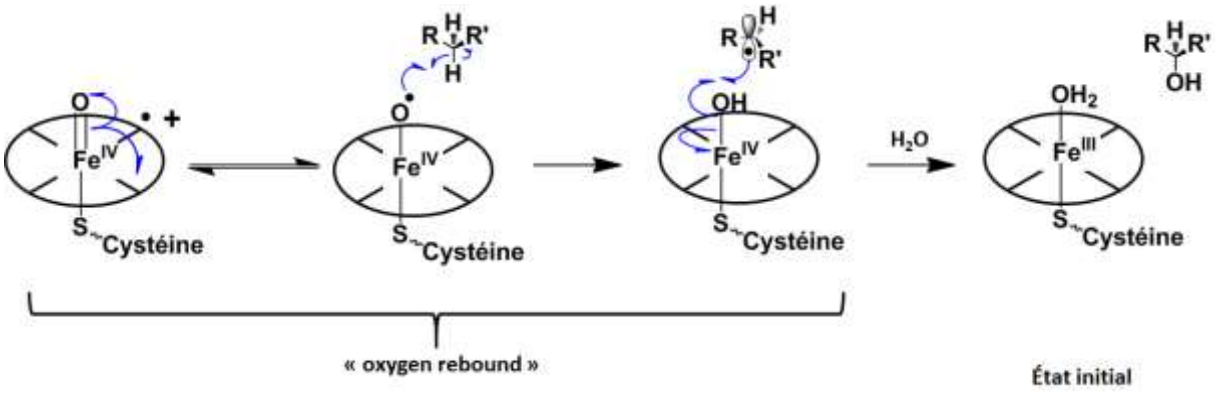


Schéma I.2 : Mécanisme d'hydroxylation d'une liaison C-H par le cytP450.

Le radical cation **(7)** va activer le substrat par abstraction d'un atome d'hydrogène, ce qui crée un radical à proximité du métal (et non un radical libre comme dans le cas de la « réaction de Fenton »[19,20,21]) plus réactif que la molécule de départ. Ce dernier va réagir avec le complexe Fe(IV)OH nouvellement créé suivant le mécanisme dit d'"oxygen rebound" pour former l'alcool correspondant **(8).** Une fois converti, le produit possède une structure moins affine pour le site actif et va donc être libéré pour laisser place à une molécule d'eau pour reformer le complexe Fe(III) bas spin **(1)**. À noter que le cycle catalytique peut être court-circuité suivant la réaction appelée "Peroxide Shunt" qui permet de passer de **(2)** à **(6)** par ajout de H_2O_2, qui constitue ainsi à la fois une source de protons, d'électrons et d'oxygène. Ce site catalytique comporte trois voies non productives :

- le composé **(4)** peut donner le composé **(2)** et produire l'ion superoxide par autoxydation,
- le composé **(6)** peut donner le composé **(2)** et produire H_2O_2,
- le composé **(7)** peut donner le composé **(2)** par une réduction à 2 électrons puis protonation produisant une molécule d'eau (« shunt oxidase »).

Ces voies non productives sont le résultat d'une mauvaise régulation entre le transfert de protons et d'électrons, ou peuvent être également dues à un mauvais positionnement du substrat.

Pour finir, les cytP450 sont aussi capables de réaliser des réactions d'oxydation d'aldéhydes *via* le complexe hydroperoxo (**6**), des réactions de décarbonylation *via* le complexe peroxo (**5**), et des oxydations aromatiques.[15]

Le point important à souligner à travers la description du cycle catalytique des cytP450 est la nécessité d'avoir des électrons à disposition à deux moments précis, d'abord pour réduire le Fe(III) héminique en Fe(II), puis pour former l'intermédiaire peroxo (**5**). Ces électrons doivent donc être acheminés séquentiellement au centre catalytique (hème), au bon moment au cours du cycle catalytique (**Schéma I.3**).[22]

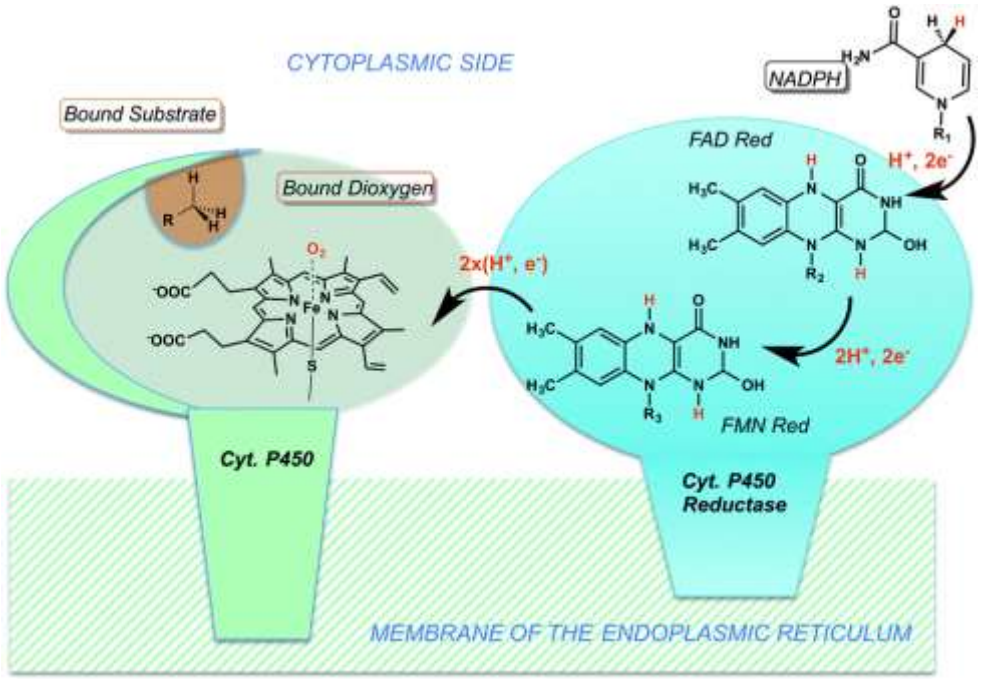


Schéma I.3 : Transfert d'électrons (classe II) à l'intérieur du complexe cytP450-CPR.[22]

Cet apport d'électrons est réalisé chez les cytP450 par une enzyme de type réductase. Suivant la composition de cette enzyme, les cytP450 sont différenciés en deux classes :

1) Classe I : Les cytP450s bactériens et mitochondriaux, responsables de la synthèse des stéroïdes, possèdent une réductase articulée autour de deux protéines, l'une possédant un cofacteur flavinique de type FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et l'autre un centre ferrédoxine (Fe-S) (**Schéma I.4**).[23]

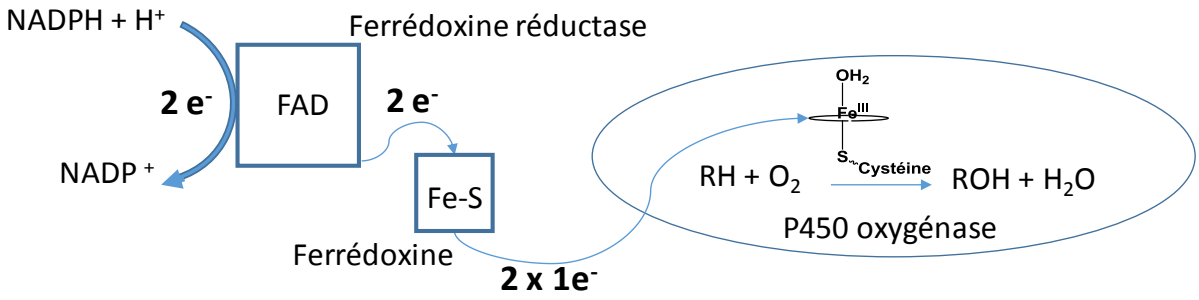


Schéma I.4 : Classe I des cytP450.

2) Classe II : Les cytP450 de microsomes humains, responsables de la métabolisation des médicaments, possèdent une réductase appelée NADPH cytochrome P450 réductase (CPR), articulée autour de deux cofacteurs redox flaviniques au sein d'une même protéine, une FAD et une FMN (Flavine MonoNucléotide) (**Schéma I.5)**.[24]

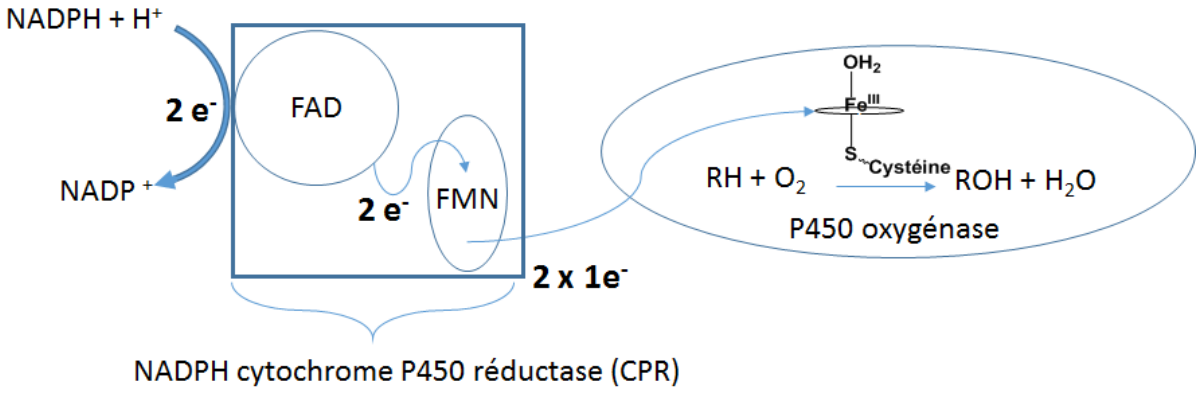


Schéma I.5 : Classe II des cytP450.

Il existe également trois autres classes minoritaires qui sont des mélanges des deux premières : un système où les deux électrons proviennent du NADH et sont transférés au cytP450 par la cytochrome b_5 réductase (CYB5R) *via* le cyb_5[25] et un système découvert chez Rhodococcus où une FMN est fusionnée avec une ferrédoxine (protéine Fe-S), le tout fusionné avec le cytP450.[26] Enfin, il existe des systèmes uniques qui ne dépendent pas d'un transfert d'électrons externe. Par la suite nous nous intéresserons plus particulièrement à la CPR, dont il n'existe qu'un seul type pour environ cinquante cytP450 microsomaux connus. La CPR a été cristallisée ce qui en facilite l'étude.[27] Dans la première étape, la FAD fonctionne comme une flavine déshydrogénase et accepte une paire d'électrons sous forme d'un ion hydrure provenant du NADPH. Ce transfert d'hydrure est régulé par le tryptophane 677 qui peut empêcher ou permettre l'interaction des deux cycles isoalloxazine et nicotinamide et donc permettre ou non le transfert d'un ion hydrure. Ensuite, la FAD va devoir transférer les deux électrons provenant du NADPH à la FMN, qui elle-même va les transférer à

l'hème, de façon séquentielle. Ce transfert d'électrons est un mécanisme extrêmement bien développé. En effet, tous les potentiels redox des composés mis en jeu sont idéalement choisis (**Schéma I.6**).[24]

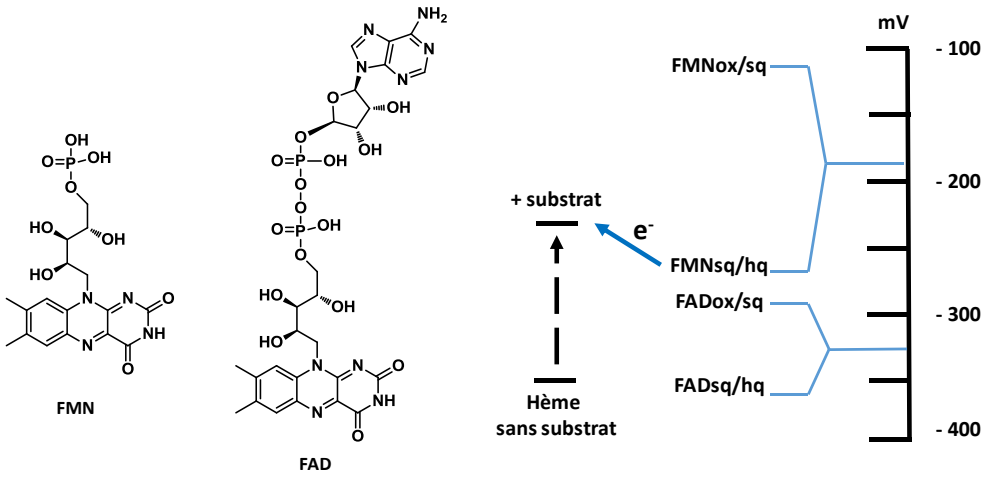


Schéma I.6 : Structure chimique et potentiels redox estimés des différentes flavines intervenant dans la réduction du cytP450 de microsomes humains.[24]

Comme on peut le voir sur le **Schéma I.6**, l'hème ne peut être réduit avant que le substrat ne soit incorporé au site actif du cytP450. Une fois le substrat présent, seule la FMN réduite (**FMNhq**) (**Schéma I.7**) peut transférer un électron à l'hème, et donc le réduire. Le cycle catalytique de cette réduction commence par l'état oxydé **FADox/FMNox**, mais comme l'espèce **FADox/FMNsq** est stable à l'air, nous pouvons décrire le cycle catalytique en commençant par cette espèce. Après réduction de **FADox/FMNsq** par NADPH pour donner **FADhq/FMNsq**, un transfert d'électrons entre les flavines a lieu, donnant le couple **FADsq/ FMNhq**. C'est cette dernière espèce qui va transférer ses électrons à l'hème. Pour conclure le couple **FADox/FMNox** est réduit à 3 électrons pour donner **FADsq/FMNhq**, qui fonctionne comme un réducteur à un électron. A noter qu'avec de hautes concentrations en NADPH, le couple **FADox/FMNox** peut être réduit à 4 électrons en **FADhq /FMNhq** par NADPH, et donc transférer deux électrons d'un coup. Toutefois, à cause de la grande stabilité de **FADox/FMNsq,** le cycle de réduction à un électron est le mécanisme privilégié *in vivo.*

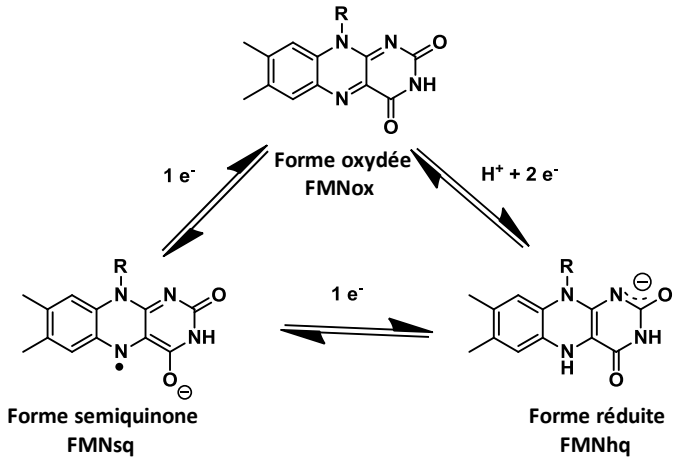


Schéma I.7 : Structure chimique de la FMN réduite à 1 ou 2 électrons, permettant la réduction du cytP450s de microsomes humains.

D'une façon générale, il est admis que la différence de potentiel entre le donneur d'électrons **FADsq/FMNhq** et l'accepteur (hème) est le moteur du transfert électronique. A cet effet, les changements d'état de spin et de potentiel redox lors de la fixation du substrat modulent la vitesse du transfert d'électrons et donc l'activité de la monooxygénase. A première vue, les électrons pourraient être transférés entre la flavine et l'hème par un chemin constitué d'environ 50 liaisons sigma le long de la chaîne peptidique reliant les deux cofacteurs. Un tel transfert n'est cependant pas envisageable puisque le calcul a montré que cela ne représentait qu'un transfert d'électron tous les 50 ans, ce qui est très loin de l'activité du cytP450, 17000 cycles catalytiques par minute pour le cytP450$_{cam}$ par exemple. Une autre façon d'expliquer le transfert d'électrons serait de supposer qu'il s'effectue par un transfert direct entre les deux cofacteurs, selon ce que l'on appelle l'effet tunnel. Mais la distance de 18 Å entre les deux cofacteurs semble encore trop importante puisqu'il a été démontré que la limite pour un tel transfert, par effet tunnel, serait de 14 Å. Il a donc été proposé que la FMN se rapproche de l'hème grâce à une oscillation de 10 Å de la protéine (**Schéma I.8**).[7]

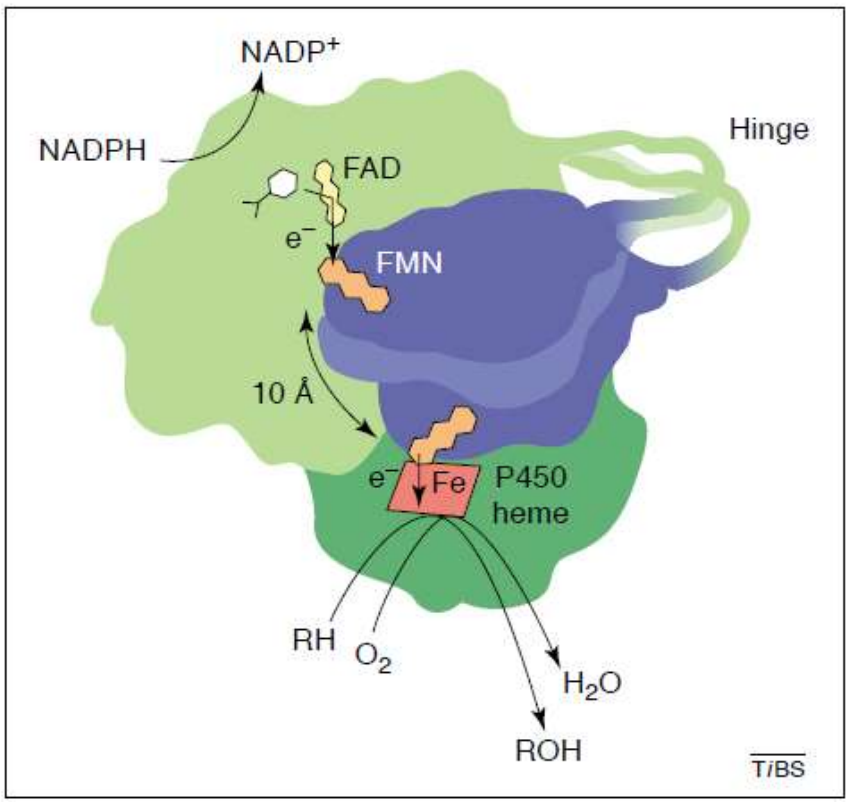


Schéma I.8 : Illustration du mouvement du domaine de la FMN nécessaire au transfert d'électrons.[7]

Pour conclure, les monooxygénases à cytP450 réalisent le transfert d'un atome d'oxygène sur un substrat par activation réductrice du dioxygène, dans l'eau, à température et pression douces. Cette activation réductrice met en jeu une deuxième enzyme, la NADPH-cytochrome P450 réductase, responsable de l'apport d'électrons au cycle catalytique du cytP450. Cet apport d'électrons est soumis à un contrôle très strict afin d'éviter toute perte d'énergie due à des voies non productives, comme la production d'ions superoxyde (autoxydation) ou de peroxyde d'hydrogène (protonation du peroxo) ou bien encore d'eau (« shunt oxydase »). En effet, le transfert d'électrons est beaucoup plus rapide que l'oxydation du substrat, ce qui nécessite de limiter leur apport au centre catalytique. Ce contrôle est opérationnel à deux niveaux. Tout d'abord, les potentiels redox des différentes espèces sont tels qu'un transfert d'électrons ne peut s'effectuer que si un substrat se trouve dans le site actif de l'enzyme. Enfin, la FMN doit être à proximité de l'hème pour le réduire, et grâce à un dynamisme moléculaire interne (respiration), le domaine de la FMN peut être plus ou moins proche et donc permettre ou non ce transfert.

Nous allons maintenant présenter les différentes familles d'hydroxylases possédant un site actif constitué au minimum de deux atomes de fer ou de cuivre.

I-B) Les systèmes non-héminiques binucléaires de fer et de cuivre : le cas de l'enzyme méthane monooxygénase (MMO)

La bactérie *methylococcus capsulatus* a été découverte par J.W. Foster et R. H. Davis en 1966. La particularité de cette bactérie est d'être méthane dépendante et de convertir des alcanes en alcool par activation réductrice du dioxygène de l'air comme, par exemple, le méthane en méthanol.[28] L'enzyme responsable de cette réactivité au sein de la bactérie est la méthane monooxygénase qui se présente sous deux formes distinctes : la forme dite particulaire (MMOp) localisée au niveau membranaire et dont le site actif contient du cuivre, et la forme dite soluble (MMOs), qui est exprimée en absence de cuivre (ou très faible concentration)[29,30] et possède un site actif à base de fer. La MMOs est capable de transformer une plus grande variété de substrats et est inhibée de façon irréversible par le cuivre.

I-B-1) La méthane monooxygénase dite soluble (MMOs)[31]

Comme le montre le **Schéma I.9**, la MMOs est constituée de trois sous-unités :

- MMOH la sous-unité hydroxylase (bleu et vert)
- MMOR la sous-unité réductase (rouge)
- MMOB la sous-unité régulatrice (rose)

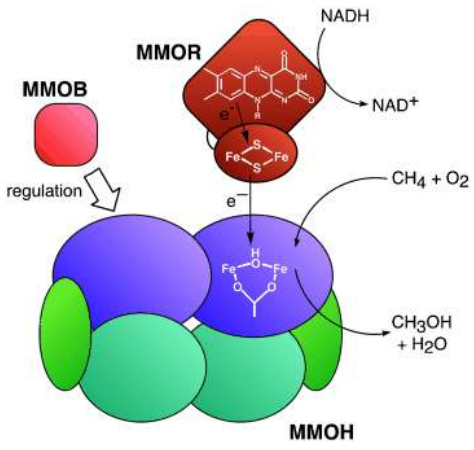


Schéma I.9 : Représentation schématique du mécanisme concerté des trois sous-unités de la MMOs.[31]

Une sous-unité hydroxylase MMOH[32] est un hétéro-dimère de 251 kDa, qui contient le site actif bi-nucléaire à fer (**Schéma I.10**)[31] réalisant l'oxydation du méthane en méthanol dont le cycle catalytique est présenté ci-dessous (**Schéma I.11**).[33]

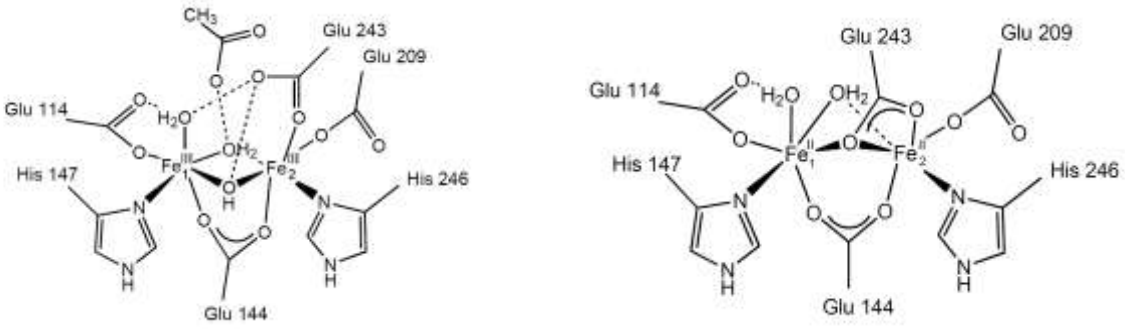


Schéma I.10 : Structure du site actif binucléaire à fer de la sMMO, à l'état MMOHox à gauche et MMOHred à droite.[31]

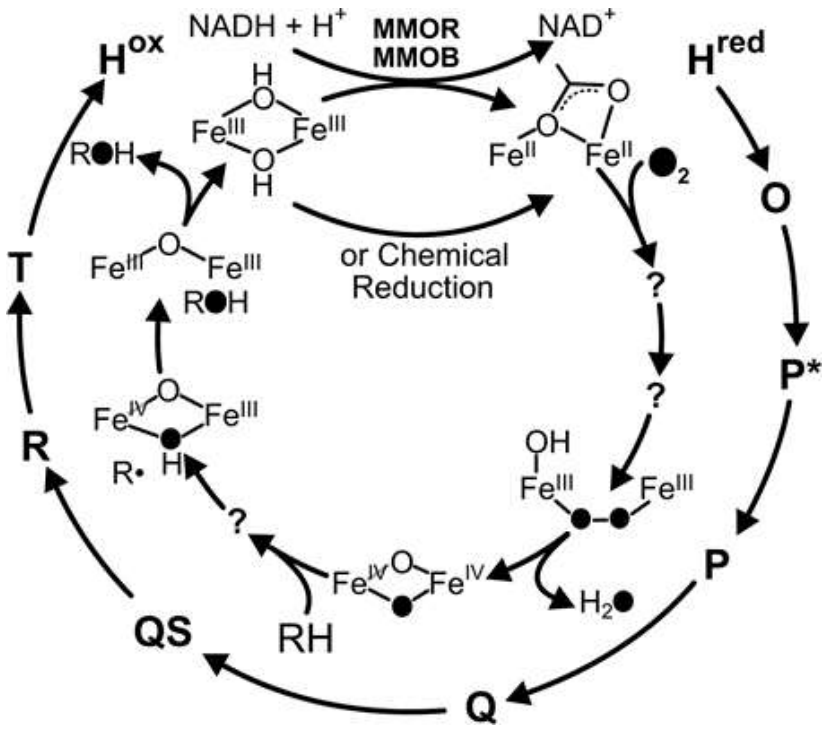


Schéma I.11 : Intermédiaires du cycle catalytique de la MMOH.[33]

Le point de départ de ce cycle catalytique est la réduction de l'espèce **Hox** (2 Fe(III)) par MMOR, pour donner l'espèce **Hred** (2 Fe(II)).[34] L'espèce **Hred** va alors pouvoir activer le dioxygène de l'air selon un mécanisme encore peu connu pour former l'intermédiaire bis-Fe(III)-peroxo **(P)**, qui lui-même va donner, après départ d'une molécule d'eau, l'intermédiaire bis-Fe(IV)-oxo **(Q).**[35] Ce dernier est l'espèce oxydante qui va permettre l'oxydation du substrat par un mécanisme d'abstraction d'hydrogène **(R)** et permettre le retour à l'état initial du site actif ainsi que le relargage du produit oxydé. Là encore, il est impératif d'amener les électrons de façon efficace et précise au centre métallique afin de réaliser la réaction désirée avec de nombreux cycles catalytiques. Ceci se fait grâce à la seconde sous-unité MMOR.

Cette seconde sous-unité, qui n'a jamais été cristallisée, est une NADH-oxydoréductase, composée d'un cluster [2Fe-2S] dans le domaine ferrédoxine (Fd) et d'un cofacteur FAD responsable de l'acheminement des électrons au site actif de la sous-unité hydroxylase (MMOH).[36,37] Les potentiels redox mis en jeu sont favorables à un transfert d'électrons du NADH vers MMOH (**Schéma I.12**).

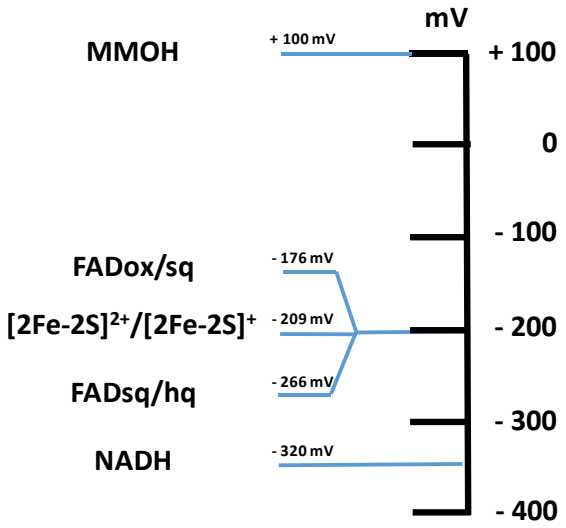


Schéma I.12 : Potentiel redox des différents couples mis en jeu dans la réduction de MMOH

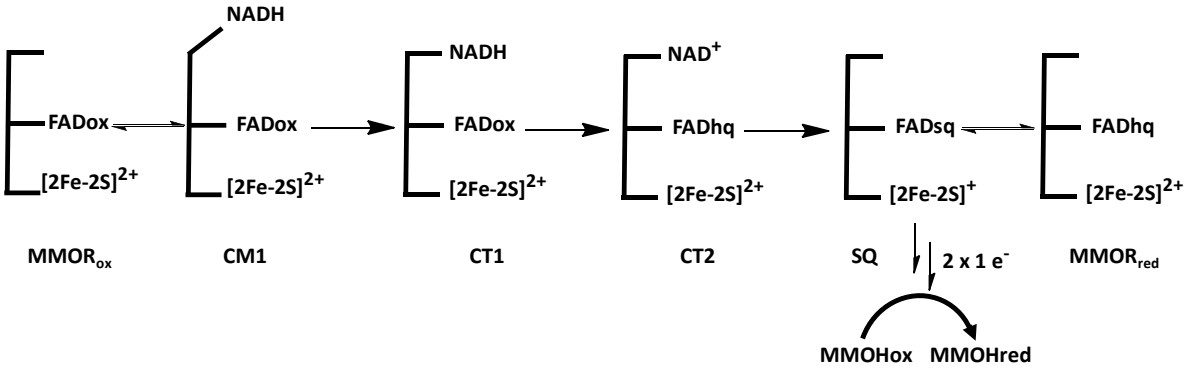


Schéma I.13 : Intermédiaires formés lors de la réduction intramoléculaire de MMORox.

Le cycle de réduction (**Schéma I.13**) commence par la liaison d'une molécule de NADH au domaine de la FAD pour passer de l'état oxydé (**$MMOR_{ox}$**) à un état de transition, supposé donner un complexe de Michaelis, i.e un complexe non-covalent entre le NADH et son substrat FAD (**CM1**), non caractérisé. Le premier intermédiaire observable, appelé (**CT1**) est assigné à un transfert de charge entre le cycle nicotinamide du NADH et le cycle isoalloxazine de la FAD (π-stacking). Il s'ensuit un deuxième transfert de charge, sous la forme d'un transfert d'ion hydrure du NADH vers le FAD donnant l'intermédiaire (**CT2**). Le départ du NAD^+ couplé à un premier transfert d'électron de FADhq vers le cluster $[2Fe\text{-}2S]^{2+}$ va donner l'espèce réductrice FADsq / $[2Fe\text{-}2S]^+$ (**SQ**) en équilibre avec la forme FADhq/$[2Fe\text{-}2S]^{2+}$ (**$MMOR_{red}$**). C'est le cluster [2Fe-2S] qui permet le transfert de deux fois 1

électron vers le site actif de MMOH. En effet, celui-ci se trouve à une distance de 14 Å du site actif, une distance idéale pour un transfert d'électrons.[38] La vitesse du transfert d'électrons est plus rapide entre NADH et FAD/[2Fe-2S] qu'entre FAD/[2Fe-2S] et MMOH. Une régulation de ce transport d'électrons est donc nécessaire.

Pour cela, une troisième sous unité, MMOB, possède quant à elle ce rôle de régulateur de l'activité catalytique de la MMOs.[39,40] En effet jusqu'à présent il était admis que le MMOB régulait le transfert d'électrons pour réguler l'activité cataytique.[31] Or des études récentes ont montré qu'en réalité, MMOB inhibait complétement le transfert d'électrons. Premièrement, la conformation de MMOB est modulée par l'état redox du site actif métallique. Lorsque le site actif est oxydé, l'extrémité N-ter de MMOB va être plus flexible, et ne va pas interagir très fortement avec MMOHox. MMOB se trouve donc en dehors du « canyon » (mis en avant dans la structure cristallographique) de MMOHox, empêchant du même coup l'entrée du substrat. Le fait que MMOB soit situé en dehors du « canyon » lorsque MMOH est oxydé permet à MMOR, du moins à sa partie ferrédoxine, de se lier, permettant ainsi la réduction du site actif (MMOHred). Cette liaison se faisant au même endroit que celle de MMOB, ceci met en évidence une compétition de liaison à MMOH entre MMOB et MMOR. Une fois MMOH réduit, l'extrémité N-ter de MMOB adopte une conformation plus ordonnée, produisant des interactions plus stables (π-stacking) avec MMOHred. MMOB lie très étroitement MMOHred, donc déplace MMOR en dehors du « canyon » de MMOH, et permet l'entrée du substrat, l'activation du dioxygène et l'oxydation du substrat.[41,42,43]

Pour conclure, MMOB régule le transfert d'électrons en inhibant celui-ci. Cette inhibition se fait de façon compétitive entre MMOB et MMOR.

I-B-2) La méthane monooxygénase dite particulaire (MMOp)[44]

La MMOp catalyse la même réaction que la MMOs. En revanche, très peu de données sont disponibles sur la façon dont est réduite cette enzyme ainsi que sur les intermédiaires formés lors de sa réaction avec O_2. Une des premières études réalisées met en avant que, plus la concentration en cuivre est élevée plus l'activité enzymatique augmente, ceci étant vrai jusqu'à une certaine concentration (trois équivalents Cu *vs* [MMO]).[29] Ceci laisse penser que l'ion (ou les ions) métallique(s) dans le site actif serai(en)t des ions cuivre. En 2005, cette enzyme MMOp a été cristallisée.[45] Elle est constituée de trois sous-unités tout comme la MMOs, qui sont appelées spmoA, spmoB et spmoC. De plus, la MMOp est constituée de trois centres métalliques : un centre mononucléaire et un centre dinucléaire à cuivre localisés dans la région soluble de la sous-unité spmoB et un troisième centre métallique constitué d'un atome de zinc quant à lui situé à l'intérieur de la membrane. Cependant, l'étude ne démontre pas lequel des centres métalliques est le site actif. Les structures des trois centres métalliques ont été résolues par spectroscopie EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure) en 2006 (**Schéma I.14**).[46] Finalement, en 2010 a été démontré que le site actif de la pMMO était composé d'un centre bimétallique à cuivre(II).[47] Les auteurs de cette étude ont prouvé par mutagénèse dirigée que le site actif de la MMOp était effectivement un centre bis-cuivre(II) et non pas le centre mononucléaire à cuivre(II) se situant à proximité et dont le rôle n'a pas encore été identifié. Ce centre mononucléaire pourrait réaliser des réactions redox avec le centre dinucléaire. Ces résultats mettent bien en évidence la présence d'un

site actif formé par deux cuivres et non pas un site actif bis-fer(III),[48] ni un cluster trinucléaire à cuivre comme supposé précédement.[49] Le mécanisme de la réduction des cuivres est toujours inconnu mais pourrait être lié à l'interaction avec une protéine partenaire telle que la méthanol déshydrogénase (MDH).[50] En revanche, le mécanisme d'oxydation pourrait passer par un intermédiaire bis-cuivre(III).[51] Ces résultats permettent une nouvelle approche dans le développement de nouveaux catalyseurs éco-compatibles.

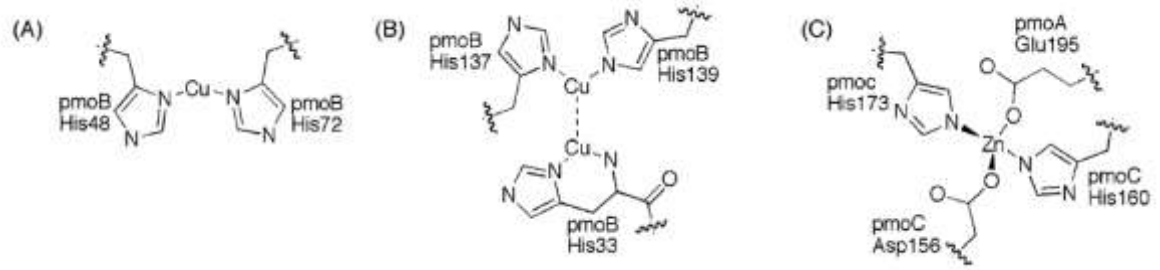


Schéma I.14 : Représentation schématique des centres métalliques (A) mononucléaire à cuivre, (B) dinucléaire à cuivre et (C) monucléaire à Zinc.[46]

I-B-3) Autres enzymes binucléaires à fer ou à cuivre utilisant une sous-unité réductase.

Il existe d'autres enzymes de type monooxygénase constituées d'un site actif bimétallique (fer ou cuivre), réalisant l'activation réductrice du dioxygène de l'air, grâce à un transfert d'électrons provenant d'une sous-unité réductase telles que :

- **Pour les enzymes à fer** : la toluène monooxygénase,[52] la « stéaroyl-acyl carrier protein » Δ^9 désaturase,[53] la ribonucléotide réductase.[54,55]

- **Pour les enzymes à cuivre**[56] **:**

Une première famille, dite des « oxydases à cuivres multiples » (MCOs),[57] dont les plus connues sont les laccases, comprend des enzymes qui contiennent au moins 4 atomes de cuivre. Elles permettent l'oxydation à un électron de nombreux substrats différents par activation réductrice du dioxygène et formation d'une molécule d'eau via un transfert d'électrons.[58]

Une deuxième famille dite des enzymes « di-nucléaires à cuivres couplés », comme la tyrosinase (Ty) ou la catéchol oxidase (CaOx), catalysent la réaction des *o*-diphénols en quinones. Leur site actif comprend deux centres mononucléaires Cu(I) reliés entre eux par un ligand et donc couplés. Leur caractéristique est de ne pas posséder de cofacteur redox.[56]

Une troisième famille, dite des enzymes « di-nucléaires à cuivres non –couplés » existe également. Ces enzymes qui comprennent la dopamine β-monooxygénase (DβM), la tyramine β-monooxygénase (TβM), et la peptidiglycine α-hydroxylase monooxygénase (PHM), contiennent deux cuivres à 11 Å de distance, sans ligand ponté donc sans couplage électronique. Elles catalysent l'oxydation de liaisons C-H secondaires, couplée à la réduction d'un atome d'oxygène en eau, ceci

grâce à l'apport de 4 électrons, deux provenant d'un cofacteur ascorbate et deux provenant du substrat.[56]

Pour conclure cette partie, il a été démontré que tous les systèmes avaient besoin d'un apport d'électrons pour fonctionner de façon catalytique, c'est à dire réaliser plus d'un cycle catalytique que l'on abrégera par TON (Turn Over Number) par la suite. Cet apport d'électrons se fait de manière différente suivant les enzymes, soit grâce à des cofacteurs redox, soit directement par les substrats. Pour finir, la différence entre oxydase et oxygénase provient du nombre d'électrons intervenant dans le mécanisme de la réaction : 2 électrons pour les monooxygénases, 4 électrons pour les oxydases ainsi que de leur réactivité vis-à-vis du dioxygène : transfert d'un atome d'oxygène pour les monooxygénases, réduction du dioxygène en eau pour les oxydases.

Nous allons maintenant présenter une troisième grande famille d'hydroxylases dont le site actif n'est constitué que d'un seul atome de cuivre ou de fer.

I-C) Les systèmes non-héminiques mononucléaires à fer ou à cuivre

Les enzymes mononucléaires non-héminiques catalysent une grande diversité de réactions dans le métabolisme des aa, des acides nucléiques, des acides gras ainsi que dans la dégradation de composés aromatiques et la biosynthèse d'antibiotiques comme la pénicilline. Ces enzymes catalysent l'oxydation d'un éventail de substrats beaucoup plus important que les enzymes héminiques et, contrairement à elles, utilisent une grande variété de sources d'électrons, qui sont souvent les substrats liés au métal ou des cofacteurs sacrificiels, qui permettent d'activer de façon réductrice le dioxygène de l'air pour réaliser les réactions désirées.

I-C-1) Les mononucléaires de fer

Cinq classes d'enzymes mononucléaires non-héminiques de fer ont été rapportées. Elles sont définies selon la nature de leur « cofacteur redox » qui peut être :

- (i) le substrat lui-même (catéchol dioxygénases),
- (ii) un cluster [2Fe-2S] (Rieske dioxygénases),
- (iii) un carboxylate de type α-cétoglutarate (enzymes α-cétoglutarate dépendantes),
- (iv) une bioptérine (hydroxylase ptérine-dépendante).[59]

Une cinquième classe regroupe les enzymes ayant un mode de fonctionnement différent.

Depuis quelques années, un grand nombre de structures d'enzymes mononucléaires non-héminiques de fer ont été cristallisées.[60,61,62] Ces structures ont permis de mettre en évidence un motif commun dans leur site actif. La plupart de ces enzymes mononucléaires possèdent une même géométrie faciale composée de deux histidines et d'un carboxylate appelée « triade faciale 2-His-1-carboxylate ». La sphère de coordination est complétée par trois molécules d'eau. L'atome de fer est le plus souvent au degré d'oxydation (+II) dans son état initial (**Schéma I.15**).[63,64]

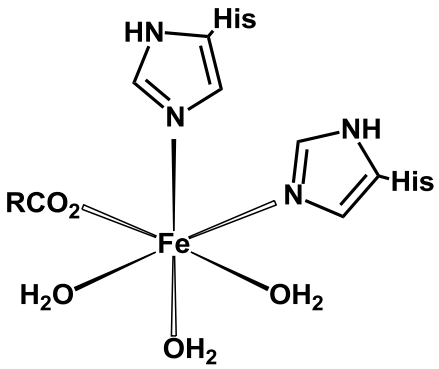


Schéma I.15 : Structure de la « triade faciale 2-His-1-carboxylate ».

La différence de réactivité (type du substrat oxydé) entre les cytP450 et les enzymes mononucléaires non-héminiques viendrait de la plus grande flexibilité du site actif de ces dernières, permettant de fixer à la fois le cofacteur ou le substrat et le dioxygène. La proximité des deux augmente la vitesse de la réaction, cette réaction étant réalisée de façon intramoléculaire plutôt que intermoléculaire. De plus, dans ces enzymes, la fixation du substrat au site actif induit le passage de l'atome de fer de son état initial hexacoordiné, presque inerte vis-à-vis du dioxygène de l'air, à un état pentacoordiné après décoordination d'une molécule d'eau. Ce changement de géométrie provoque un abaissement du potentiel redox du centre métallique qui va grandement augmenter son affinité pour le dioxygène. Toutefois, l'apport d'électrons reste nécessaire pour réaliser plusieurs cycles catalytiques. Le fait que l'activité enzymatique soit couplée à la fixation du substrat est un mécanisme d'autoprotection de l'enzyme, pour éviter des pertes d'énergie et/ou sa propre oxydation.

I-C-1-a) Les catéchols dioxygénases

Ces enzymes peuvent être séparées en deux familles distinctes : les extradiol et les intradiol catéchols dioxygénases, possédant chacune une réactivité spécifique.
De nombreuses extradiol dioxygénases ont été cristallisées[65], comme la 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygénase (BphC); la métapyrocatechase (MPC); la homoprotocatechuate 2,3 dioxygénase (HPCD); la homogentisate 1,2 dioxygénase (HGO) et la protocatéchuate 4,5 dioxygénase (4,5-PCD).

Ces enzymes sont responsables d'une étape clé de la dégradation métabolique des composés aromatiques (pour recycler les atomes de carbone) qui est la coupure oxydante des cycles aromatiques, dont un exemple est donné ci-dessous (**Schéma I.16**).[66] Les produits aliphatiques de la coupure oxydante peuvent éventuellement être ré-engagés dans le cycle de Krebs.

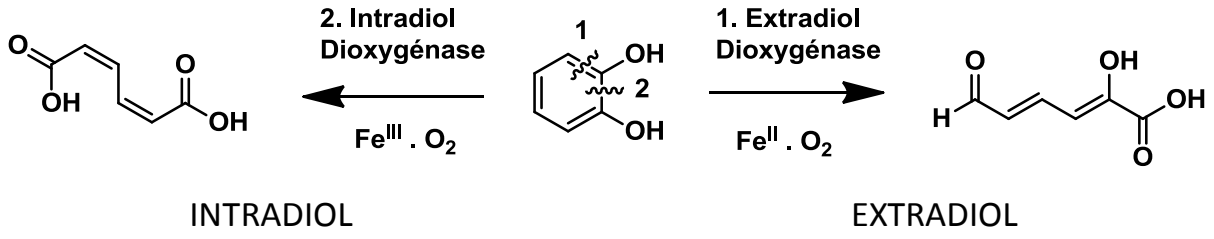


Schéma I.16 : Produit de la rupture oxydante catalysée par les intradiol et extradiol catéchols dioxygénases.[66]

Le **Schéma I.16** montre la différence de réactivité entre extradiol et intradiol dioxygénases, qui serait due à la structure de leur site actif, possédant trois sites vacants pour les extradiol dioxygénases contre deux pour les intradiol dioxygénases. Cela entraînerait alors une différence de géométrie de l'intermédiaire alkylperoxo formé par activation de O_2 (**Schéma I.17**).[66]

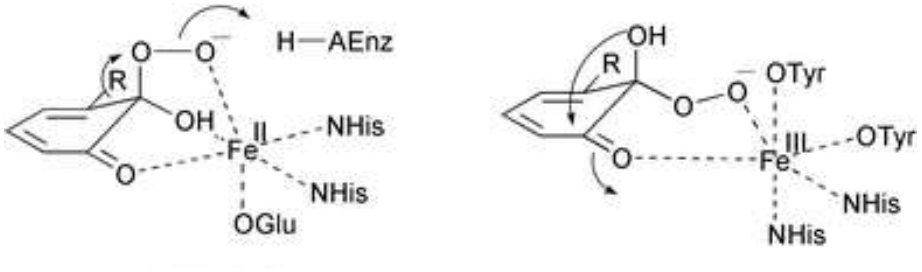


Schéma I.17 : Structure des intermédiaires alkylperoxo des extradiol (à gauche) et intradiol (à droite) catéchols dioxygénase.[66]

En effet, les extradiol dioxygénases formeraient préférentiellement un intermédiaire alkylperoxo pseudo-axial, favorisant la coupure oxydante en **1.** Les intradiol dioxygénases sont proposées pour former un intermédiaire alkylperoxo pseudo-équatoriale favorisant la coupure oxydante en **2**. De plus, la seconde sphère de coordination du métal jouerait également un rôle. Le résidu histidine jouerait le rôle d'acide et protonerait l'oxygène proximal de l'intermédiaire alkylperoxo.[67] Le mécanisme des intradiol dioxygénases reste mal compris.[68] En revanche, de nombreuses études ont été menées sur le mécanisme de la coupure oxydante par les extradiol dioxygénases, et plus particulièrement sur le mécanisme de la homoprotechuate 2,3-dioxygénase.[67,69,70]

Une autre famille d'enzymes, les lipoxygénases, catalysant la réaction d'hydroxylation d'acides gras, peut être classée ici, car elle fonctionne de la même manière que l'intradiol dioxygénase.[71]

Pour conclure, dans la famille des catéchol dioxygénases les électrons sont amenés au centre métallique par le substrat.

I-C-1-b) Les dioxygénases de Rieske

Les dioxygénases non-héminiques de Rieske catalysent la cis-dihydroxylation des arènes de façon régiosélective et stéréospécifique. Elles sont appelées ainsi car elles transfèrent les deux atomes du dioxygène de l'air au substrat. Toutefois elles peuvent oxyder une grande variété de substrats. Elles sont composées de deux sous-unités, une catalytique (α) et une structurelle (β). L'enzyme la plus connue est la naphtalène 1,2-dioxygénase (NDO), qui a été cristallisée en premier en 1998.[72,65] Depuis, de nombreuses autres enzymes ont été cristallisées comme la biphényl dioxygénase ou la cumène dioxygénase, ce qui a permis de montrer que leur structure était similaire à la NDO.

Ces systèmes enzymatiques sont composés en général d'une ferrédoxine réductase qui transfère les électrons du NADH vers le cluster de Rieske. Pour certaines enzymes parfois, la présence d'une ferrédoxine permettant le relais des électrons entre la ferrédoxine réductase et le cluster de Rieske est nécessaire. Le cluster de Rieske diffère des ferrédoxines par la liaison d'un de ses deux atomes de fer à deux histidines qui l'ancrent dans la protéine au lieu de deux cystéines pour les ferrédoxines. Le cluster est relié au site actif mononucléaire par un résidu aspartate (**Schéma I.18**).

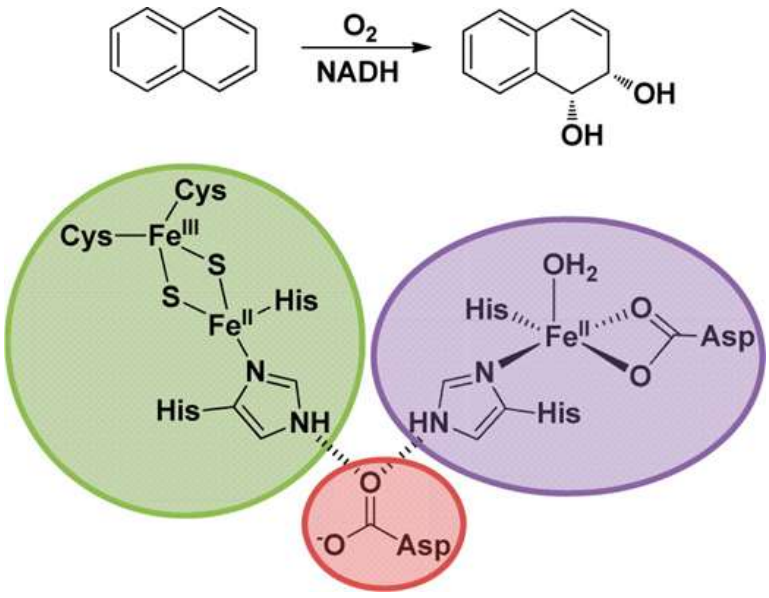


Schéma I.18 : Réaction catalysée par la NDO (en haut) et architecture du cluster de Rieske (vert) et du site actif mononucléaire (violet) ponté par un résidu aspartate (rouge).[73]

Les deux électrons nécessaires au cycle catalytique proviennent du NADH *via* une ferrédoxine réductase et une ferrédoxine pour la naphtalène dioxygénase, alors que pour la benzoate 1,2 dioxygénase, la ferrédoxine réductase réduit directement le cluster de Rieske.[74] Cependant, il est admis qu'à part de subtiles différences, toutes les Rieske dioxygénases ont le même mécanisme d'activation du dioxygène. Ici, nous prendrons l'exemple du cycle catalytique de la NDO (**Schéma I.19**).[73]

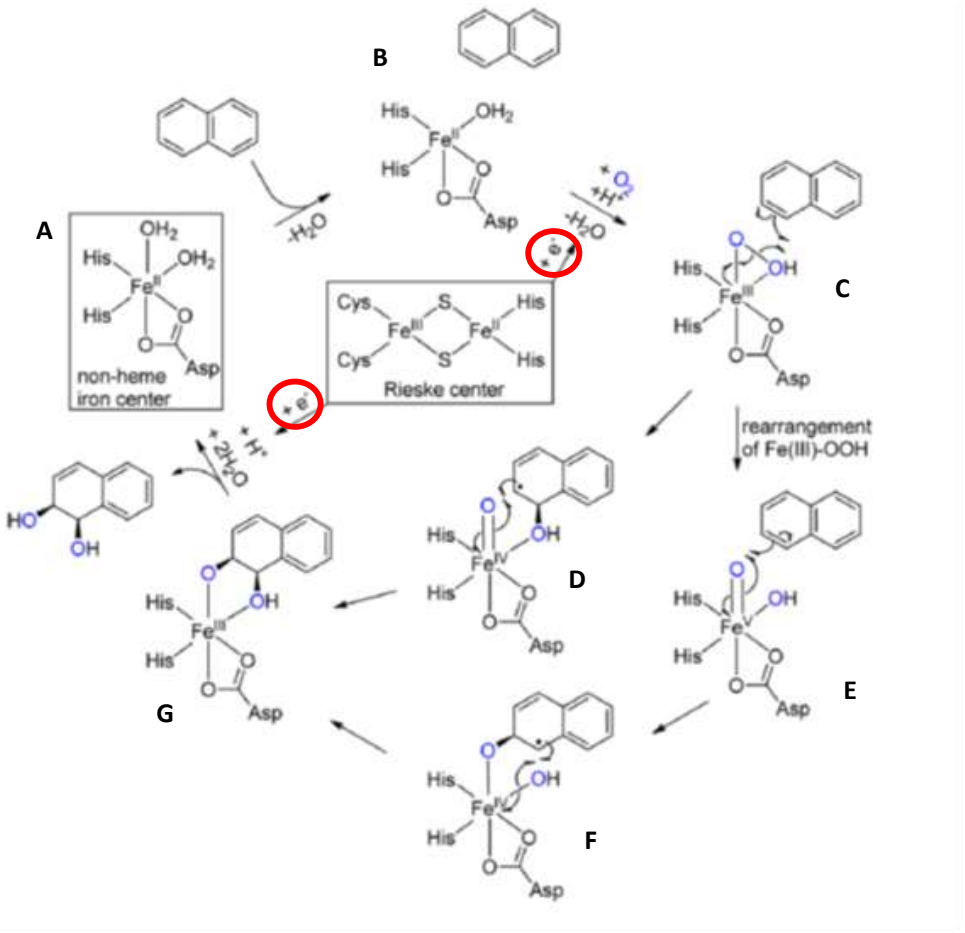


Schéma I.19 : Cycle catalytique de la NDO.[73]

Le centre métallique est initialement Fe(II) hexacoordiné, avec notamment deux molécules d'eau dans sa sphère de coordination (**A**). L'approche du substrat entraîne le départ d'une molécule d'eau (**B**). La fixation de dioxygène sur le complexe pentacoordiné résultant, suivie d'un transfert d'un électron provenant du cluster de Rieske [2Fe-2S] vers le centre métallique, distant de 12 Å, entraîne la formation d'un complexe Fe(III)-peroxo, qui par protonation et perte d'une molécule d'eau conduit à un intermédiaire Fe(III)-hydroperoxo side-on (**C**) (caractérisé par diffraction des rayons X).[75] L'oxydation du substrat couplée à la rupture de la liaison O-O entraîne la formation de l'espèce Fe(IV)-oxo et d'un radical intermédiaire hydroxynaphtyle (**D**) qui réagit à nouveau pour donner le complexe Fe(III)-alcoxyhydroxynaphtalene (**G**). Alternativement, la rupture de la liaison O-O peut intervenir avant l'oxydation du substrat et donner un intermédiaire Fe(V)-oxohydroxo (**E**), qui ensuite réagit avec le substrat (**F**) pour donner le complexe Fe(III)-alcoxyhydroxynaphtalene (**G**). Le transfert d'un second électron du cluster de Rieske vers le centre métallique réduit l'intermédiaire précédent, pour donner l'intermédiaire Fe(II)-alcoxyhydroxynaphtalene. La protonation de l'alcoxyle entraîne le relargage du substrat et la régénération de l'enzyme dans son état initial.

Pour conclure, le transfert d'électrons joue encore un rôle crucial dans le mécanisme d'oxydation des enzymes de Rieske, avec une distance entre le cluster de Rieske et le site actif

métallique mononucléaire de 12 Å qui est favorable au transfert direct d'électrons. La sélectivité *cis* ou *trans* de la dihydroxylation quant à elle est assurée par l'orientation du substrat.

I-C-1-c) Les systèmes α-cétoglutarate dépendant (α-KG)

Les systèmes α-KG constituent la famille d'enzymes la plus importante possédant le motif « triade faciale 2 -His-1-carboxylate », dont de nombreux types ont été cristallisés telles que la 4-hydroxyphényl pyruvate dioxygénase (HPPD), la taurine/α-KG-dioxygénase (TauD), clavaminate synthase (CAS), deacetoxycephalosporine C synthase (DAOCS).[65] C'est aussi la sous-famille la plus versatile, avec des implications variées dans la synthèse d'antibiotiques, la réparation de l'ADN, la détection de l'oxygène et dans la régulation de la transcription, issues de réactions d'oxydations aliphatiques et aromatiques, hydroxylations/éliminations, désaturations, coupures oxydantes de cycles, épimérisations, agrandissements de cycles, halogénations ou encore la formation de carboxyles.[76,77]

Le fonctionnement général de l'oxydation réalisée par les enzymes α-KG est décrit ci-dessous (**Schéma I.20**).

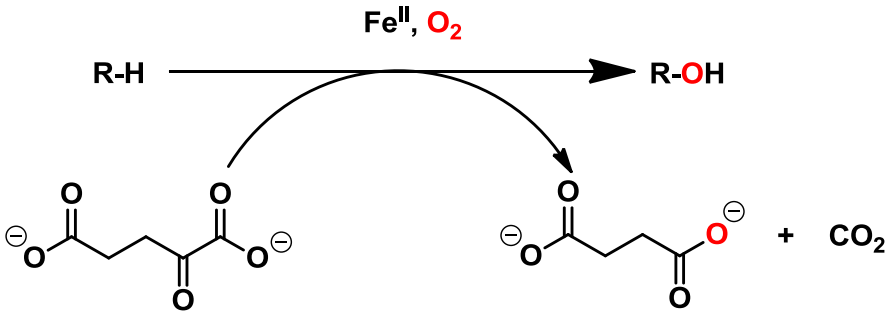


Schéma I.20 : Fonctionnement général de l'oxydation réalisée par les enzymes α-KG-dépendantes.

L'oxydation du substrat se fait en parallèle de la décarboxylation de l'α-KG, et de la production de succinate et de CO_2. Le cycle catalytique de la réaction est présenté ci-dessous (**Schéma I.21**).[78]

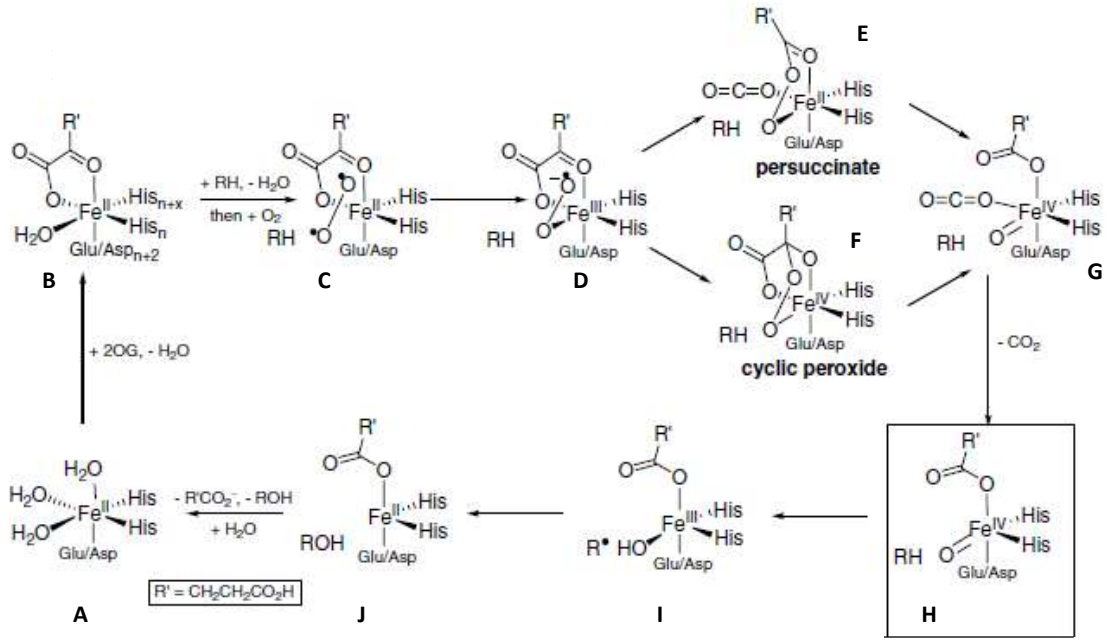


Schéma I.21 : Cycle catalytique général de l'hydroxylation d'un substrat par les enzymes α-KG-dépendante.[78]

Le site actif est dans son état initial Fe(II) hexacoordiné et possède trois molécules d'eau dans sa sphère de coordination (**A**). Après départ de deux molécules d'eau et coordination du co-substrat au site actif Fe(II) (**B**), l'approche du substrat dans la poche de l'enzyme provoque l'éjection de la dernière molécule d'eau (**C**), ce qui permet la réaction avec le dioxygène de l'air pour former l'espèce Fe(III)-superoxo (**D**). Cette espèce va évoluer vers un complexe Fe(II)-persuccinate (**E**), si la décarboxylation se fait en même temps, ou bien vers un complexe peroxyde cyclique avec le glutarate (**F**). L'effondrement de ces deux complexes va conduire au même intermédiaire Fe(IV)-oxo-carboxylato (**G**), qui après départ d'une molécule de CO_2 génère l'intermédiaire réactionnel Fe(IV)-oxo (**H**), qui a été parfaitement caractérisé par spectroscopie Mössbauer.[79] Le Fe(IV)-oxo va réagir ensuite avec le substrat *via* un mécanisme d'abstraction d'hydrogène (**I**),[79] puis le substrat oxydé et le succinate sont libérés (**J**) et le centre métallique retourne à son état initial Fe(II). Le composé α-KG est un cofacteur sacrificiel, il n'est pas régénéré mais peut toutefois être utilisé dans le cycle de Krebs.

Le mécanisme des autre types de réactions est sensiblement le même, l'intermédiaire de haute énergie responsable de celles-ci étant supposé être un Fe(IV)-oxo dans la plupart des cas.[80]

I-C-1-d) Les hydroxylases bioptérine-dépendantes

Cette famille d'enzymes est restreinte. Elle est appelée hydroxylase d'acides aminés aromatiques (AAAH) et ne comprend que trois enzymes différentes qui ont toutes été cristallisées :[65]

- (i) la Phénylalanine hydroxylase (PheOH) catabolise l'excès de phénylalanine,
- (ii) la tryptophane hydroxylase (TrpOH) est impliquée dans la synthèse de la sérotonine,

- (iii) la tyrosine hydroxylase (TyrOH) catalyse la première étape de la biosynthèse de la catécholamine.

Comme leurs noms l'indiquent, ces enzymes utilisent toutes le cofacteur tétrahydrobioptérine (BH_4) dans leur site actif pour fonctionner (**Schéma I.22**).

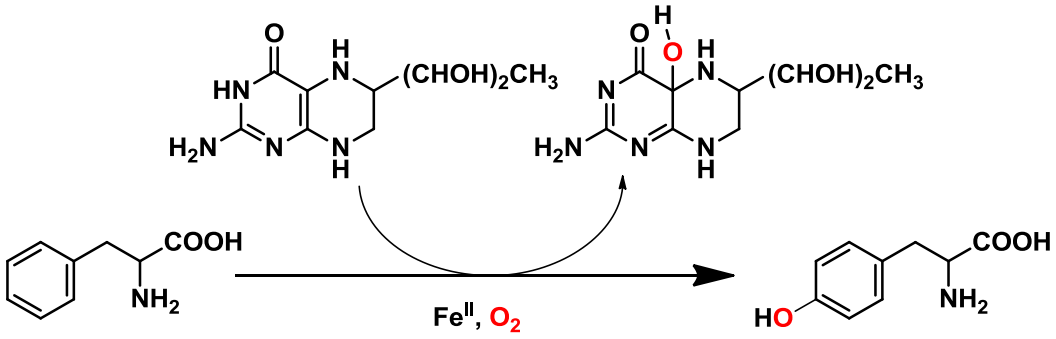


Schéma I.22 : Exemple de réactivité pour les enzymes bioptérine-dépendantes.[65]

Contrairement aux autres sous-familles, ni le substrat ni le cofacteur ne se lient directement au centre métallique. Le glutamate monodentate devient bidentate et les molécules d'eau se décoordinent, engendrant le déplacement du cofacteur bioptérine vers le fer. Le mécanisme réactionnel est le suivant (**Schéma I.23**).

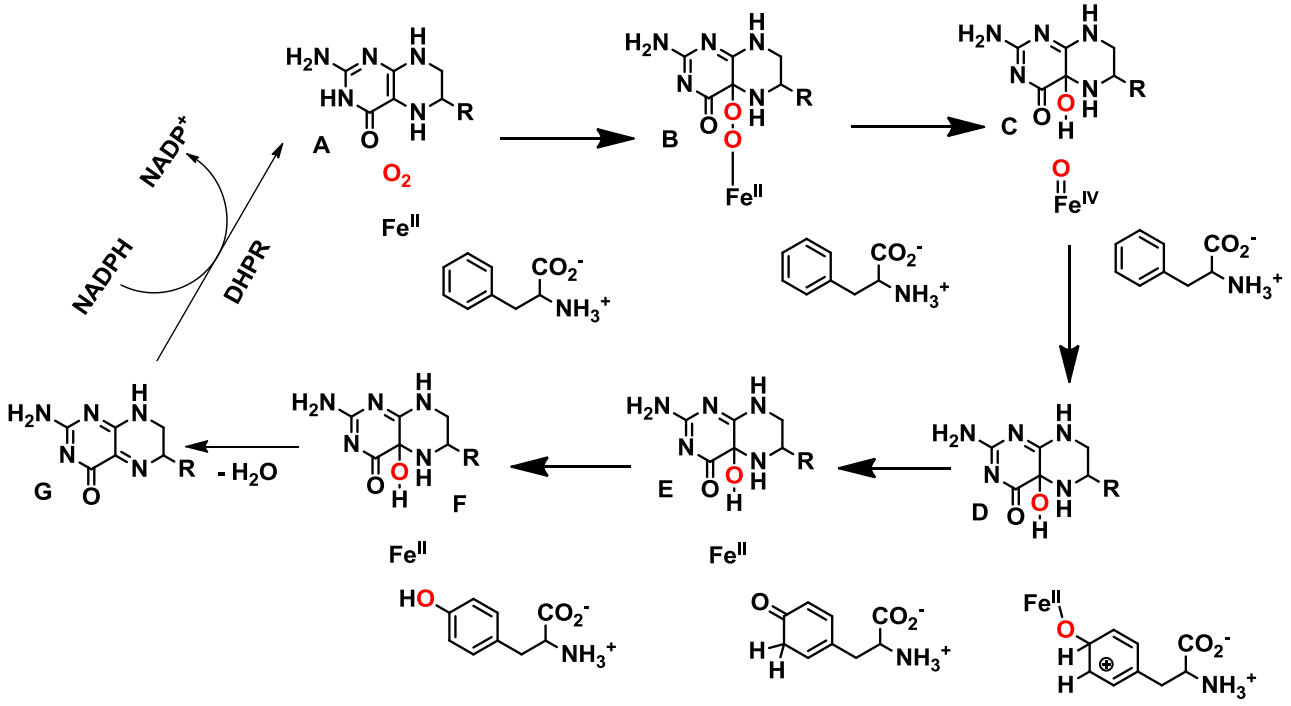


Schéma I.23 : Mécanisme réactionnel d'hydroxylation de la phénylalanine par la phénylalanine hydroxylase.

Pour commencer, comme le montre le **Schéma I.23**, un complexe ptérineperoxo-ferreux (**B**) est formé par activation du dioxygène par le cofacteur bioptérine et le fer. Ce dernier est alors clivé de manière hétérolytique pour conduire à l'intermédiaire réactif Fe(IV)-oxo (**C**), (caractérisé pour

TyrH[81,82]). L'attaque nucléophile du substrat sur cet intermédiaire forme ensuite un intermédiaire cationique (**D**). Un NIH-shift (**E**), suivi d'une tautomérisation, donne enfin le produit final oxydé (**F**), régénère le site actif sous sa forme initiale Fe(II) et la bioptérine hydroxylée. La bioptérine, contrairement au cofacteur α-KG, va perdre une molécule d'eau (**G**) et va être réduite par l'enzyme NADH dépendante dihydroptérine réductase (DHPR) pour redonner la bioptérine de départ : la bioptérine n'est pas un cofacteur sacrificiel.

Pour conclure, le dioxygène est ici activé par une action combinée du Fe(II) et du cofacteur bioptérine. Ce dernier étant ensuite régénéré par une réductase NADPH dépendante.[83]

I-C-1-e) Les enzymes ayant des propriétés particulières

Parmi ces enzymes, on retrouve des oxydases qui réduisent un atome de dioxygène en eau tout en oxydant un substrat et dont les intermédiaires réactionnels diffèrent de ceux présentés précédement.[84] Les deux enzymes de ce groupe les plus connues sont l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique oxydase (ACCO), qui permet la synthèse de l'éthylène, et l'Isopénicilline N-synthase (IPNS), qui entre dans la synthèse de la β-lactame isopénicilline N-bicyclique. Ces deux enzymes sont cristallisées et possèdent une haute homologie de séquence avec les enzymes α-cétoglutarate dépendantes.[65] Toutefois, elles diffèrent de celles-ci car elles n'utilisent pas de cofacteur redox et ne réalisent pas de transfert d'atome d'oxygène à proprement parler.

Une nouvelle enzyme cristallisée en 2005, l'acide hydroxypropylphosphonique epoxydase (HppE), fait également partie de cette catégorie.[85] Cette oxydase est composée de la même triade que les précédentes. Toutefois, elle diffère par la source des électrons qui est ici NADH et par le cofacteur redox utilisé : la FMN.[86] Le mécanisme proposé du cycle catalytique est le suivant (**Schéma I.24**).[87]

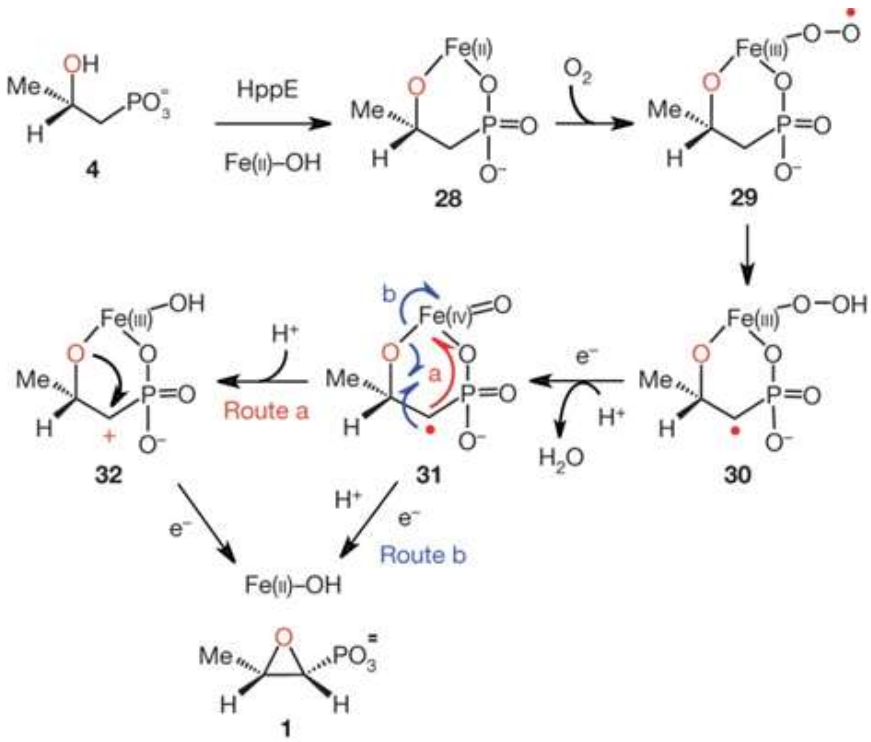


Schéma I.24 : Mécanisme supposé de la réaction d'époxydation du (S)-HPP catalysé par HppE.[87]

Le substrat (**4)** va se coordiner au Fe(II)-hydroxyle pour donner l'espèce cyclique correspondante (**28**), qui va pouvoir interagir avec O_2 pour donner l'intermédiaire Fe(III)-superoxo (**29**). L'espèce Fe(III)-hydroperoxo (**30**) est ensuite formée par abstraction d'hydrogène intramoléculaire, puis elle se réarrange grâce à un premier transfert d'électron provenant de la FMN en Fe(IV)-oxo (**31**). Ensuite, deux chemins réactionnels sont possibles : soit (en rouge) un transfert d'électron intramoléculaire du substrat vers le centre métallique pour donner l'espèce Fe(III)-hydroxyle et le carbocation du substrat (**32**) qui va évoluer en époxyde par attaque de l'atome d'oxygène sur le carbocation (**1**) ; soit (en bleu) l'époxyde (**1)** est formé directement à partir de (**31)**. Le transfert d'un deuxième électron provenant du NADH *via* la FMN lors du passage de (**31**) ou (**32**) à (**1**) permet de régénérer le site actif à l'état initial Fe(II).

Finalement, il existe une enzyme appelée sulfure oxygénase réductase qui n'a pas besoin de cofacteurs extérieurs ni de transporteurs d'électrons pour activer le dioxygène de l'air.[88]

I-C-2) Les enzymes mononucléaires de cuivre

Le classement des enzymes mononucléaires à cuivre est plus délicat car elles n'ont pas forcément de structure commune. On peut toutefois les séparer en deux catégories :

I-C-2-a) Les monooxygénases :

Comme nous l'avons vu précédemment dans le cas du fer, les monooxygénases à cuivre catalysent l'insertion d'un atome d'oxygène dans le substrat par activation du dioxygène à 2 électrons, alors que les oxydases le font à 4 électrons et donc réduisent un atome d'oxygène en eau. Il existe peu de monooxygénases à cuivre. Comme pour les enzymes à fer, elles ont besoin d'un apport d'électrons pour fonctionner.

La polysaccharide monooxygénase (PMO) est une enzyme qui catalyse la dégradation de la lignine ou de la cellulose. Son site actif est connu.[89] Il en existe deux types : les enzymes de Type 1 génèrent le produit oxydé en C1 alors que les enzymes de Type 2 génèrent le produit oxydé en C4.[90] Au cours du mécanisme proposé, le cuivre activerait le dioxygène de l'air à un électron pour former l'espèce active Cu(II)-superoxide end-on.[91]

I-C-2-b) Les oxydases[56]

Beaucoup d'enzymes mononucléaires à cuivre sont des oxydases, comme le galactose oxydase (GO) ou l'amine oxydase (AO). La galactose oxydase est une enzyme réalisant l'oxydation stéréospécifique d'alcools primaires en aldéhydes, couplée à la réduction à deux électrons d'une molécule de dioxygène en H_2O_2. Ici, il n'y a pas d'insertion d'atome d'oxygène dans les substrats. L'amine oxydase, quant à elle, réalise la réaction d'oxydation d'amines primaires et de diamines en aldéhydes et ammoniac en produisant H_2O_2 comme sous-produit, sûrement selon le même mécanisme que la GO.

Les Quercétinases sont des enzymes catalysant la dégradation de la quercitine et autres flavonols. C'est une enzyme qui active un substrat sous sa forme Cu(II).

Pour conclure, il existe de nombreuses enzymes différentes avec des mécanismes de transfert d'électrons variés. Les enzymes comme l'extradiol dioxygénase, la tyrosine hydroxylase et la quercetinase, ayant toutes les trois comme cofacteur redox un substrat, sont limitées quant à la variété des substrats qu'elles peuvent oxyder. Ce sont donc de mauvais exemples pour la chimie bio-inspirée. Au contraire, les enzymes possédant des cofacteurs redox pouvant être régénérés facilement tels que les cytP450, les enzymes bioptérine-dépendantes ou encore la MMO (s ou p), sont une source d'inspiration pour la chimie bio-inspirée. Les enzymes α-cétoglutarate dépendantes sont quant à elles d'un grand intérêt car elles catalysent une grande variété de réactions. Toutefois, le cofacteur redox utilisé est sacrificiel et donc de moindre intérêt pour la chimie bio-inspirée.

Le deuxième point concerne le transfert d'électrons, qui est crucial pour la grande majorité de ces enzymes, et doit être hautement et finement régulé au sein de l'enzyme. En effet, l'apport d'électrons au site actif de l'enzyme doit se faire à un instant précis du cycle catalytique pour éviter toute réaction parasite. Pour cela, les différents acteurs sont bien compartimentés et n'interagissent les uns avec les autres qu'à des moments-clés du processus catalytique. C'est actuellement ce procédé de transfert d'électrons qui est le plus compliqué à reproduire lorsque l'on veut réaliser des modèles bio-inspirés.

II) Catalyse d'oxydation bio-inspirée

II-A) Catalyse d'oxydation bio-inspirée utilisant des oxydants chimiques dans les solvants organiques

Modéliser la chimie enzymatique est un défi majeur qui nécessite de débloquer de nombreux verrous scientifiques. Pour fonctionner, ces enzymes utilisent des sites actifs qui sont enfouis dans une cavité plus ou moins profonde, entourée par un bouclier d'acides aminés avec une géométrie précise, ne laissant place qu'à un type de substrat spécifique. La synthèse de molécules artificielles capables d'achever les mêmes transformations chimiques serait ainsi un accomplissement formidable. Dans cette optique, la chimie bio-inspirée a deux objectifs, (1) mimer les fonctions de l'enzyme qui catalysent une transformation chimique de manière sélective et (2) mieux comprendre le mécanisme de ces dites transformations. Ici est développé plus particulièrement le premier objectif.[92]

L'oxydation de liaisons C-H est difficile car la liaison est thermodynamiquement forte et cinétiquement inerte.[93] Traditionnellement, l'oxydation d'hydrocarbures saturés est réalisée à l'aide de sels métalliques redox,[94] mais les processus utilisés ne sont pas bénins pour l'environnement. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux catalyseurs d'oxydation, capables de réaliser dans des conditions douces l'oxydation d'alcènes par exemple, qui est d'un très grand intérêt car donnant accès à des produits oxygénés tels que des alcools, des cétones, des aldéhydes, des acides et des époxydes largement utilisés dans l'industrie chimique et pharmaceutique.

II-A-1) Catalyseurs d'oxydation inspirés des cytP450

De nombreuses porphyrines ont été synthétisées depuis la découverte des cytP450 en 1955. Ces porphyrines ont été complexées avec de nombreux métaux comme le chrome, l'osmium, le cobalt, le nickel, le ruthénium. Toutefois, les deux métaux les plus efficaces en termes de réactivité sont le manganèse et le fer.[95]

La première publication rapportant l'utilisation de ce type de métalloporphyrine associée à un oxydant chimique ne donnant qu'un seul atome d'oxygène a été publiée par Groves en 1979.[96] Dans cette étude est rapportée l'oxydation d'oléfines par une porphyrine de fer (FeTPPCl) en présence de l'iodosylbenzène (PhIO) comme donneur d'atome d'oxygène. Par la suite, de nombreuses études utilisant différents oxydants chimiques tels que les hypochlorites, l'oxone ($KHSO_5$), les N-oxydes d'amines, l'acide *méta*chloroperbenzoïque (*m*-CPBA) ou encore les oxaziridines en présence de porphyrines principalement de fer et de manganèse ont été rapportées. La plupart du temps, ces réactions sont accomplies dans des solvants organiques, ou dans le cas des hypochlorites et de $KHSO_5$ dans un mélange eau/ acétonitrile (MeCN) (1:1) ou eau/dichlorométhane (DCM)) (1:1) comme solvant en présence d'un agent de transfert de phase. Toutefois ces oxydants étant assez puissants pour oxyder directement les substrats, ainsi que relativement dangereux pour la santé et pour l'environnement, les recherches se sont tournées vers l'utilisation d'« oxydants verts » comme H_2O_2. Ce dernier fournit à la fois l'atome d'oxygène, les deux électrons et les deux protons nécessaires au cycle catalytique, et à l'avantage de former de l'eau comme le sous-produit. Cependant, il est souvent trop réactif pour que la catalyse soit sélective (**Schéma I.25**).[95]

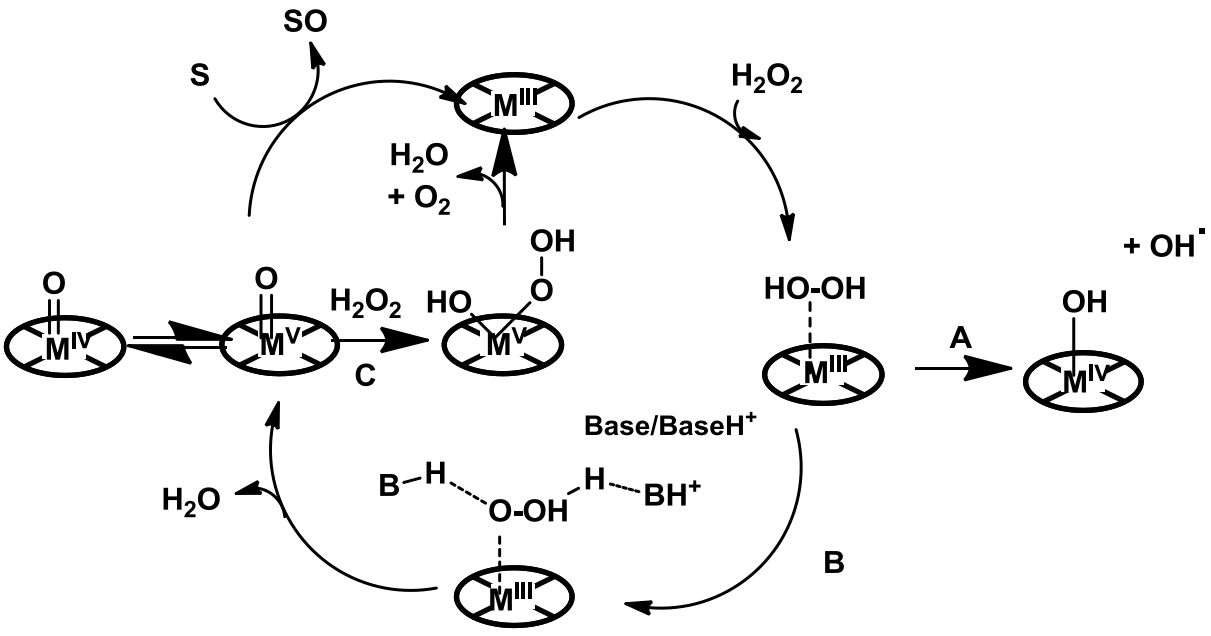


Schéma I.25 : Différents chemins réactionnels pour l'activation de H_2O_2 par une métalloporphyrine. (A) : coupure homolytique de la liaison O-O et formation de $OH^{\cdot}$; (B) : coupure hétérolytique générant une espèce métal-oxo et (C) : addition d'une deuxième molécule de H_2O_2 produisant du dioxygène et de l'eau.[95]

En présence de peroxyde d'hydrogène différents chemins réactionnels sont possibles, dont la formation de radicaux pouvant nuire à la sélectivité de la réaction selon la réaction bien connue de Fenton (**Schéma I.25 A**).

Une des meilleures porphyrines pour l'époxydation du cyclooctène est une porphyrine de manganèse modifiée avec un bras terminé par un groupement imidazole pouvant jouer le rôle de ligand axial du métal. Ce bras mime le cystéinate dans les cas des cytP450 ou l'histidine dans les peroxydases, ou encore comme l'imidazole que l'on rajoute généralement lors de réactions catalysées par les métalloporphyrines. En présence de H_2O_2 dans le DCM, cette métalloporphyrine réalise 1 000 TON (100 % de conversion) en 36 minutes (**Schéma I.26**).[97,98]

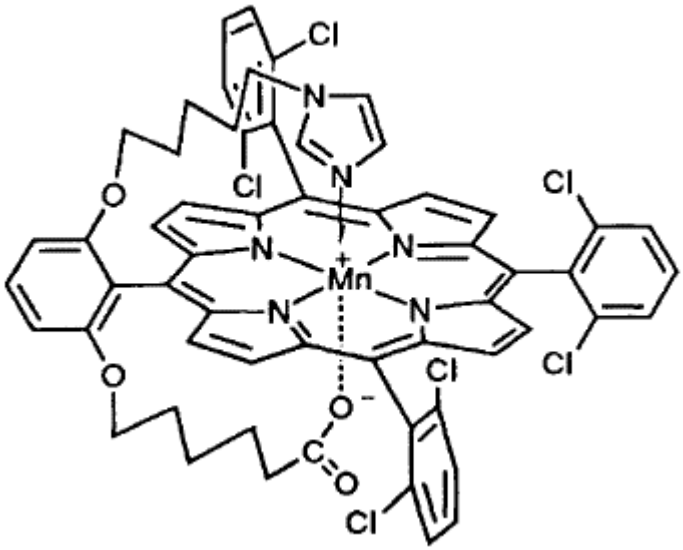


Schéma I.26 : Structure de la porphyrine utilisée ci-dessus [97,98]

Pour les réactions d'hydroxylation, d'une façon générale, les porphyrines de manganèse sont plus efficaces que celles de fer.[99]

Il existe également certaines métalloporphyrines qui catalysent des réactions d'oxydation dans l'eau avec H_2O_2. Nous développerons ces exemples dans le paragraphe suivant. Enfin, des complexes métalliques de composés proches des porphyrines, comme les phtalocyanines[100] et les corroles[101] peuvent aussi réaliser des réactions d'oxydation avec différents oxydants.

Pour conclure, les métalloporphyrines sont des catalyseurs plutôt efficaces en catalyse d'oxydation dans les solvants organiques. Toutefois, leur chimie est peu respectueuse de la nature et les conditions réactionnelles optimales sont difficiles à trouver et changent suivant la métalloporphyrine utilisée.

Plus récemment, des systèmes inspirés des enzymes binucléaires à fer MMOs ou à cuivre MMOp ont également été décrits.

II-A-2) Catalyseurs d'oxydation inspirés de la MMO(s ou p)

Par rapport à la chimie des porphyrines, la chimie bio-inspirée des MMO(s ou p) est beaucoup moins développée. La première approche utilisée a été de mimer le centre actif de la MMOs avec des complexes binucléaires de Fe(II). De très nombreux complexes ont été créés, soit à partir d'un ligand azoté incluant le pont dans son architecture (par exemple BDPTZ, 6-HPA ou HBPMP), soit à partir de deux ligands mononucléaires pontés par un groupement carboxylate (par exemple BPMEN + H-formate) (**Schéma I.27).**

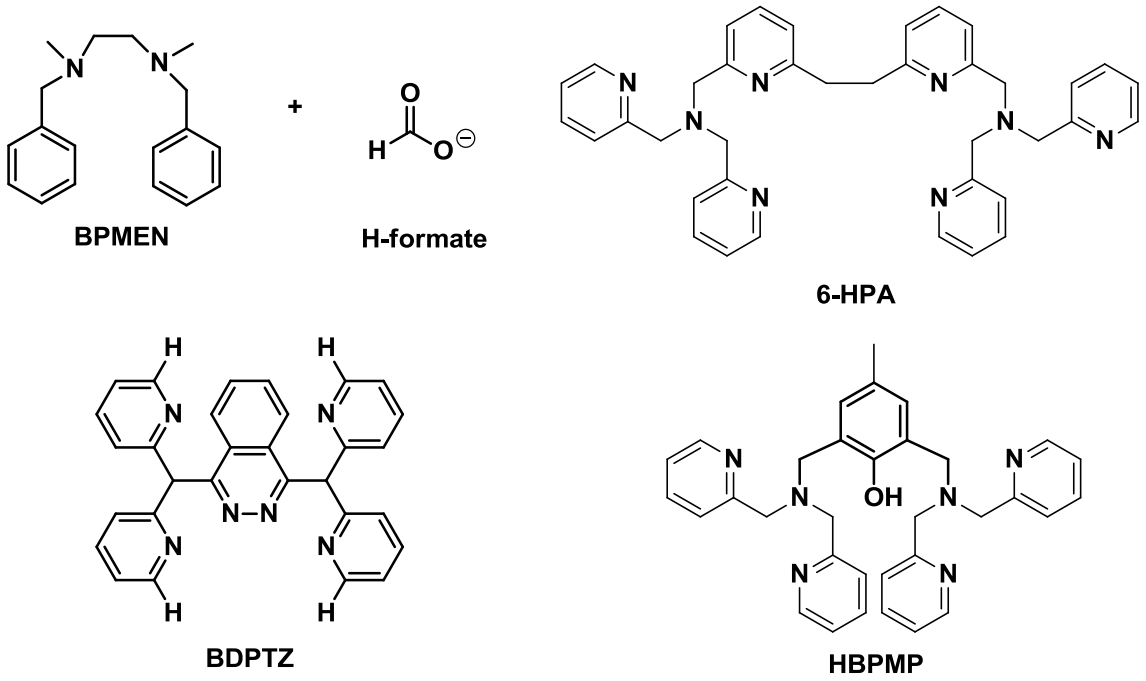


Schéma I.27 : Quelques ligands utilisés comme modèles d'enzymes binucléaires à fer ou de cuivre.

Les complexes binucléaires de fer(II) sont capables de réagir avec le dioxygène, toutefois très peu d'exemples sont présents dans la littérature (voir paragraphe suivant).[102] La plupart des systèmes ont été étudiés avec des oxydants chimiques tels que *m*-CPBA ou PhIO. Les exemples utilisant H_2O_2 sont beaucoup plus rares. Les complexes binucléaires de fer ont souvent été développés pour des réactions d'oxydation dites « *in situ* », c'est à dire sur le ligand lui-même.[103,104,105] Des exemples sont décrits dans la littérature avec des dérivés $[Fe_2(O_2CAr^{tol})_4L_2]$ qui permettent par exemple l'hydroxylation du toluène.[106] Le gros désavantage de ces complexes est qu'ils ne constituent pas des catalyseurs à proprement parler, car ils n'effectuent qu'un seul cycle catalytique.

Par ailleurs, un exemple mimant l'intermédiaire Q de la MMOs a été caractérisé, provenant de la réaction d'un complexe mononucleaire de fer(II) avec t-BuOOH pour conduire à une espèce $[Fe_2(\mu\text{-}O)_2(BPMCN)_2]$ qui peut oxyder l'adamantane dans le DCM.[107] En parallèle, la synthèse d'un complexe binucléaire de fer(III) utilisant le ligand 1,2-bis[2-{bis(2-pyridylméthyl)aminométhyl}-6-pyridyl]éthane (6-HPA), $[Fe^{III}_2(6\text{-HPA})(OTf)_4]$ permet de réaliser l'oxydation de différents alcènes. Ce complexe possède une efficacité maximale pour l'oxydation du cyclooctène, avec une conversion

de 70 % et des TON supérieurs à 100, tout en conservant une sélectivité pour l'époxyde de 97 %. Ce sont actuellement les catalyseurs binucléaires de fer(III) les plus efficaces pour l'époxydation d'alcènes, en particulier l'époxydation du cyclooctène (**Schéma I.28**).[108,109]

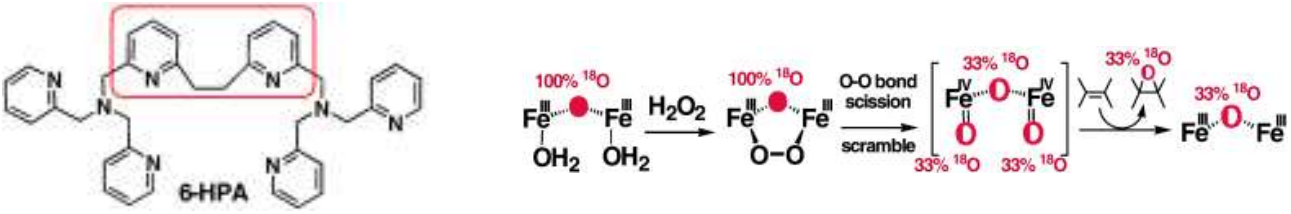


Schéma I.28 : Structure du ligand 6-HPA (à gauche) et réaction catalysée par le complexe $[Fe^{III}_2(6\text{-HPA})(TfO)_4]$ (à droite).

Très récemment au laboratoire ont été synthétisés des complexes binucléaires de fer(III), moins contraignants en termes de synthèse et actifs en catalyse sur de nombreux substrats (thioanisole, cyclooctène, cyclohexène) avec H_2O_2 dans MeCN.[110]

Des catalyseurs binucléaires à cuivre ont aussi été synthétisés, comme modèles des catéchol oxydases pour l'oxydation de l'alcool benzylique par H_2O_2, dans MeCN. Ces systèmes ont été développés par l'équipe de Nolte.[111] Il existe aussi des complexes trinucléaires de cuivre(II), permettant l'oxydation non sélective du cyclohexane en présence de H_2O_2 et d'un co-catalyseur acide, à température ambiante avec le substrat en défaut. Le rendement est faible, aux alentours de 20 % mais avec des TON allant jusqu'à 1 800. Malheureusement le mécanisme de cette réaction est radicalaire, ce qui induit la formation majoritaire de l'hydroperoxyde de cyclohexyle.[112]

D'une façon générale, les catalyseurs à base de cuivre sont plutôt utilisés en présence de dioxygène. D'autres catalyseurs utilisant des métaux de différentes natures sont aussi décrits dans la littérature comme des complexes binucléaires de manganèse par exemple, qui sont efficaces pour les réactions d'époxydation d'alcènes.[113,114] Beaucoup de travail reste à accomplir dans le « design » des ligands pour se rapprocher au plus près du site actif des enzymes.[115]

Pour terminer notre description des catalyseurs de faible poids moléculaire, nous allons maintenant présenter les complexes inspirés des enzymes mononucléaires à fer ou à cuivre.

II-A-3) Catalyseurs d'oxydation bio-inspirés des enzymes mononucléaires non-héminiques à fer ou à cuivre

De nombreux modèles existent, dont les deux plus étudiés sont les complexes $[Fe^{II}(BPMEN)(CH_3CN)_2](SbF_6)_2$ et $[Fe^{II}(TPA)(CH_3CN)_2](OTf)_2$ (**Schéma I.29**). Le premier est, parmi les modèles mononucléaires à fer, le meilleur catalyseur pour l'époxydation des alcènes, conduisant notamment à un rendement de 85 % et une sélectivité de 90 % pour l'époxydation du cyclooctène par H_2O_2 (10 équivalents) dans MeCN en 30 minutes au pousse seringue.[116,117] Le second réalise

cette même réaction avec un rendement de 74 %, avec une légère sélectivité pour le diol (55 %). En revanche, lorsque le ligand TPA est méthylé, cette sélectivité pour le diol augmente à 95 %.[118]

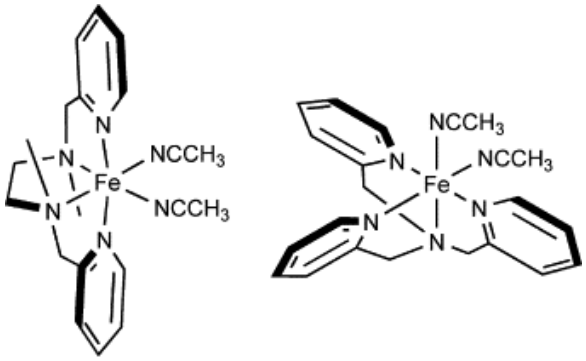


Schéma I.29 : Structure des complexes $[Fe^{II}(BPMEN)(CH_3CN)_2](SbF_6)_2$ (à gauche) et $[Fe^{II}(TPA)(CH_3CN)_2](OTf)_2$ (à droite). Les contres ions ont été occultés pour plus de clarté.

Un autre complexe à avoir montré une réactivité pour la cis-dihydroxylation d'alcènes par H_2O_2 est le complexe $[Fe^{II}(6\text{-}Me_2\text{-}BPMCN)(CF_3SO_3)_2]$ dans MeCN. Une sélectivité de 77 % pour le diol et un rendement de 64 % ont été observés sur le cyclooctène.[119] Beaucoup de catalyseurs élaborés à partir de ligands salen incluant différents métaux[120] réalisent des réactions de sulfoxydation et d'époxydation énantiosélectives,[121,122] ainsi que des réactions d'hydroxylation sélectives.[123,124]

Ci-dessous sont présentés les exemples de quelques ligands type utilisés en catalyse d'oxydation par les systèmes non-héminiques (**Schéma I.30**).[125]

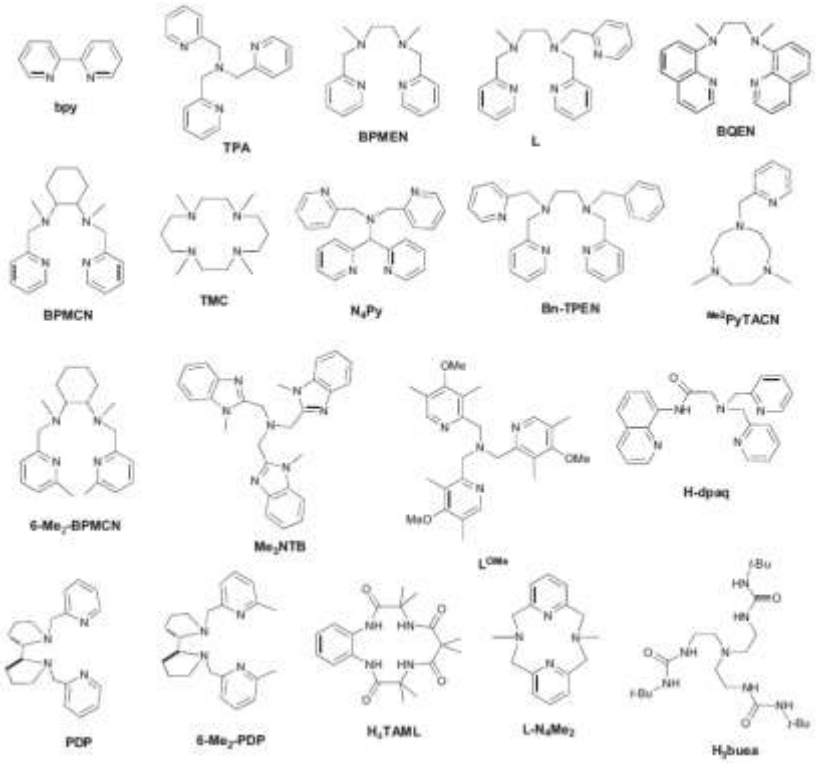


Schéma I.30 : Exemples de ligands N donneur pour les systèmes mononucléaires non-héminiques.

Ces ligands permettent une grande variété de réactions affectant de nombreux substrats avec H_2O_2 dans des solvants organiques. Les modèles d'enzymes mononucléaires à cuivre utilisant les mêmes ligands réagissent le plus souvent avec le dioxygène. De nombreux autres complexes bio-inspirés utilisent les même ligands et incluent du ruthénium,[126] du chrome, du vanadium ou encore du titane[127], mais ce sont des métaux nobles qui coûtent cher, qui restent toxiques (Cr), et qui peuvent même s'avérer moins efficaces pour la catalyse d'oxydation.

Les modèles décrits jusqu'ici ne prennent en compte que la première sphère de coordination du site actif pour mimer l'enzyme. Il existe cependant des systèmes, que l'on peut décrire comme supramoléculaires, qui présentent une approche plus globale, voulant s'inspirer de l'architecture de la protéine dans son ensemble et de son dynamisme naissant des interactions entre les molécules.

II-A-4) Catalyseurs de type macromoléculaire

II-A-4-a) Catalyse homogène :

Les dendrimères sont d'un grand intérêt, de par leurs propriétés chimiques et physiques uniques. Les complexes de fer formés avec ces entités sont très stables vis-à-vis des conditions de catalyse et réalisent l'époxydation du cyclooctène par PhIO dans le DCM, avec un rendement de 80 %.[128] Le désavantage de ce type de système est leur synthèse qui est très contraignante avec de nombreuses étapes.

Les carrés moléculaires à base de porphyrines s'inspirent de la superstructure du cytP450 pour la stabilité et possèdent une cavité pour la sélectivité. Ces systèmes catalysent des réactions d'époxydation sélectives d'alcènes comme par exemple celle du styrène par PhIO avec un très grand nombre de TON : 21 000 en 42 heures (500 TON par heure) dans le DCM, mais avec un rendement faible de seulement 4 %. Ce sont des catalyseurs robustes et stables. L'activité catalytique du carré moléculaire de porphyrine multiplie de 10 à 100 fois l'activité catalytique de la porphyrine seule en solution (**Schéma I.31**).[129] Ce système est un très joli concept, mais encore une fois la synthèse des porphyrines est contraignante et l'assemblage difficile.

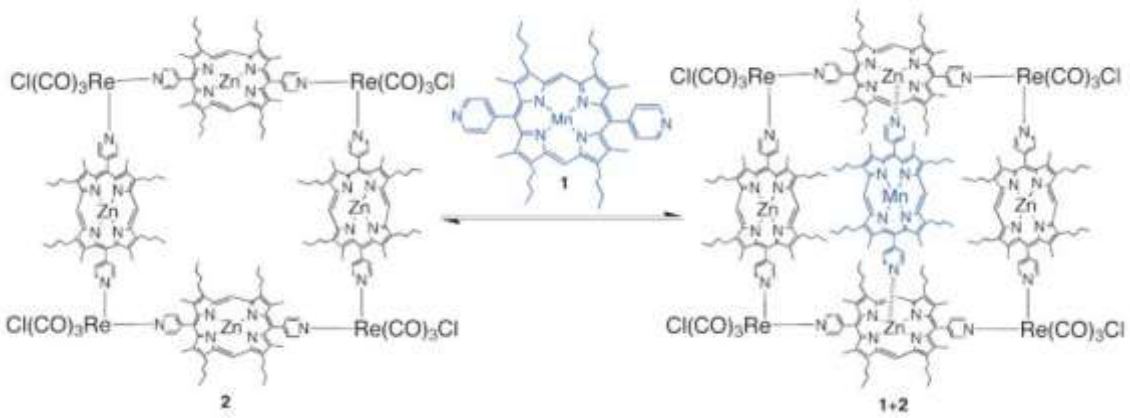


Schéma I.31 : Schéma de la structure du carré moléculaire de porphyrine avant et après insertion du catalyseur.

Les polyoxométalates (POM) sont un autre type de catalyseur supramoléculaire très étudié. Leur chimie est très versatile et peut être impliquée dans de nombreux domaines comme la photochimie, l'électrochimie, la médecine, la chimie structurale. Néanmoins, leur plus grande utilisation se fait sans conteste dans le domaine de la catalyse. Les POM permettent de nombreux types de réaction différentes, dont des réactions d'oxydation, avec de nombreux oxydants chimiques comme H_2O_2. Un exemple est rapporté pour l'époxydation d'alcool allylique, dans MeCN, avec un rendement quantitatif et une sélectivité de 100 % pour la formation d'époxyde vis-à-vis de la cétone.[130] Ces systèmes sont le plus souvent utilisés dans l'eau.

En 2003, un très joli modèle supramoléculaire mimant la translocation d'un polymère à travers des pores ou des canaux a été développé par Nolte.[131,132] Ce système dénommé Rotaxane permet de fileter un polymère transloqué au travers d'un noyau macrocyclique ; ce noyau macrocyclique étant constitué en partie d'une porphyrine de manganèse permettant une réaction d'oxydation. Cette réactivité a été testée sur le polybutadiène avec la réalisation de 310 TON et une sélectivité pour l'époxyde *cis* de 80 %, en présence de PhIO dans $CDCl_3$.

En plus des systèmes macromoléculaires dits homogènes, décrits ci-dessus, il existe également des systèmes macromoléculaires permettant de travailler en phase hétérogène. Ces derniers sont présentés dans la partie suivante.

II-A-4-b) Catalyse hétérogène

Enormément de systèmes catalytiques hétérogènes ont été développés, comme par exemple des matériaux à base de cuivre pouvant oxyder des alcanes avec H_2O_2 dans l'acétonitrile,[133] des systèmes composés de zéolites[134] ou d'hydrotalcites.[135] Les polyoxométallates ont également beaucoup été utilisés en catalyse hétérogène. Un exemple significatif est celui du polyoxométallate $H_3PW_{12}O_{40}$, fonctionnalisé par une molécule de surfactant, le bromure de di-(11-hydroxyundecyl)diméthylammonium (DOHDA·Br), pour conduire au polyoxométallate encapsulé dans un surfactant $(DOHDA)_3PW_{12}O_{40}$ qui a ensuite été immobilisé sur une surface de silice. L'environnement hydrophobe du POM interagit fortement avec le substrat hydrophobe puis relargue le substrat oxydé plus polaire. Ce système à base de Catalyseur Hybride Supramoléculaire (SHC) catalyse l'oxydation du dibenzothiophène (DBT) et l'époxydation du cyclohexène par H_2O_2 dans MeCN avec d'excellentes activités catalytiques caractérisées respectivement par 100 % de conversion (1 000 TON) avec une sélectivité de 100 % pour la sulfone en 42 minutes à 40°C, et de 86 % de rendement (860 TON) et 100 % de sélectivité pour l'époxyde en 2 heures à température ambiante. Ce système est plus efficace que le polyoxométallate seul en solution (**Schéma I.32**).[136]

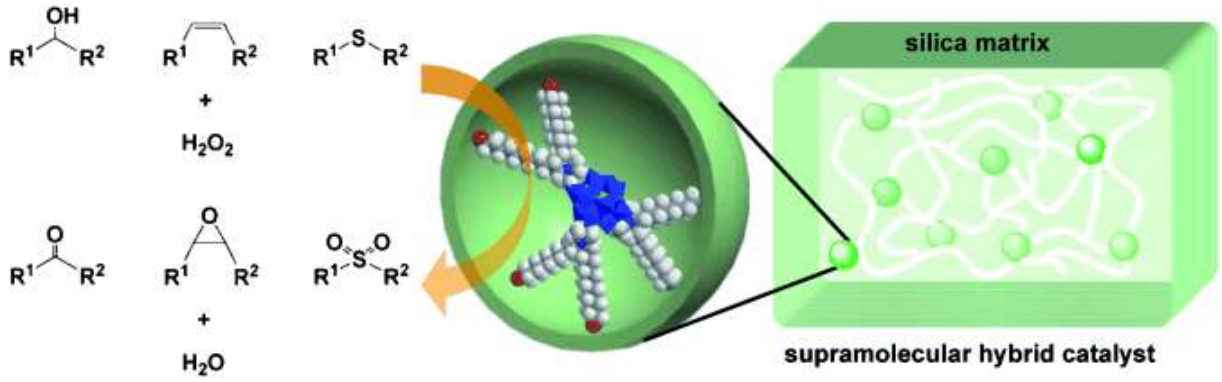


Schéma I.32 : Représentation schématique de la catalyse d'oxydation du DBT et du cyclohexène par le système catalytique SHC- 1.[136]

Une stratégie semblable a été utilisée pour construire des cônes moléculaires fonctionnalisés à partir des mêmes polyoxométallates avec des nano-cristaux de magnétite (**Schéma I.33**).[137] Ces nano-cônes sont quasiment homogènes en solution. La cinétique d'oxydation du DBT par ces systèmes est plus rapide que celle observée avec les SHC avec une conversion totale du substrat par H_2O_2 en 20 minutes dans le n-hexane à 50°C. Nous pouvons supposer que la réaction est spécifique de la formation de la sulfone avec 100 % de sélectivité du fait d'une température réactionnel plus importante que dans l'exemple précédent, entraînant une suroxydation du sulfoxyde en sulfone. Les nano-cônes sont cependant moins efficaces en époxydation.

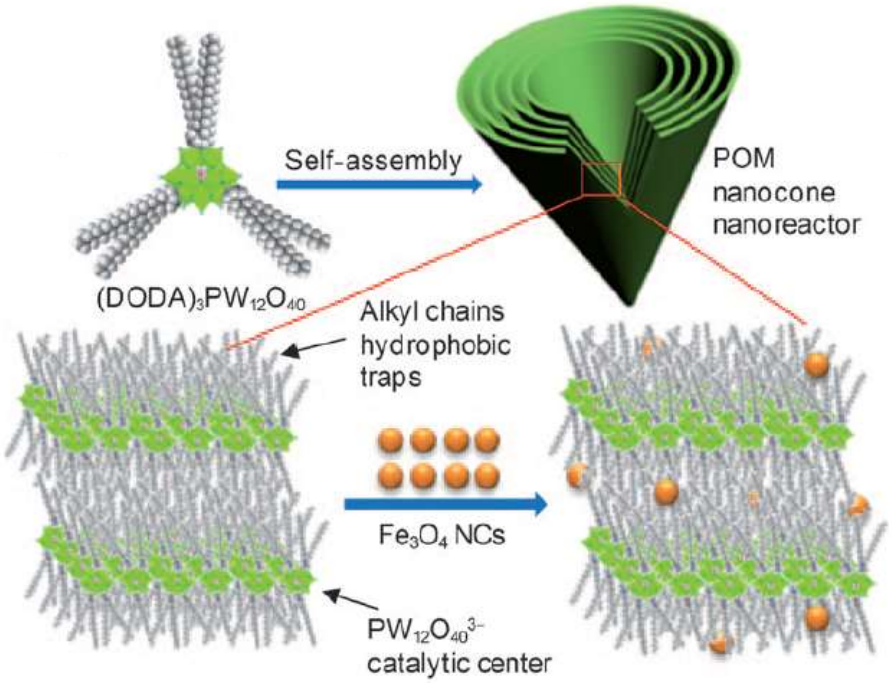


Schéma I.33 : Illustration schématique des cônes nano-réacteurs à base de POM.[137]

Pour conclure, de nombreux ligands ont été synthétisés pour mimer au plus près les sites actifs des différents types d'enzymes : héminique, non-héminique mononucléaire et binucléaire, et ce afin de se rapprocher des activités catalytiques des enzymes. De très bons catalyseurs ont été découverts, avec cependant des inconvénients majeurs lorsque l'on veut se rapprocher du système biologique : ils fonctionnent dans des solvants organiques et ont besoin d'un oxydant tel que H_2O_2 en excès pour réaliser des cycles catalytiques. Pour mimer au plus près les systèmes biologiques, il est nécessaire d'utiliser O_2 comme source d'atome d'oxygène lors des réactions d'oxydation, et d'arriver à réaliser ces réactions dans l'eau. Toutefois, l'étude de l'activation d'O_2 dans les solvants organiques est un bon point de départ.

II-B) Catalyse d'oxydation bio-inspirée utilisant le dioxygène dans les solvants organiques

II-B-1) Matériaux réalisant des réactions d'oxydation avec O_2 en solvant organique

L'utilisation de réactifs inorganiques comme des sels de cuivre ou d'autres métaux en excès est encore très répandue pour les réactions d'oxydation. La catalyse d'oxydation *via* l'utilisation de matériaux fournit des solutions intéressantes à ces méthodes. Des exemples marquants ont été obtenus. Ainsi l'oxydation sélective d'une fonction alcool sur des stéroïdes a pu être réalisée en utilisant un matériau élaboré par adsorption de platine sur graphite en phase aqueuse. L'utilisation de perruthénates immobilisés sur silice a permis l'oxydation sélective d'alcools primaires. De plus ces matériaux sont recyclables, ce qui constitue un avantage majeur.[138]

Récemment, un catalyseur supporté à base de zirconium et de ruthénium, $Ru(OH)/ZrO_2$, a montré de très hautes performances en termes d'oxydation sélective d'alcools en aldéhydes. Sous une atmosphère d'O_2, et en absence de solvant, à 100°C, il réalise jusqu'à 63 000 TON. De plus, ce catalyseur est réutilisable au moins dix fois sans perte d'activité, ce qui en fait un candidat intéressant pour l'industrie.[139] Un autre exemple marquant est l'utilisation du système supporté Cu/ZnO:Al qui permet la synthèse du méthanol à partir d'un mélange de gaz $H_2/CO_2/CO$ sous une pression de 60 bars et une température de 250°C. C'est le principal procédé utilisé actuellement dans l'industrie pour l'oxydation du méthane en méthanol.[140]

Quelques problèmes, telles que la corrosion, la dégradation du métal, la récupération et la réutilisation des matériaux viennent limiter l'utilisation de ces catalyseurs supportés (ou matériaux) dans l'industrie.[141] Très peu d'exemples sont ainsi applicables actuellement, dont les deux cités ci-dessus.[142] Pour finir, ces systèmes demandent aussi beaucoup d'énergie, car ils nécessitent une température et une pression élevées pour fonctionner efficacement.

Pour remédier à ces problèmes énergétiques en travaillant dans des conditions douces, de nombreuses recherches sont réalisées en amont de l'application industrielle, en utilisant des catalyseurs ayant des sites actifs inspirés des trois types d'hydroxylases décrites précédemment.

III-B-2) Systèmes moléculaires réalisant des réactions d'oxydation avec O_2 en solvant organique

III-B-2-a) Les systèmes à base de métalloporphyrines

L'activation d'O_2 est compliquée et nécessite la plupart du temps l'utilisation d'un réducteur. Dans les années 1980, les premiers résultats rapportés utilisaient divers réducteurs comme le tetrahydruroborate de sodium ($NaBH_4$), des poudres métalliques (comme le zinc), l'acide ascorbique ou encore des aldéhydes, directement en solution, ce qui posait le problème majeur de la réduction directe de l'espèce oxydante formée entrant en compétition avec sa réaction avec le substrat. Par la suite, l'idée d'utiliser NADPH ou NADH directement s'est avérée compliquée, car le transfert d'électrons est un mécanisme qui doit être parfaitement contrôlé pour fonctionner correctement, les électrons devant arriver séparément et au bon moment au centre métallique. Par ailleurs, les molécules comme NADH ou NADPH fonctionnent par transfert d'hydrure et ne sont donc pas directement adaptées à des transferts mono-électroniques vers un centre métallique.

Il existe quelques publications étudiant la réactivité des porphyrines avec O_2.[143,144] Le premier système actif avec O_2 comme source d'atome d'oxygène dans les solvants organiques est un modèle de cytP450, développé par l'équipe de Koga en 1979.[145] Il associe une porphyrine de manganèse ($Mn^{III}TPPCl$), mimant l'hème, avec $NaBH_4$ en grand excès comme réducteur mimant le NADPH, dans un mélange benzène/éthanol (1/1). Ce système permet l'oxydation du cyclohexène en cyclohexanol et cyclohexénol avec un rendement quantitatif et une sélectivité respective de 80 % et 20 %. C'est un concept très intéressant, mais les auteurs ont observé, que sans $NaBH_4$ l'oxydation du cyclohexène en cyclohexènone et cyclohexènol se faisait quand même avec un rendement de 100 % et une sélectivité respective de 80 % et 20 %. Néanmoins, la réaction est plus lente et la formation du cyclohexanol n'est pas observée, ce qui amène les auteurs à penser qu'en présence d'un grand excès de $NaBH_4$ l'ouverture de l'époxyde est favorisée pour donner le cyclohexanol.

Dans les années 1980, trois systèmes utilisant cette même porphyrine de manganèse ($Mn^{III}TPPCl$) ont été développés. Le premier utilise comme réducteur le couple Pt colloïdal/H_2, en suspension dans l'éthanol. Dans ce cas, H_2 est le donneur d'électrons. La réaction d'oxydation du cyclohexène dans le benzène, en présence de N-méthylimidazole, en 63 heures à température ambiante sous une atmosphère de H_2 et O_2 (1/1), conduit à l'époxyde correspondant. Le rendement de cette réaction est de 90 % (65 TON), la présence d'une faible quantité de cyclohexènone (7 % ; 4,4 TON) est toutefois observée.[146] Cependant, faire cohabiter H_2 et O_2 peut s'avérer très dangereux, ce qui représente un frein à son utilisation.

Le deuxième système utilise l'ascorbate comme réducteur, dans un mélange benzène/toluène/tampon tris (1 :1 :1) où le toluène est le substrat. Ce système achève l'oxydation du toluène en benzaldéhyde en 10 heures à 20 °C, sous une atmosphère de O_2 et en présence de TOMA (trioctylammoniumtris(hydroxymethyl)methylamine). Cette réaction achève la réalisation de 4 TON.[147] Cette faible activité catalytique peut s'expliquer par le fait que l'ascorbate réagit directement avec O_2. Ce système est plus efficace pour l'oxydation d'alcool mais nécessite une plus grande quantité de substrat.

Le troisième système, connu comme le « Gif système », associe la porphyrine de manganèse ($Mn^{III}TPPCl$) en présence d'imidazole, avec de la poudre de zinc et de l'acide éthanoïque censés mimer le NADPH, achève l'époxydation du cyclooctène dans l'acétonitrile avec un rendement de 50 % par rapport à Zn (75 TON), à température ambiante et sous une atmosphère d'O_2 en 30 minutes.[148,149] Ce système est un peu compliqué, la participation de chacun des composants dans la réaction n'est pas bien définie. De plus, il est impossible de récupérer le substrat oxydé.

Plus récemment, des systèmes dit « pacman », à base de porphyrines de fer, ont été développés par le groupe de Nocera. La première réaction testée a été l'oxydation du diméthyl sulfure (DMS) dans le benzène sous une atmosphère de O_2 à température ambiante. Après irradiation à 360 nm de la solution pendant 20 heures. La catalyse est efficace et donne le sulfoxyde correspondant avec 90 % de sélectivité et 610 TON (**Schéma I.34**).[150]

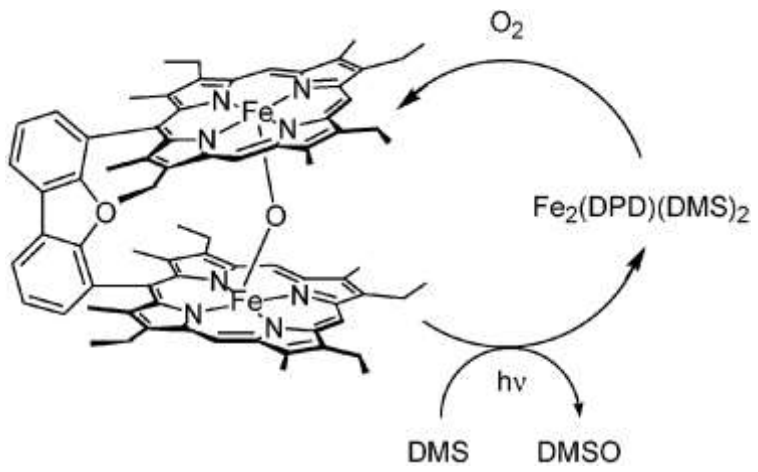


Schéma I.34 : Représentation schématique du cycle catalytique du « Pacman » pour l'oxydation du DMS.[150]

Ces systèmes permettent aussi la photooxydation du fluorène dans la pyridine en 18 heures à 25°C, de façon quantitative et sélective avec 320 TON.[151] Il faut toutefois noter que le fluorène est un substrat assez facile à oxyder. L'avantage de tels systèmes est la possibilité de s'affranchir de l'utilisation d'un réducteur. En revanche, ils consomment de l'énergie lors de l'irradiation. Cette année, un système à base de métalloporphyrine $[Mn^{III}(H_2O)(TBP_8Cz(H)_2)]^{2+}$, réalisant la photoxydation de l'héxaméthylbenzène, sous une atmosphère de O_2, a été décrit. Ce système permettrait l'utilisation des deux atomes d'oxygène du dioxygène.[152]

II-B-2-b) Les systèmes à base de cuivre

Une revue parue cette année récapitule toutes les réactions d'oxydation réalisées avec des sels de cuivre.[94,153] Les systèmes décrits fonctionnent dans des conditions dures, et il est souvent nécessaire de chauffer à plus de 50°C ou de rajouter des additifs. En outre, très peu de systèmes à base de cuivre utilisant O_2 dans des solvants organiques sont décrits, mais de nombreuses études mécanistiques sur l'activation de O_2 sont reportées.[154,155] Par ailleurs, la plupart des systèmes décrits pour la catalyse sont des mimes de catéchol dioxygénases, avec un site actif binucléaire à cuivre(I)

et oxydent le 3,5-di-tert-butylcatechol (3,5-DBTC) de façon stœchiométrique. Ces complexes sont efficaces pour ce type de catalyse mais sont quand même limités à cette unique réactivité.[156,157] De manière similaire au complexe binucléaire de cuivre précédent, un complexe dinucléaire de cuivre (I) mime la tyrosine oxydase en utilisant le 2,4-ditertbutylphenol (2,4-DTBP).[158] En parallèle, le premier exemple d'hydroxylation aliphatique intramoléculaire a été rapporté, au sein du ligand bis(2-pyridylméthyl)amine (bpa) du complexe mononucléaire de cuivre $[Cu^{II}(bpa)(CH_3CN)_2](ClO_4)_2$).[159]

En ce qui concerne les réactions d'oxydation intermoléculaires, un mime de la galactose oxydase, qui est un complexe mononucléaire de Cu(II) $[Cu^{II}(BSP)\text{-}(BF_4)]$, a été rapporté pour l'oxydation de l'alcool benzylique en benzaldéhyde avec en parallèle la réduction de O_2 en H_2O_2. Dans un mélange alcool benzylique/DCM/MeCN (90:5:5), sous une atmosphère de O_2 à température ambiante. Avec ce complexe, 1 300 TON sont achevés en 20 heures.[160] Ce type de catalyseur ne peut réaliser que l'oxydation d'alcools, vraisemblablement de façon radicalaire.

Le système catalytique à base de cuivre le plus intéressant à ce jour est un complexe trinucléaire de cuivre(I) du ligand 3,3'-(1,4-diazepane-1,4-diyl)bis[1-(4-ethylpiperazine-1-yl)propan-2-ol], $[Cu^{I}Cu^{I}Cu^{I}(7\text{-N-Etppz})]^{1+}$. Il a été démontré que ce complexe activait O_2[161] et réalisait l'oxydation du méthane en méthanol dans MeCN, en 10 minutes, à température et pression ambiantes. La plupart des autres systèmes de la littérature ont besoin de températures élevées pour fonctionner. C'est un bel exemple, qui nécessite toutefois d'améliorer son efficacité qui n'est que de 1 TON (**Schéma I.35**).[162]

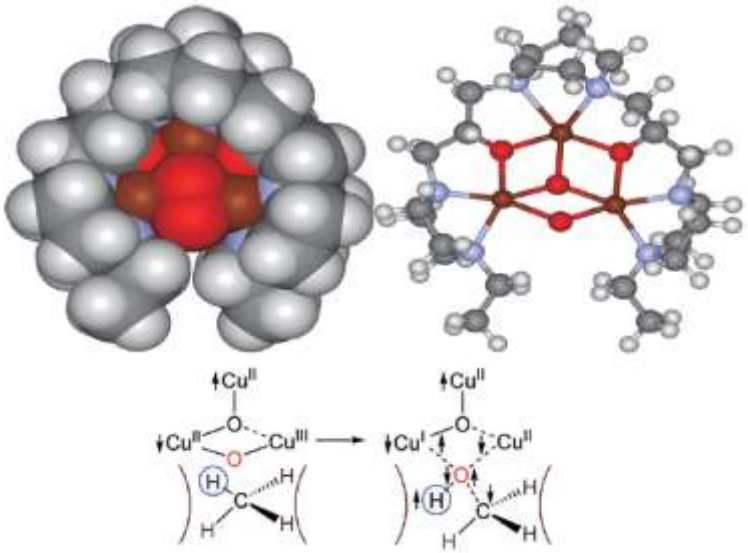


Schéma I.35 : Modèles de la structure 3D optimisée de $[Cu^{II}Cu^{II}(MO)_2Cu^{III}$ (7 -N- Etppz)$]^{1+}$ en « space-filling » (à gauche) et en « stick-and-ball (à droite) démontrant l'ouverture en forme d'entonnoir vers le bas permettant à un substrat hydrocarboné d'accéder à l'oxène. (H en blanc, C en gris, N en bleu, O en rouge et Cu en marron). En bas : Formation de l'état de transition proposé lors du transfert d'oxène au méthane à partir du complexe trinucléaire de cuivre.[162]

Enfin, cette année est décrit un complexe mononucléaire de cuivre relié à un complexe de ruthénium photoactivable par une bypiridine modifiée pour donner le complexe $[(bpy)_2Ru(bpbpa)Cu(OTf)(CH_3CN)]^{3+}$ où bpy désigne le ligand 2,2'-bipyridine, et bpbpa désigne le ligand N-(4-((5H-dipyrido[3,2-c:2',3'-e]azepin-6(7H)-yl)methyl)benzyl)-1-(pyridin-2-yl)-N-(pyridin-2-ylmethyl)méthanamine) abrégé par Ru^{II}_{phot}-Cu^{II}_{cat} a été synthétisé. Ce système permet l'oxydation du thioanisole en sulfoxyde, par irradiation à 468 nm pendant 24 heures, à température ambiante dans MeCN et sous bullage de O_2, avec un pourcentage de conversion de 98 % (97 TON). Il permet aussi d'oxyder le cyclohexène, avec de moins bon rendements cependant.[163]

II-B-2-c) Les systèmes à base de fer

De très nombreuses études concernant la caractérisation d'intermédiaires à haut degré d'oxydation formés en présence de dioxygène, ont été réalisées. Celles-ci portent surtout sur des complexes binucléaires créés à partir de deux complexes mononucléaires de fer(II) pontés par un carboxylate.[164] Certains complexes mononucléaires forment également des dimères pontés par trois oxo.[165]

Des études sur des complexes strictement mononucléaires de fer(II)[166,167,168] sont aussi décrites, et parmi elles, un exemple où le complexe de fer(II) peu activer directement le dioxygène de l'air et oxyder PPh_3 alors que les complexes mononucléaires de fer(II) n'activent pas O_2 habituellement. Une étude démontre l'activation réductrice de O_2 par le complexe $[Fe^{II}(Bn\text{-}TPEN)]$ grâce à l'utilisation d'un analogue du NADH. Cette étude est très intéressante pour le transfert d'électrons.[169] Deux exemples d'activation de O_2 par des complexes mononucléaires de fer(III) formant un complexe dinucléaire µ-oxo ont également été rapportés.[170,171]

En ce qui concerne la catalyse, les systèmes développés par le groupe de Lippard,[172] mimant le site actif de la MMOs, qui sont des complexe binucléaires de Fe(II) avec des pont carboxylate et un ligand aromatique fonctionnalisé avec différents groupes, tels que les complexes $[Fe_2(\mu\text{-}O_2CAr^{Tol})_2(O_2Ar^{Tol})_2(N,N\text{-}Bn_2en)_2]$[173] et $[Fe_2(\mu\text{-}O_2\text{-}CAr^{Tol})_3(O_2CAr^{Tol})(2\text{-}Ph_2Ppy)]$, réalisent l'oxydation stœchiométrique du ligand aromatique, à température ambiante, sous une atmosphère de O_2. Cette réaction produit respectivement du benzaldéhyde avec un rendement de 60 % et de l'oxyde de 2-pyridyldiphenylphosphine dans le DCM. Dans ce deuxième cas, le fait de rajouter du substrat (ligand) permet de réaliser 13 TON en une heure.[174] Toutefois, l'exemple le plus efficace a été développé par le groupe de Suzuki. C'est un complexe binucléaire de fer(II), $([Fe_2(L^{Ph4})(Ph_3CCO_2)(OH)](ClO_4)_2.3CH_2Cl_2.2H_2O$ où L^{Ph4} désigne le ligand *N,N,N',N'*-tetrakis[(1-methyl-2-phenyl-4-imidazolyl)methyl]-1,3-diamino-2-propanolate). Ce complexe permet l'oxydation intramoléculaire de Ph_3CCO_2 dans le DCM à 25°C à l'air libre, avec un rendement de 90 % en 10 minutes (**Schéma I.36**).[175]

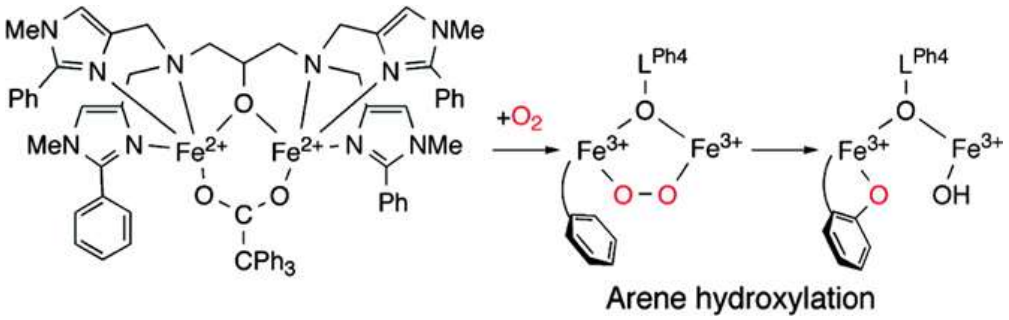


Schéma I.36 : Structure du complexe $[Fe_2(L^{Ph4})(Ph_3CCO_2)(OH)](ClO_4)_2.3CH_2Cl_2.2H_2O$ et mécanisme de l'hydroxylation intramoléculaire en présence de O_2.[175]

Un autre exemple mimant le site actif de la MMOs, le complexe [{Fe(HBpz$_3$)(hfacac)$_2$}O], réalise l'hydroxylation de l'adamantane (48,3 TON), avec une sélectivité de 96 %,et du cyclohexane (4,7 TON), avec une sélectivité de 95 % pour la formation de l'alcool vis-à-vis de la cétone. Cette réaction se fait en présence de poudres de zinc et d'acide dans le DCM, à température ambiante et sous une atmosphère de O_2 en 30 heures.[176,177]

Des complexes binucléaires de fer(II) de ligand macrocyclique comme $[Fe^{II}_2$ R(bac)$_2$(dfp)$_2$]Cl$_2$ ont aussi été rapportés pour l'oxydation de ces mêmes substrats, et possèdent une meilleure activité catalytique que le complexe binucléaire de fer [{Fe(HBpz$_3$)(hfacac)$_2$}O] décrit précédemment, en faisant barboter O_2 dans MeCN pendant 20 heures, en présence de sulfure d'hydrogène. La réaction n'est pas sélective et les TON sont respectivement de 45 et 35 pour l'adamantane et le cyclohexane.[178]

Des réactions de photooxydation avec des complexes binucléaires de fer(III) ont aussi été décrites. Ces réactions se font en présence de complexe de ruthénium photoactivable (réducteur) et de triéthylamine (accepteur sacrificiel d'électron permettant la réalisation de plusieurs cycles catalytiques). Les atomes de fer(III) sont réduits en fer(II) par le ruthénium photoactivé et peuvent ainsi activer le dioxygène de l'air et permettre l'oxydation de substrats comme PPh_3.[179]

Dans le cas des complexes mononucléaires, ce sont des exemples à base de fer(II) qui sont décrits. En général, ces complexes ne réagissent pas avec O_2 dans MeCN. C'est le cas des complexes Fe(II)TPA, Fe(II)BPMEN, Fe(II)N4Py et Fe(II)TMC qui sont les plus utilisés et nécessitent un co-solvant comme l'éthanol pour activer O_2. En effet, le fait que les complexes précédemment cités n'activent pas le dioxygène dans MeCN vient du haut potentiel redox des couples Fe(III)/Fe(II) en solution. Ainsi, dans MeCN, le potentiel de ces couples est positif alors que dans un mélange MeCN/éthanol, par exemple, il est négatif.[180] Cependant, en 2013, il a été décrit qu'un complexe mononucléaire de Fe(II) avec le ligand N,N'-dineopentyl-N,N'-bis(2-pyridylmethyl)-1,2-ethanediamine, [Fe(II)(dnbpn)(OTf)$_2$], pouvait réaliser l'oxydation du cyclohexène en alcool et cétone correspondants par activation d'O_2 avec une sélectivité respective de 4 :1, à température ambiante dans MeCN. Certes, ce complexe est très peu actif (2 TON en 30 minutes), mais il réagit mieux sur le substrat dihydroanthracène (64 TON). Il est certes très peu sélectif, mais à notre connaissance, il constitue le seul exemple de la littérature capable d'activer O_2 directement dans MeCN.[172]

Une autre réactivité importante des complexes à base de fer est la catalyse de la coupure oxydante de cycles aromatiques, réaction souvent utilisée dans l'industrie pour avoir accès à des

synthons de départ pour l'élaboration de molécules plus compliquées. En effet, la coupure oxydante de catéchols par exemple, est la première étape pour la production du diméthyladipate qui est le synthon de départ pour la synthèse de l'acide adipique utilisé dans la synthèse du nylon. Cette coupure oxydante peut se faire grâce à l'action d'un complexe mononucléaire de fer(III) : [Fe(III)TPA].[181] Cette année, un exemple de coupure oxydante du méthylstyrène et de ses différents dérivés α et β substitués, réalisée à partir d'un complexe mononucléaire de fer(III) : [Fe^{III}(Py-bisuldine)$(OTf)_3$] synthétisé *in situ*, avant l'ajout du substrat a été rapporté.[182] Pour le méthylstyrène, la réaction est réalisée dans le dichloroéthane à 70°C sous une atmosphère de O_2. Les produits obtenus sont le méthylbenzaldéhyde et le formaldéhyde avec 99 % de conversion et 100 % de sélectivité en 6 heures. Ici, l'inconvénient majeur est la dégradation du ligand lors de la réaction. Dans l'industrie, ces réactions sont réalisées en présence d'ozone, qui est dangereux à manipuler et peu sélectif pour la formation de carbonyle. Ce type d'oxydation est également réalisé en présence de complexes de cobalt, avec une sélectivité moindre et par un mécanisme radicalaire, de sels de cuivre, de façon éléctrocatalytique, et de porphyrines de manganèse mais dans des conditions drastiques. Le même complexe [Fe^{III}(Py-bisuldine)$(OTf)_3$] catalyse également l'oxydation d'ethers.[183]

De nombreux exemples existent aussi avec des complexes de palladium et de platine, qui portent surtout sur des études de caractérisation d'intermédiaires formés par activation du dioxygène de l'air.[184]

II-B-2-d) Les systèmes macromoléculaires

Des études mécanistiques impliquant la caractérisation d'intermédiaires ont été réalisées sur des polyoxométallates (POM),[185] ainsi que des études sur l'effet de l'architecture des structures supramoléculaires sur l'activation de O_2.[186]

Les systèmes supramoléculaires sont peu utilisés dans les solvants organiques. Dans cette partie seront présentés quelques exemples non exhaustifs décrits dans la littérature et nous paraîssant intéressants, comme par exemple l'utilisation d'un dendrimère comme ligand, incorporant un cœur binucléaire de fer(II) qu'il protège, offrant ainsi une plus grande robustesse au complexe lors de la catalyse. Ce complexe [Fe^{II}_2([G-3]COO)$_4$ (4-Rpy)$_2$], où [G-3]COO^- désigne une troisième génération de dendrimère couplant des ligands terphényle carboxylate, et où 4-Rpy est un dérivé de pyridine, réalise l'oxydation du 9,10-dihydroanthracène (DHA), dans MeCN sous une atmosphère de O_2 avec une température variant de - 29°C à température ambiante en 12 heures. La catalyse est peu efficace et peu sélective, avec une conversion globale de 38 % dans le meilleur des cas, incluant 13 % pour l'anthracène et 25 % pour l'anthraquinone (**Schéma I.37**).[187] De plus, la synthèse de ces dendrimères est contraignante car elle nécessite de nombreuses étapes.

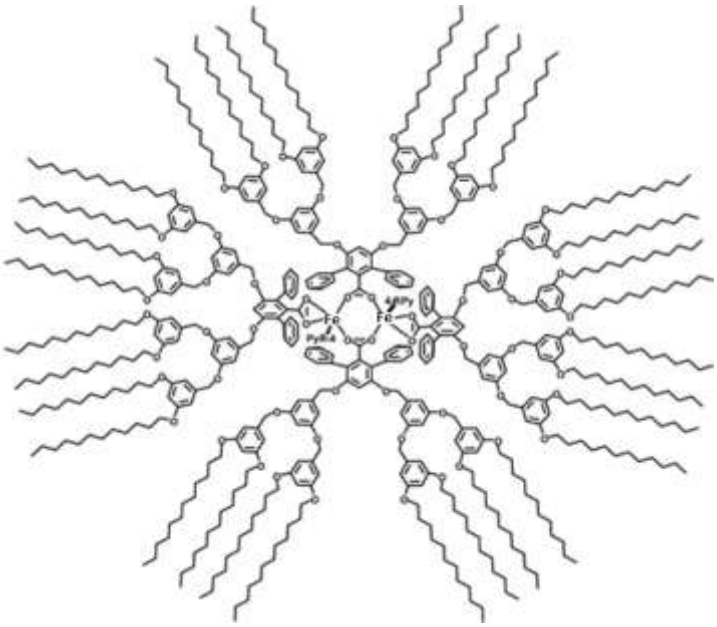


Schéma I.37 : Structure du complexe binucléaire de fer(II) incorporé dans un dendrimère $[Fe^{II}_2([G\text{-}3]COO)_4(4\text{-}Rpy)_2]$.[187]

D'autres systèmes catalytiques, les polyoxométallates (POM), sont énormément utilisés. Un des premiers polyoxométallates décrit dans la littérature est constitué de ruthénium, de zinc et de tungstate. Sa formule est $\{[WZnRu_2(OH)(H_2O)]ZnW_9O_{34}\}^{11-}$. Ce POM, non activé au préalable, permet l'oxydation de l'adamantane dans le 1,2-dichloroéthane, à 80°C sous une atmosphère de O_2, réalisant 118 TON en 24 heures.[188] Il catalyse également l'époxydation du cyclooctène, à température et pression ambiante dans le 1,2-dichloroéthane en 2 heures avec la réalisation de seulement 0.7 TON mais une sélectivité de 99 % en faveur de l'époxyde. Cependant dans ce second cas, le POM est activé à 80°C pendant 12 heures.[189] En parallèle, un autre POM composé de silice et de tungstate, le $[\gamma(1,2)\text{-}SiW_{10}\{Fe(OH_2)\}_2O_{38}]^{6-}$, catalyse l'époxydation asymétrique du cyclooctène avec une conversion de 86 % et une énantiosélectivité de 98 % en faveur de l'epoxyde (*S*). Cette réaction se fait dans un mélange 1,2-dichloroéthane /MeCN (1:1), à 60°C, sous une atmosphère de O_2. Ce dernier est très robuste car il ne se dégrade pas pendant 400 heures et achève 10 000 TON.[190] Plus récemment, des POM à base de métaux « moins nobles », comme $H_5PV_2Mo_{10}O_{40}.34H_2O$, ont été décrits en tant que catalyseurs de l'oxydation sélective de l'anthracène et du xanthène respectivement en anthraquinone et xanth-9-one. Les conversions respectives sont de 92 (18.4 TON) et 96 % (19.2 TON) dans MeCN, sous une atmosphère de O_2, à 60°C pendant 18 heures.[191] Ce même POM réalise l'oxydation du nitrobenzène en 2-nitrophénol, ce qui constitue un des rares exemples décrits dans la littérature de la réaction difficile que constitue l'obtention du 2-nitrophénol de manière sélective par oxydation du nitrobenzène. La réaction est achevée avec le substrat comme solvant (10 M), à 140°C sous 2 atmosphères de O_2. La conversion est faible (5 %) mais la nombre de cycle catalytique est intéressant (50 TON).[192] L'oxydation des substrats 2- et 4-nitrotoluène est elle aussi décrite dans les mêmes conditions. Les conversions sont respectivement de 1,7 % (17 TON) et 1,9 % (19 TON). L'oxydation du toluène, quant à elle, ne se produit pas.[101] Par

ailleurs, ce POM est aussi efficace pour l'oxydation d'alcools,[193] la sulfoxydation[194] et l'époxydation d'alcènes.[195]

Il existe deux problèmes majeurs à l'utilisation de ces polyoxométallates pour le développement de la chimie verte. Premièrement, il est nécessaire de les activer en les chauffant sur de longues durées (minimum 12 heures), à des températures élevées (80°C ou plus). De surcroît, il est nécessaire de chauffer le milieu réactionnel à des températures importantes (entre 65 et 140°C) pour que la catalyse soit efficace.

Les différents systèmes utilisés sont efficaces mais encore loin d'être éco-compatibles. Dans ce but, des systèmes ont été développés dans l'eau.

II-C) Catalyse d'oxydation bio-inspirée fonctionnant dans l'eau

Les systèmes bio-inspirés efficaces dans l'eau sont le plus souvent supra-macromoléculaires. La réactivité dans l'eau est compliquée, car beaucoup de substrats sont insolubles, de nombreuses réactions parasites ont lieu, l'équilibre thermodynamique n'est pas en faveur de nombreux procédés et les produits sont parfois difficiles à récupérer.

II-C-1) Les systèmes utilisant des oxydants chimiques

L'utilisation de H_2O_2, tBuOOH, ou PhIO dans l'eau est un premier pas vers une chimie plus éco-compatible. En effet, pour le moment, on utilise essentiellement différents sels de métaux qui sont très utilisés dans l'eau pour la catalyse d'oxydation. Le meilleur s'avère être un sel d'osmium.[196] Il reste cependant très peu efficace, toxique et coûteux.

II-C-1-a) Les systèmes moléculaires

Très peu d'études impliquant des complexes dans l'eau en présence d'H_2O_2 ont été rapportées dans la littérature. Certaines porphyrines comme la MnTMPyP et la FeTDCPPS, solubles dans l'eau peuvent, en présence de $KHSO_5$, époxyder la carbamazépine, avec un rendement de 99 % en une heure et des sélectivités respectives de 80 et 75 % en faveur de l'époxyde.[197]

Des complexes mononucléaires de fer(III) portant un ligand tetrahydrosalen possédant des groupements *o*-méthoxybenzyle, permettent l'oxydation asymétrique énantiosélective du thioanisole avec un rendement de 90 % (45 TON) et un excès énantiomérique (ee) de 95 % en faveur du sulfoxyde (S). Cette catalyse se fait dans l'eau en présence de H_2O_2 à 20°C en 3 heures. Si la quantité de substrat augmente par rapport au complexe, le nombre de TON augmente jusqu'à des valeurs pouvant atteindre 8 000 TON (**schéma I.38**).[198]

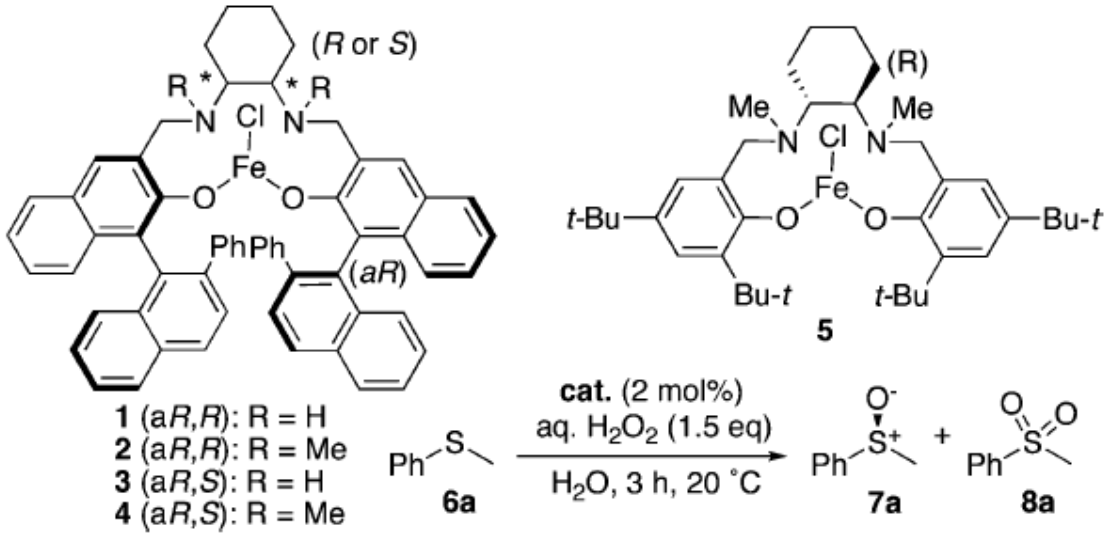


Schéma I.38 : Structure des complexes portant un ligand tetrahydrosalen (en haut) et la réaction de sulfoxydation catalysée (en bas).[198]

L'oxydation du méthane en méthanol, est aussi décrite utilisant un complexe de fer de phtalocyanine, Fe(μ-nitrido)tétra-tert-butylphthalocyanine ($FePc^t Bu_4)_2N$. Ce complexe achève la transformation non sélective du méthane en formaldéhyde et acide formique, dans l'eau à 60°C avec H_2O_2 sous 32 bars de méthane. Le rendement de la réaction est de 50 % en 20 heures avec 437 TON.[199,200] C'est un beau concept qui nécessite cependant une forte pression de méthane pour fonctionner. Un complexe de palladium réalise également cette réaction en présence d'acide trifluoroacétique (TFA), à une moindre pression, mais une température plus élevée. Son efficacité est moindre avec seulement 4 TON. De plus, il ne produit pas directement du méthanol, mais le trifluoroacétate de méthyle CF_3CO_2Me.[201]

Les catalyseurs les plus efficaces dans l'eau sont la plupart du temps supramoléculaires.

II-C-1-b) Les systèmes supramoléculaires

De très nombreux modèles supramoléculaires ont été inventés dans les dernières décennies. Initialement, la chimie supramoléculaire a commencé avec l'invention des cyclodextrines, des calixarènes et des cyclophanes, qui ont été couplés à un centre métallique et évalués comme modèles enzymatiques.[202,203] Par exemple, une cyclodextrine couplée à une porphyrine de manganèse réalise l'hydroxylation spécifique de stéroïdes en présence de PhIO dans l'eau, en 2h à température ambiante avec un rendement de 40 % (4 TON).[204,205]

Les cavitants sont aussi de bons complexants de métaux grâce à leur architecture disposant de 4 motifs coordinants rigides à des distances bien définies. Le meilleur exemple de cavitant utilisé en catalyse d'oxydation est un bis-fer(III) catalysant l'oxydation du fluorène en fluorènone avec un rendement de 100 % (10 TON). Cette catalyse s'effectue dans un mélange eau/MeCN (1 :1) à température ambiante et en présence de tBuOOH et d'une quantité catalytique d'acide éthanoïque.

Le problème majeur de ce complexe est qu'il ne réagit pas avec H_2O_2 et donc que le mécanisme d'oxydation serait certainement un processus radicalaire (**Schéma I.39**).[206]

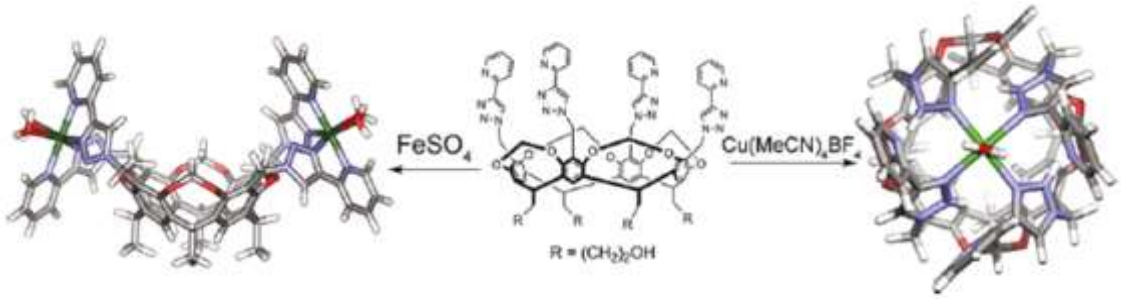


Schéma I.39 : Structure par diffraction des rayons X des cavitants utilisés.[206]

Un autre type de système souvent utilisé est constitué de complexes incorporés dans des micelles. Par exemple, l'utilisation d'un complexe $[Fe_2O(\eta\text{-}H_2O)(\eta\text{-}OAc)(TPA)_2]^{3+}$ avec un surfactant cetyltrimethylammonium (CTAHS) (formant les micelles), permet l'oxydation du cyclohexane dans l'eau à pH 4, à température ambiante en présence de tBuOOH. Le rendement est de 26 % (30 TON) en 5 heures, aucune sélectivité n'est observée.[207] Ce système ne fonctionnant ni avec H_2O_2 ni avec PhIO, un mécanisme radicalaire est vraisemblable. Des complexes à base de cobalt[208] et de platine,[209] incorporés dans des micelles, sont aussi rapportés, réalisant des réactions de Baeyer-Villiger dans l'eau.

Une autre approche commence à beaucoup intéresser les chercheurs : il s'agit de l'utilisation de polymères comme mimes de structures de protéines. Par exemple, une porphyrine de manganèse, la tétraaminophénylporphyrine de manganèse (Mn^{III}TAPP), avec du chlorure cyanurique, réalise un polymère (CPF-1) capable d'oxyder les alcanes aromatiques. Par exemple, CPF-1 réalise l'oxydation de l'éthylbenzène dans l'eau en présence de t-BuOOH à température ambiante en 12 heures avec un rendement de 99 %, sélectif de la cétone (**Schéma I.40**).[210]

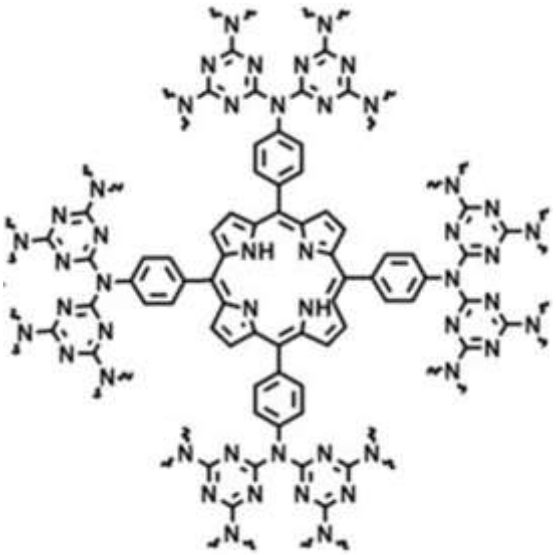


Schéma I.40 : Représentation schématique du polymère CPF-1.[210]

Un autre polymère à base de polystyrène chlorométhylé et d'un complexe de fer(III) [PS-Fe(III)teta] peut oxyder le cyclohexène dans l'eau en 6 heures à température ambiante avec H_2O_2. Le rendement de la réaction est de 82 %, avec 125 TON. Si le produit oxydé est facilement récupérable par extraction, aucune sélectivité n'est en revanche observée.[211] Les polymères sont assez faciles à synthétiser, néanmoins, des conditions de catalyse efficaces nécessitent souvent des températures élevées et la présence d'acide. Des polymères chiraux sont aussi décrits pour la catalyse d'époxydation énantiosélective, incorporant des complexes achiraux (**Schéma I.41**).[212] Ils associent un polymère chiral de type phénylglycine, dont les amines primaires sont phosphonatées et les groupements phosphonate complexés à du titane avec un complexe de manganèse achiral portant un ligand salen incorporé à l'intérieur.

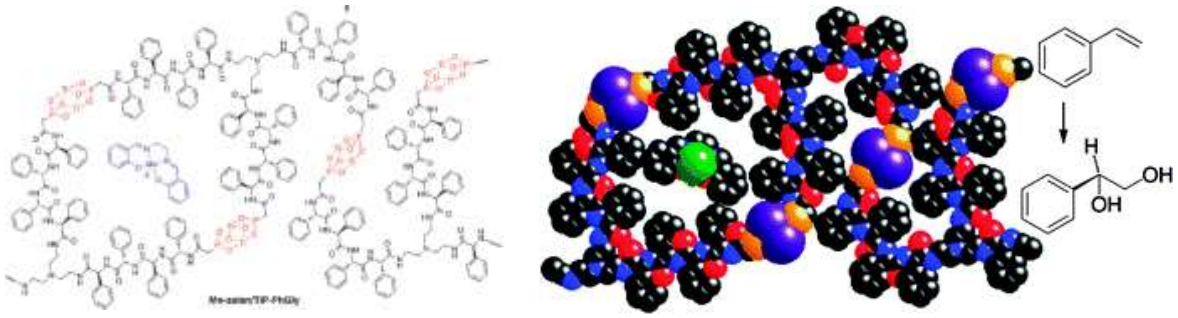


Schéma I.41 : Représentation schématique du polymère chiral TiP-PhGly incorporant un salen de manganèse achiral (à gauche) et sa structure en représentation « space filling » ainsi que sa réactivité (à droite).[212]

Cette entité permet l'oxydation du styrène dans un mélange NaOCl/THF (1:1), à 3°C en 48 heures avec un rendement de 86 %. La réaction n'est pas sélective, avec la formation d'époxyde et de diol. En revanche, dans chacun des cas, un ee a pu être calculé. Le meilleur résultat est obtenu pour le diol, avec un ee de 99 % en faveur du composé (S).

En ce qui concerne la catalyse hétérogène, les polyoxométallates sont des catalyseurs très efficaces. Par exemple, le POM $Na_{12}[WZnZn_2(H_2O)_2(ZnW_9O_{34})_2]$ effectue l'oxydation sélective du cyclohexanol en cyclohexanone en présence de H_2O_2 avec un rendement de 100 %, dans l'eau à 85°C en 7 heures sous une atmosphère de O_2.[213]

De nombreux autres systèmes hétérogènes, sont développés utilisant des zéolites, comme le système Cu-Fe-ZSM-5 SiO_2/ALO_3, qui est une amélioration du système sans cuivre publié précédement.[214] Ces systèmes sont vraiment efficaces. Ils catalysent l'oxydation du méthane en méthanol dans un autoclave, dans l'eau en 30 minutes à 50 °C sous une pression de méthane de 30.5 bars en présence de H_2O_2 avec un rendement de 0.7 % et une sélectivité de 85 % en faveur du méthanol. Toutefois, si l'on augmente la quantité d'oxydant, le nombre de TON augmente jusqu'à 3 000 mais, la sélectivité chute à 18 % en faveur du méthanol.[215] Ces catalyseurs sont récupérables et réutilisables au moins cinq fois sans perte d'activité. Néanmoins, un problème majeur réside dans le fait qu'il faut les activer en les préchauffant à 550°C et il est nécessaire d'avoir une forte pression de méthane lors de l'oxydation. Notons qu'il a été prouvé que le fer dans les pores est l'espèce oxydante.[210]

Un système composé d'un complexe binucléaire de fer $[Fe_2O(\eta\text{-}H2O)(\eta\text{-}OAc)(TPA)2]^{3+}$ (TPA : tris[(2-pyridyl)methyl]amine), adsorbé sur silice au milieu de chaînes poly(propylèneoxyde (PPO) et poly(éthylène oxyde) PEO a été décrit. Ce système catalytique réalise l'oxydation du cyclooctane, donnant un mélange de produits d'oxydation (cyclooctene, cyclooctanone, cyclooctanol et le peroxyde de *tert*butylcyclooctane, dans l'eau à pH 4,2 en présence de tBuOOH, en 3 heures à température ambiante avec un rendement dans le meilleur des cas de 90 % soit 142 TON (**Schéma I.42**).[216]

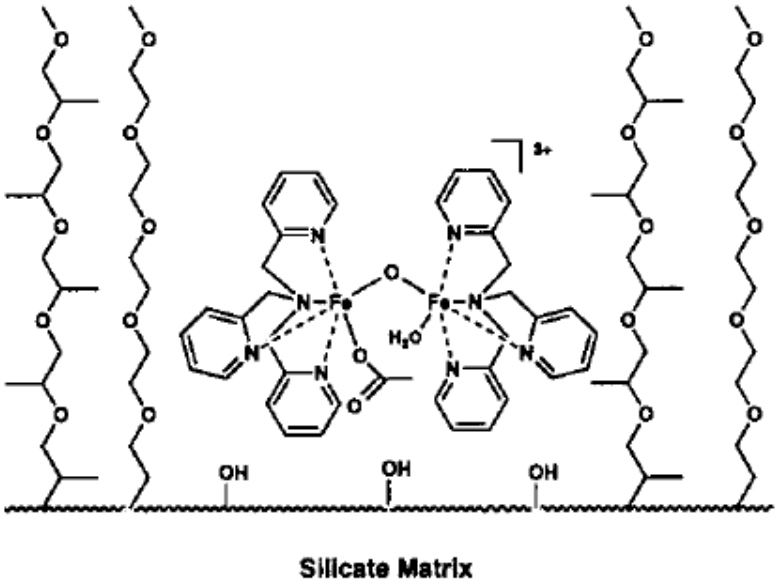


Schéma I.42 : Représentation schématique du système catalytique $[Fe_2O(\eta\text{-}H2O)(\eta\text{-}OAc)(TPA)2]^{3+}$ adsorbé sur silice et enfouie dans des PPO et PEO.[216]

Pour finir, des systèmes utilisant des nanoparticules déposées sur surface d'or et de palladium ont été élaborés pour la catalyse d'oxydation de méthane en méthanol. S'ils ne sont pas plus efficaces que le système Cu-Fe-ZSM-5 SiO_2/AlO_3 pour cette réaction,[217] en revanche ils sont très efficaces pour l'oxydation d'alcools.[218]

L'avantage des catalyseurs hétérogènes réside dans le fait qu'ils sont facilement séparables du produit d'oxydation. Les problèmes majeurs sont leur synthèse astreignante et leurs conditions d'utilisation souvent drastiques. En parallèle de ces modèles supramoléculaires, le développement de nouveaux biocatalyseurs hybrides est beaucoup étudié. Le concept réside dans l'utilisation d'apoprotéines, exprimées sans leur site actif et que l'on va fonctionnaliser avec un modèle de site actif, afin d'avoir la réactivité recherchée.

II-C-1-c) Elaboration de nouveaux biocatalyseurs hybrides

Au cours des quinze dernières années, de nombreuses équipes ont abordé la question des oxydations propres en élaborant des métalloenzymes artificielles, un nouveau type de biocatalyseurs qui serait en mesure d'effectuer efficacement, dans des conditions douces, des

réactions d'oxydation régio- et stéréosélectives en utilisant si possible le dioxygène de l'air comme oxydant. De nombreuses stratégies ont ainsi été développées, soit pour augmenter ou modifier la réactivité des métalloprotéines déjà existantes, soit pour induire une nouvelle réactivité par transformation d'une protéine ne contenant pas de cofacteur métallique en une métalloprotéine. Ces transformations incluent l'introduction de sites de liaisons pour un cation métallique, la modification chimique des groupements prosthétiques, ou la fixation covalente de cofacteurs métalliques.[219,220,221,222] Plusieurs revues récemment publiées décrivent les progrès récents dans la conception de métalloenzymes artificielles.[22,223,224,225]

Pour résumer, l'élaboration de nouveaux biocatalyseurs hybrides tente d'allier la robustesse et la versatilité d'un catalyseur synthétique avec les performances d'une enzyme, notamment leur habilité à fonctionner dans des conditions éco-compatibles : conditions de pression et température douces, et dans l'eau comme solvant. Deux problèmes majeurs doivent néanmoins être pris en compte : la stabilité des enzymes et leur production (expression). D'autre part, les enzymes acceptent généralement un nombre limité de substrats, leur modification doit se faire de façon génétique et tous les métaux ne peuvent être incorporés en leur sein.

En termes d'éco-compatibilité, le tableau d'ensemble y compris la préparation du catalyseur, la performance en termes de coûts, leur possible recyclage, et l'élimination doivent être pris en compte. Aux vues de ces conditions, les biocatalyseurs hybrides ne sont pas forcément plus éco-compatibles qu'un système composé uniquement d'un complexe à base de fer par exemple.

L'utilisation de H_2O_2 dans un but commercial est trop onéreuse. Il est donc nécessaire de trouver de nouveaux oxydants plus propres et moins coûteux. Dans ce but, utiliser directement le dioxygène de l'air, qui est beaucoup moins coûteux et beaucoup plus éco-compatible, semble être une solution idéale.

II-C-2) Les systèmes utilisant O_2

Le dioxygène est un élément essentiel à l'existence des organismes aérophiles. Il joue un rôle central dans la respiration cellulaire et il est également impliqué dans la biosynthèse et la dégradation d'un grand nombre de molécules. Dans tous ces processus, le dioxygène sert d'agent oxydant et il est le plus souvent réduit à 2, voire à 4 électrons. Bien que ces réactions soient thermodynamiquement très favorables (E° [H_2O_2/O_2] = +281 mV, E° [H_2O/O_2] = + 815 mV à température ambiante), elles sont fortement limitées d'un point de vue cinétique. Ceci est dû à la configuration électronique particulière de l'oxygène moléculaire qui, dans son état fondamental, possède deux électrons non appariés. Cet état de spin, nommé état triplet, empêche le dioxygène de réagir efficacement avec la plupart des molécules organiques qui, dans la majorité des cas, ne possèdent pas d'électron non apparié (état singulet). La loi de conservation de spin indique en effet que l'oxygène doit être préalablement converti en état singulet avant de pouvoir réagir avec ce type de molécules.[226] Cette conversion, nommée inversion de spin électronique, est limitée par une barrière d'activation importante qui ne peut être franchie qu'en présence d'un catalyseur. Le dioxygène, inerte dans son état fondamental, doit donc être activé afin d'exprimer ses propriétés oxydantes au sein de la cellule. D'une façon générale, l'activation du dioxygène s'effectue par des

processus de réduction, comme lorsque le dioxygène est utilisé par les hydroxylases ou les monooxygénases.

Une étude sur la caractérisation d'intermédiaires, dans l'eau en présence de dioxygène, a bien été rapportée en 1982,[227] sinon la plupart des études publiées portent sur la catalyse d'oxydation. Ainsi, l'utilisation de sels de cuivre pour l'oxydation d'alcools, dans l'eau en présence de surfactant, a été rapportée dans une revue récente. Les rendements sont plutôt bons ; toutefois, la catalyse est peu variée et peu sélective.[228]

À notre connaissance, aucun système moléculaire non supramoléculaire (hétérogène ou non) n'a été rapporté dans la littérature permettant des réactions de catalyse d'oxydation dans l'eau à l'exception des complexes binucléaires (μ-oxo)(μ-acétato)bis-Fe(III) développés par le groupe de Ménage et permettant des réactions d'hydroxylation aromatique intramoléculaires avec O_2 dans un mélange eau/MeCN (1:1).[229,230] La grande majorité des autres systèmes développés sont supramoléculaires et, le plus souvent, hétérogènes.

Le premier système, utilisant O_2 dans un mélange eau (tampon acétate)/MeCN (1 :1) a été mis au point en 1970 par le groupe de Breslow. Ce système est composé d'une cyclodextrine chélatant un complexe de nickel par un acide pyridine-2,5-dicarboxylique, auquel est ajoutée une pyridine carboxaldoxime. Ce système stable indéfiniment à 30°C, permet d'accélérer 2 000 fois la réaction de déacétylation du p-nitrophénylacétate, par rapport à la réaction sans catalyseur et 500 fois par rapport au complexe de Nickel seul. Cette réaction se produit à 30°C, à pH 5,17 en 20 heures.[231]

Pour les réactions d'oxydation à proprement parler, l'un des premiers systèmes a été décrit en 1986 par le groupe de Nolte (**Schéma I.43**).[232]

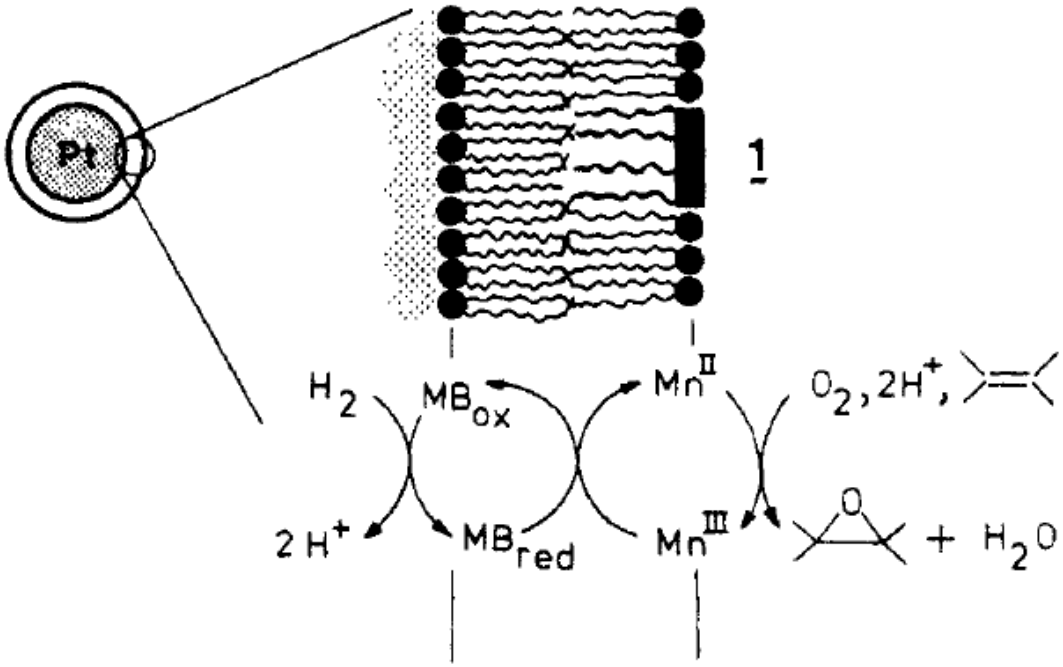


Schéma I.43 : Vésicule polymérique en tant que microréacteur. MB_{ox} et MB_{red} sont respectivement les formes oxydée et réduite du bleue de méthylène (chlorure de méthylthioninium).[232]

Ce système a pour objectif de mimer le cytP450. Il est donc composé d'une porphyrine de manganèse (mimant l'hème), d'un ligand axial N-méthylimidazole (mimant la cystéine proximale), d'un donneur d'électrons (Pt colloïdal couplé avec H_2 ; mimant le NADPH) et d'un transporteur d'électrons, le bleu de méthylène mimant la CPR. L'ensemble de ces composés est incorporé soit dans la partie hydrophobe, soit dans la partie hydrophile d'un système membranaire de type vésicule, formé à partir de molécules de bromure de diméthylhexadécyl[11-((1-isocyanoethyl)carbonyloxy)undecyl]amonium où l'isocyanoéthyle est une fonction polymérisable.[233] Ce système permet l'oxydation sélective du styrène en 1,2-dihydroxyphényléthane dans l'eau à pH 5, à 20 °C, sous une atmosphère d'un mélange O_2/H_2 (1 :1) avec une efficacité de 1.3 TON. Le problème majeur en plus de sa faible efficacité réside dans le risque d'explosion lié à la présence simultanée de dioxygène et de dihydrogène dans le milieu.

Le groupe de Groves a réalisé en 1987, avec la même philosophie, un mime de cytP450 composé d'une bicouche phospholipidique incluant la pyruvate oxydase en présence de pyruvate (mime NADH + CPR), d'une porphyrine de manganèse Mn^{III}ChPCl où ChPCl désigne le ligand *méso*-tetrakis-[*0*-((3-hydroxy-5-cholenyl)amido)phénylporphyrine immobilisée dans une vésicule de dipalmitoyl phosphocholine (DPPC) qui n'était toutefois efficace qu'avec PhIO.[234] En 1990, ce système a été amélioré pour fonctionner en présence de O_2 (**Schéma I.44**).[235]

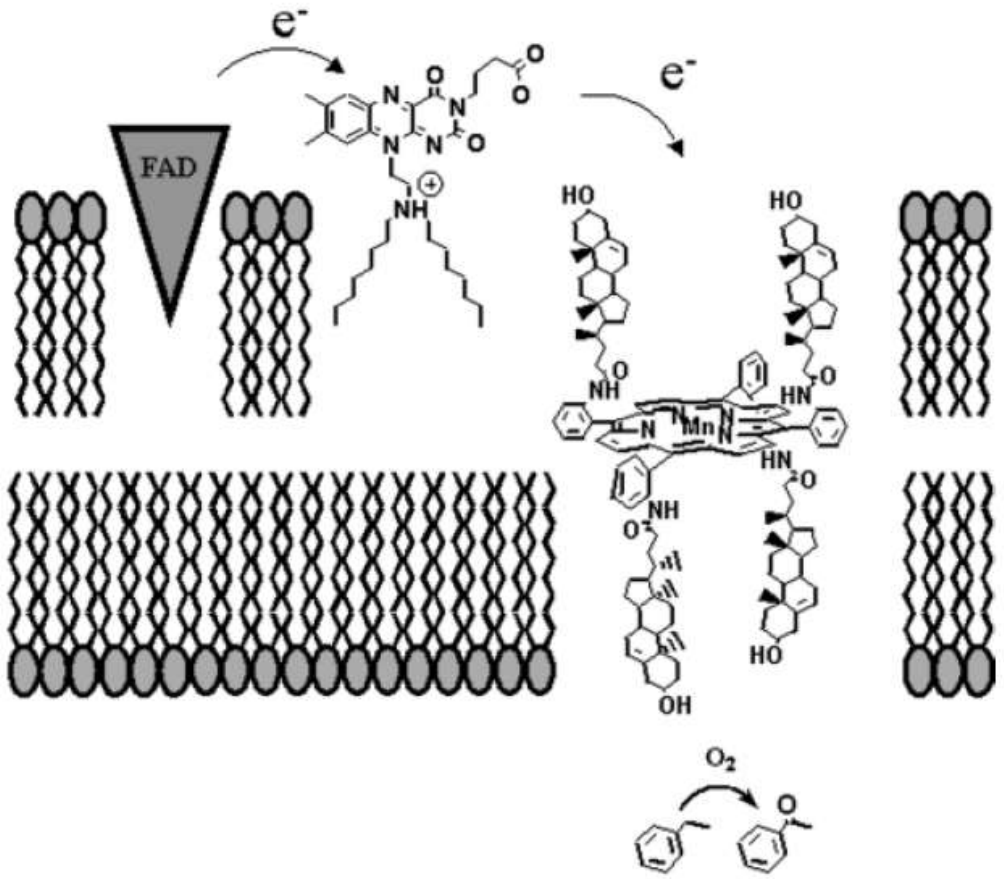


Schéma I.44 : Représentation schématique du système biocompatible. FAD est la flavoprotéine pyruvate oxydase.[235]

Ce système a pu être utilisé pour catalyser l'oxydation de l'éthylbenzène en acétophénone (20 TON), dans l'eau en 15 heures à 30°C, en présence de N-méthylimidazole et sous une atmosphère de O_2.[235] L'oxydation du cyclooctane ainsi que l'hydroxylation de stéroïdes avaient déjà pu être mises en évidence par un système semblable avec une porphyrine de fer, mais plus contraignant à synthétiser.[236]

Un dernier système, utilisant la même stratégie que les deux premiers, est présenté ci-dessous (**Schéma I.45**).[237]

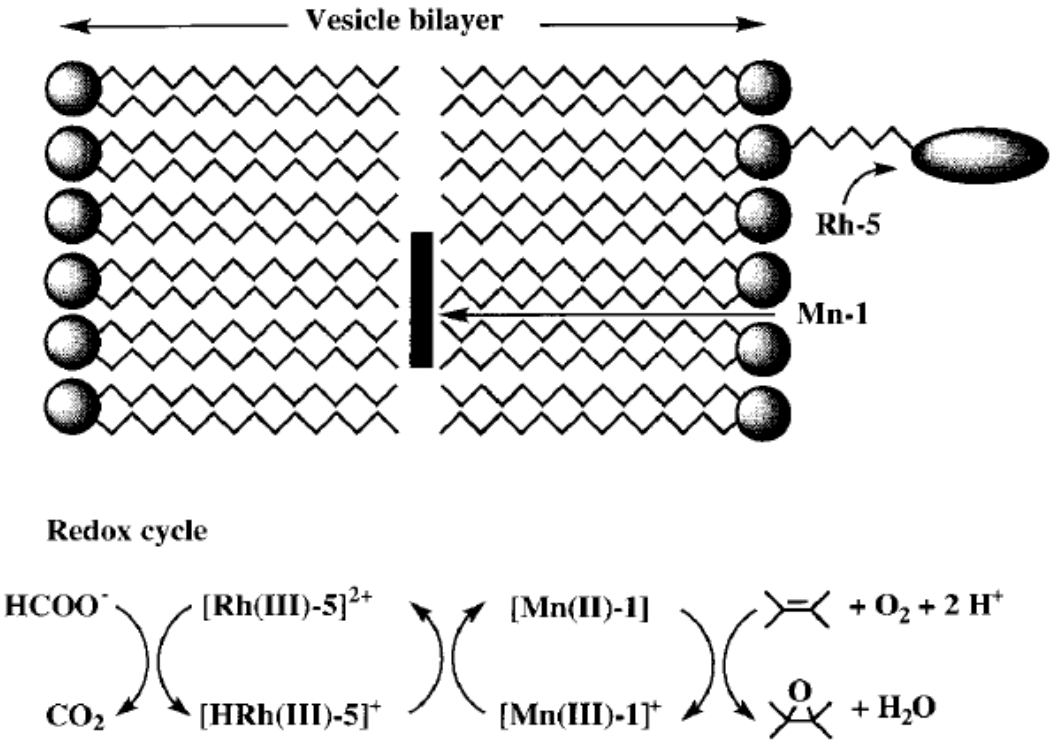


Schéma I.45 : Représentation schématique du système Rh/Porphyrine incorporé dans une vésicule.[237]

Ce système catalytique est composé d'une vésicule amphiphile synthétisée à partir de chlorure de diméthyldioctadécylammonium (DODAC) chargé positivement et de dihexadécylphosphate (DHP) chargé négativement. Une porphyrine de manganèse [Mn^{III}TDCPP] où TDCPP est le ligand *meso*-5,10,15,20-tetra(2,6-dichlorophénylporphyrine)), est incorporée dans la partie hydrophobe de cette vésicule et permet l'oxydation des substrats. Pour finir, un complexe de rhodium [$Rh^{III}(\eta^5$-Cp*)(bpy)Cl_2] où Cp* désigne le ligand pentaméthylcyclopentadiènyle et bpy le ligand 2.2'bipyridine, jouant le rôle d'une réductase en présence de formiate de sodium comme donneur sacrificiel d'électrons est attaché à la vésicule. Cette enzyme artificielle réalise l'époxydation du substrat α-pinène en une heure à 75°C dans l'eau sous une atmosphère de O_2 avec une conversion de 90 % (360 TON).

Les inconvénients majeurs pour ce système sont la nécessité de fabriquer la vésicule juste avant la réaction ainsi que la faible solubilité de celle-ci dans l'eau, nécessitant l'utilisation d'un co-

solvant tel que l'éthanol. Ce système est dix fois plus performant que le système décrit auparavant pour l'époxydation du substrat α-pinène (36 TON).[238]

Les trois systèmes décrits par Groves et Nolte sont très intéressants. Toutefois, ils sont assez contraignants en termes d'ingénierie. En effet, les vésicules sont compliquées à synthétiser, le rhodium est un métal noble, la synthèse des porphyrines est elle aussi compliquée surtout en termes de purification. De plus, la caractérisation de ces systèmes s'avère presque impossible.

Les études se sont ensuite beaucoup portées sur des systèmes plus faciles d'accès que sont les polyoxométallates. Ces systèmes sont le plus souvent hétérogènes, en suspension dans l'eau. Par exemple, le képlérate polyoxomolybdate $[(NH_4)_{42}[Mo^{VI}_{72}\ MoV_{60}O_{372}\text{-}(CH_3COO)_{30}(H_2O)_{72}]$, « $\{Mo_{132}\}$ Nanoball » réalise l'époxydation du cyclooctène dans l'eau à 25 °C, sous une atmosphère de O_2 avec une conversion maximale de 96 % en 2 heures et 100 % de sélectivité pour l'époxyde (480 TON). En présence de 100 000 équivalents de substrats, jusqu'à 57 000 TON (57 % de conversion) sont réalisés en 24 heures avec toujours 100 % de sélectivité pour l'époxyde. De tous les systèmes et conditions opératoires répertoriés dans la littérature, ce système est le meilleur pour l'époxydation du cyclooctène. Le POM utilisé est extrêmement robuste, et un des rares à pouvoir réagir à température ambiante. De nombreux autres alcènes sont aussi époxydés avec des conversions allant de 25 à 90 % (**schéma I.46**).[239]

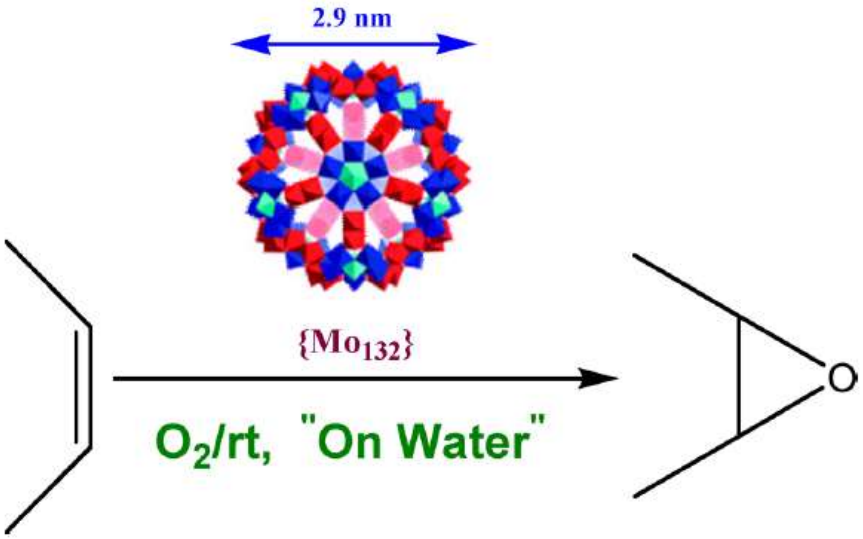


Schéma I.46 : Epoxydation aérobie d'oléfines catalysée par le complexe « $\{Mo_{132}\}$ Nanoball ».[239]

Une réaction beaucoup étudiée, est l'oxydation du méthane en méthanol car elle est un enjeu majeur du développement de la chimie bio-inspirée et éco-compatible. En effet, l'oxydation du méthane est l'oxydation de liaison C-H la plus difficile à réaliser, qui plus est à température ambiante. Une étude rapporte la combinaison d'un complexe de platine $[Pt(Mebipym)Cl_2]^+$ avec un polyoxométallate $[H_4PV_2Mo_{10}O_{40}]^-$ immobilisé sur silice, conduisant au système $[Pt(Mebipym)Cl_2]^+$ $[H_4PV_2Mo_{10}O_{40}]^-/SiO_2$ qui catalyse l'oxydation du méthane en méthanol, dans l'eau, en présence de HCl, sous 30 bars de méthane et deux bars de O_2 à 50°C dans un autoclave. Ce système, qui réalise 48 TON en 4 heures, est intéressant.[240] Néanmoins, la réaction témoin fonctionne déjà bien, 33 TON étant réalisés en absence de polyoxométallate, et, de plus, le travail à une telle pression nécessite

un matériel spécial. De nombreux autres polyoxométallates ont été étudiés pour l'oxydation du méthane, mais les conditions expérimentales sont beaucoup plus drastiques avec des températures souvent de l'ordre de 300°C ou plus.

Une autre réaction importante dans le développement d'une chimie éco-compatible est la dégradation de la cellulose. En effet, la cellulose, l'hémicellulose et la lignine sont des bio-ressources renouvelables très abondantes chez les plantes, et constituent une alternative possible au pétrole en tant que réserve de matière pour les bio-fuels. Pour cela, ces substances doivent être oxydées. Le premier exemple a été publié dans la revue Nature en 2001 par le groupe de Hill, et permet de minéraliser la lignine du bois pour produire de l'eau et du CO_2. Cette réaction se fait en deux étapes en présence du POM $[AlV^{V}W_{11}O_{40}]^{6-}$ (**Schéma I.47**).[241]

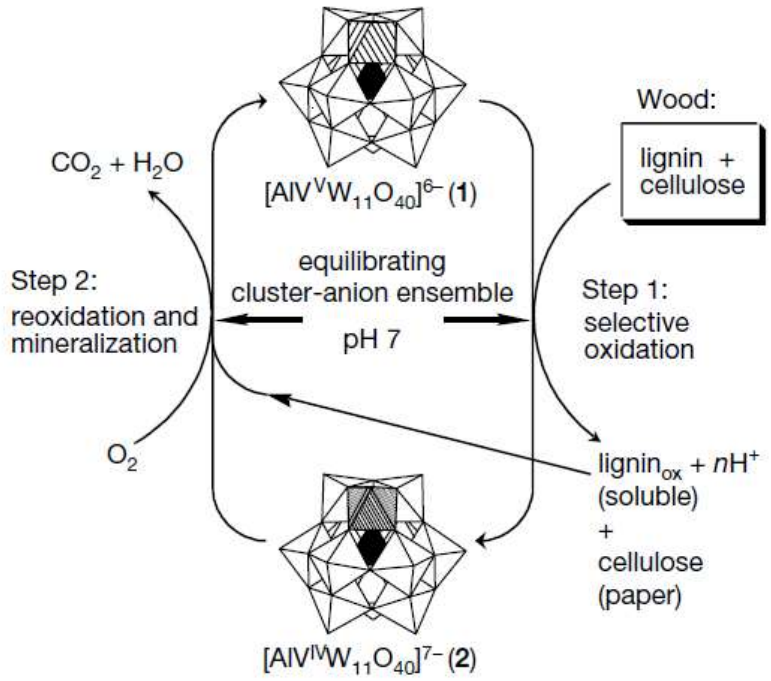


Schéma I.47 : Illustration de la réaction d'oxydation de la lignine (à droite) et de sa minéralisation une fois oxydée, en présence de O_2.[241]

La première étape est l'oxydation de la lignine solide à un électron, couplée avec la réduction du POM, dans l'eau à pH 7, sous argon à 130°C dans un réacteur avec une conversion de 75 % en 3 heures. La cellulose est alors retirée du milieu réactionnel, puis la lignine oxydée, maintenant soluble, est mise sous deux atmosphères de O_2. Le milieu réactionnel est chauffé à 210°C pendant 3 heures et la lignine oxydée est convertie en eau et dioxyde de carbone avec un rendement quantitatif.

En 2014, un polyoxométallate, $H_5PV_2Mo_{10}O_{40}$, a été utilisé pour oxyder la cellulose en glucose en conditions anaérobies dans l'acide sulfurique à 70°C pendant 5 heures, puis le glucose ainsi formé a été oxydé en acide formique, formaldéhyde et CO_2 dans un mélange méthanol/eau deuterée à 110°C sous deux bars de pression d'O_2, avec une conversion totale du substrat en 18 heures.[242]

Ces systèmes sont très intéressants, car ils mettent en lumière une réactivité nouvelle. En revanche, le deuxième système nécessite des conditions plutôt drastiques avec l'utilisation d'acide sulfurique. De plus, l'utilisation de ces deux POM est toujours soumise aux mêmes contraintes, que sont l'utilisation de températures réactionnelles élevées ainsi que la nécessité d'une activation préalable des POM à hautes températures (550°C) pendant des durées relativement longues (ici 12 heures) pour qu'ils puissent fonctionner.

Une revue plus exhaustive des résultats obtenus en catalyse supramoléculaire est disponible.[243] On peut ainsi y découvrir que d'autres systèmes, comme des complexes de palladium, réalisent des réactions d'oxydation d'alcènes avec, suivant l'additif, une sélectivité pour la dihydroxylation ou la coupure oxydante.[244] La catalyse de réactions d'oxydation en milieu hétérogène est également réalisée par d'autres matériaux de type Metal-Organic Frameworks (MOFs).[245,246,247] Des biocatalyseurs hybrides sont aussi utilisés dans l'eau avec le dioxygène de l'air comme oxydant.[248,249,250] À noter que de la biocatalyse est aussi développée, utilisant la réactivité de l'enzyme directement sur un substrat.[251,252,253,254] Toutefois, l'utilisation de ces deux concepts est compliquée, à cause de la protéine ou de l'enzyme présente dont les conditions de réactions sont plus contraignantes à optimiser.

Des systèmes utilisant l'eau comme source d'atome d'oxygène ont également été rapportés.[255,256,257] Enfin, plus récemment, des systèmes ont été développés, modélisant les cellules tels que des virus en forme de capsule,[258] des protéines cages et sont envisagés pour réaliser des réactions de catalyse.[259] Cependant dans ce dernier cas aucun exemple de réactions d'oxydation n'a encore été décrit.

Pour conclure, très peu de modèles existent permettant de réaliser des réactions de catalyse d'oxydation dans l'eau. Les systèmes décrits sont pour la plupart hétérogènes, avec plusieurs limitations à leur utilisation telles que leur préparation assez contraignante, dans certains cas la nécessité d'une pré-activation à forte température et enfin des conditions de mise en œuvre de la catalyse assez dures telles que des températures et pressions élevées. La découverte récente d'un nouveau type de mime d'architecture protéique soluble dans l'eau, les polymères fonctionnalisables de type polyéthylèneimine PEI, semble présenter une alternative prometteuse qui pourrait permettre de résoudre ces problèmes.

II-C-3) Les polyéthylèneimines (PEI) en tant que modèles d'architectures protéiques

D'une façon générale, les polymères existent avec une grande variété de compositions, de poids moléculaires, de dispersivités, de fonctionnalités et de formes. Aujourd'hui, ils peuvent être construits sur mesure à partir d'un grand choix de monomères, permettant la modulation de leurs propriétés. Cela en fait des composés intéressants pour de nombreuses applications, entre autres dans l'industrie.

Un polymère de type polyéthylèneimine (PEI) est un polymère hyperbranché de masse moléculaire moyenne de 25 kDa, qui présente une distribution amine primaire/amine secondaire/amine tertiaire en proportions 25:50:25 (en masse %) (**Schéma I.48).**[260,]

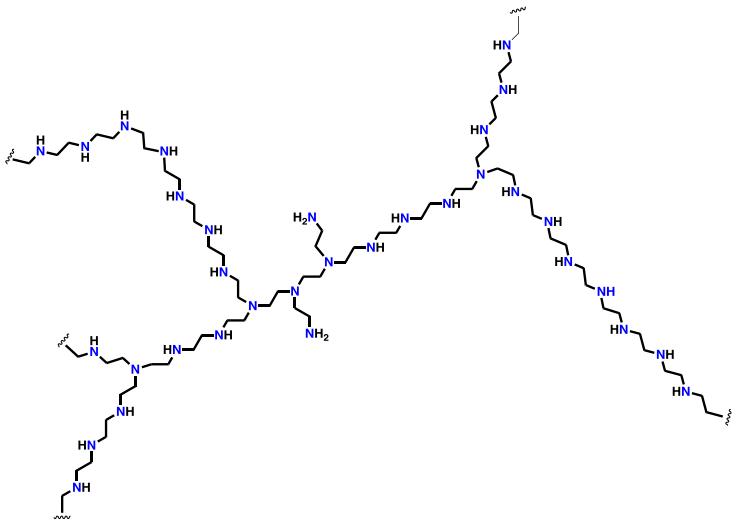


Schéma I.48 : Représentation schématique du PEI (les ratios entre les amines ne sont pas pris en compte).

Son utilisation pour mimer différentes activités enzymatiques en présence ou non d'un complexe métallique, jouant le rôle de catalyseur, a beaucoup été étudiée. En effet, un des avantages de ce polymère est qu'il est très facile d'y greffer différents groupements afin de permettre la création de poches hydrophobes ou toute autre fonctionnalité désirée.

Ainsi, il a été démontré que ce polymère, une fois fonctionnalisé, pouvait agir comme une enzyme artificielle[261] dans le cas de nombreuses réactions telles que l'hydrolyse d'esters,[262] la décarboxylation des acides oxalacétique[263] et nitrobenzyloxazolique,[264] l'élimination de Kemp,[265] la transamination[266,260] ainsi que pour l'hydrolyse de phosphates.[267,268,269] Toutes ces réactions sont accélérées de manière considérable en présence de PEI modifié (avec des k_{cat}/k_{uncat} de l'ordre de 10^3 à 10^8). Ce sont de très bons mimes d'enzymes avec des courbes de saturation de type Michaelis-Menten et une bonne réactivité dans l'eau. De plus, ces PEI ont aussi été utilisés pour des réactions d'oxydation catalytiques. Les polyéthylèneimines alkylés ont montré des propriétés communes aux enzymes en termes de catalyse acido-basique. Ils peuvent être chiraux, et permettre par exemple, en présence d'un complexe métallique de manganèse coordiné par un ligand salen, l'époxydation asymétrique d'alcènes dans l'eau, en présence d'un oxydant de type NaOCl, avec des ee moyens (4 à 40 %).[270] Ces PEI sont aussi utilisés achiraux avec des porphyrines, dans le chloroforme en présence de PhIO, pour l'époxydation du styrène avec des rendements de 73 à 97 % et jusqu'à 8 500 TON.[271] Un exemple intéressant d'oxydation utilisant un PEI méthylé a été développé en 2004 par le groupe de Neumann.[272] Ce système met en présence le PEI méthylé pouvant interagir de façon électrostatique avec un polyoxométallate, $Na_{12}[ZnWZn_2(H_2O)_2\ (ZnW_9O_{34})_2]$, pour conduire à l'enzyme synthétique («synzyme») correspondante Alk-PEI/POM (**Schéma I.49).**[272]

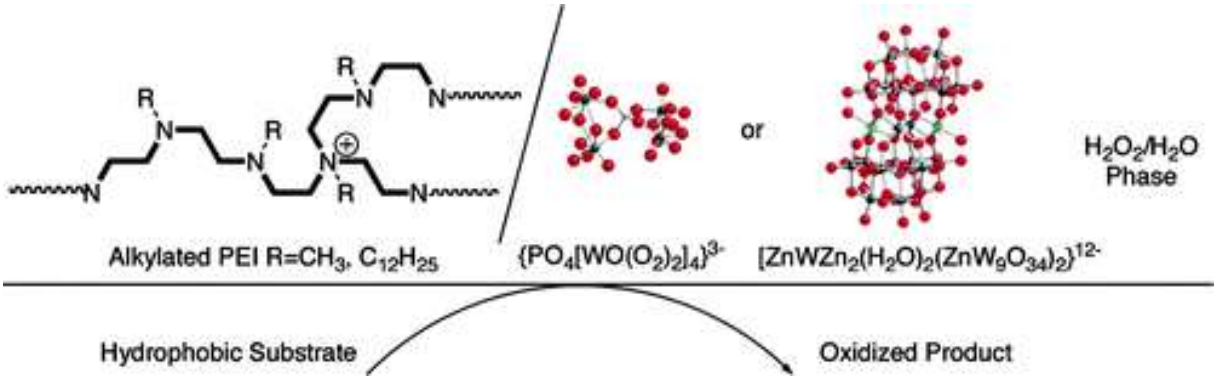


Schéma I.49 : Représentation schématique de la « synzyme » Alk-PEI/POM, ainsi que son activité.[272]

Cette « synzyme » possède une partie hydrophobe pour la solubilisation des substrats et un catalyseur actif permettant l'oxydation de sulfures et d'alcènes, dans l'eau, à température ambiante, en présence de H_2O_2. Les rendements sont proches de 100 % en 9 heures. Cette « synzyme » est 10 fois plus efficace que celle réalisée lorsqu'on utilise le PEI non alkylé.[272] Cette même « synzyme » peut être lipo-sélective, c'est-à-dire qu'elle est capable, si elle possède 12 groupements $(C_{16}H_{33})_4N$ greffés sur le polymère par exemple, d'oxyder le 2-tetradécanol (495 TON) dans l'eau à 60°C pendant 19 heures en présence d'un grand excès de H_2O_2. En revanche, si le groupement $(C_{16}H_{33})_4N$ est remplacé par le groupement $(C_4H_9)_4N$, l'activité catalytique n'est plus que de 45 TON.[273]

Ces différents exemples montrent bien la capacité de ce polymère à créer et maintenir une certaine architecture, ménageant en son sein, grâce à l'alkylation, des cavités hydrophobes, tout en maintenant sa solubilité dans l'eau. De plus, l'utilisation de ce PEI modifié permet souvent d'améliorer les conditions de catalyse (sélectivité, rendement, vitesse de réaction). Néanmoins, ce type de PEI n'a pas encore été utilisé en catalyse d'oxydation avec le dioxygène. Notre volonté est donc de réaliser une étude de catalyse d'oxydation bio-inspirée, en utilisant O_2 comme oxydant et le PEI en tant que mime de l'architecture protéique. Ceci grâce à un catalyseur dont le site actif pourrait être un ou plusieurs atome(s) de fer ou de cuivre coordinés par différents ligands et qui serait associé à un cofacteur redox pour lui procurer les électrons nécessaires à l'activation réductrice du dioxygène.

II-D) CONCLUSION

Depuis leur découverte, les enzymes n'ont cessé de fasciner les scientifiques et, au fil des décennies, un des buts de la chimie moderne a été de créer des molécules qui imitent leur site actif de façon à promouvoir une catalyse plus efficace et plus respectueuse de l'environnement. Néanmoins, il existe aujourd'hui relativement peu d'exemples de modèles d'enzymes qui effectuent des catalyses efficaces, dans des conditions dites biologiques (eau, pH 7, pression atmosphérique et température ambiante). En effet, comme nous l'avons montré dans les paragraphes précédents, de très nombreux systèmes inspirés des enzymes réalisent des réactions dans les solvants organiques avec des oxydants puissants. La bascule vers l'utilisation de H_2O_2, puis d'O_2, dans ces mêmes solvants s'est faite petit à petit, avec tout d'abord l'invention de nouveaux catalyseurs, conduisant à de faibles rendements en oxydation, puis au fur et à mesure des découvertes les rendements ont été améliorés, pour aboutir à des réactions d'oxydation en présence d'O_2, présentant une efficacité identique voire supérieure à celle permise par les oxydants chimiques ou H_2O_2.[239] Néanmoins, les réglementations actuelles et futures obligent les industries chimiques ainsi que les chercheurs à revoir leurs protocoles expérimentaux afin de réaliser une chimie plus respectueuse de l'environnement. Dans ce contexte, le développement de catalyseurs d'oxydation non polluants et efficaces dans l'eau semble être une solution prometteuse. En premier lieu, de tels systèmes ont été développés avec H_2O_2 et sont majoritairement supramoléculaires et/ou hétérogènes ou encore des biocatalyseurs hybrides.[206,211,212,219,22] Néanmoins, même s'il reste une bonne alternative aux oxydants puissants, H_2O_2 n'est pas viable en termes de transposition de systèmes catalytiques à l'industrie, car il est trop onéreux. Il faut donc trouver un nouvel oxydant, largement disponible et peu onéreux, ce qui est le cas du dioxygène de l'air. Des systèmes catalytiques utilisant le dioxygène de l'air comme oxydant ont été développés, mais restent peu utilisés à cause de la difficulté de leur mise en œuvre.[232,235,237] Beaucoup de systèmes immobilisés sur silice ou sur surfaces d'or, ainsi que beaucoup de polyoxométallates (POMs) et quelques MOFs (Metal-Organic Frameworks), ont été étudiés. [239,240,243,245] Des limitations majeures à l'utilisation de ces systèmes sont apparues, telles que la complexité de leur synthèse et les conditions réactionnelles mises en œuvre qui sont souvent drastiques, nécessitant des températures et pressions élevées. De plus, il est souvent nécessaire de les pré-activer pour les rendre fonctionnels. Les systèmes les plus efficaces de chacune des parties ainsi que les systèmes les plus éco-compatibles sont regroupés dans la **Tableau I.1**.

Tableau I.1 : Systèmes catalytiques les plus efficaces présentés dans les différentes parties de cette introduction, ainsi que les conditions réactionnelles, les rendements et les substrats.

Solvant	Oxydant	Catalyseur	Substrat	Produit d'oxydation	Conditions réactionnelles	Rendement ou conversion (%)	TON
CH_2Cl_2	PhIO	Carré moléculaire de porphyrine[129]	Styrène	Epoxyde (92 %)	42h, t.a	4%	21 000
CH_2Cl_2	H_2O_2	Porphyrine de Mn portant une chaine flexible[97,98]	Cyclooctène	Epoxyde (100 %)	36 minutes, 0°C	100%	1 000
$C_2H_4Cl_2$/MeCN	O_2	$[\gamma(1,2)\text{-}SiW_{10}\{Fe(OH_2)\}_2O_{38}]^{6-}$ [189]	Cyclooctène	Epoxyde (S) 98 % ee	400h, 60°C, 1 Atm O_2	86%	10 000
MeCN	O_2	$[Cu^ICu^ICu^I(7\text{-N-Etppz})]^{1+}$ [161]	Méthane	Méthanol	10 minutes, t.a	5%	1
ø	O_2	$Ru(OH)/ZrO_2$ [139]	Alcools	Aldéhydes (100%)	100°C, 13 jours	100%	63 000
eau	H_2O_2	$[FePct\ Bu_4]_2$ [198,199]	Méthane	Acide formique et formaldéhyde	20h, 60°C, 32 bars méthane	50%	437
eau	H_2O_2	Fe(III) salan [197]	Thioanisole	Sulfoxyde (S) 95 % ee	3h, 20°C	90%	8 000
eau	O_2	[Rh]/[Mn] Nolte [233]	α-pinène	Epoxyde	1h, 75°C, 1 Atm O_2	90%	360
eau	O_2	$[(NH_4)_{42}[Mo^{VI}_{72}\ Mo^{V}_{60}\ O_{372}(CH_3COO)_{30}(H_2O)_{72}]$ [235]	Cyclooctène	Epoxyde	24h, 25°C, 1 Atm O_2	57%	57 000

Actuellement le système alliant le mieux une catalyse d'oxydation efficace et une certaine éco-compatibilité est le système $[(NH_4)_{42}[Mo^{VI}_{72}\ Mo^{V}_{60}O_{372}(CH_3COO)_{30}(H_2O)_{72}]$ car il fonctionne dans l'eau à des conditions douces de température et de pression, sans activation préalables, et avec O_2 comme oxydant.[239]

L'utilisation de la biocatalyse ou de biocatalyseur hybride pourrait être une voie alternative, mais la stabilité et l'expression des enzymes ou protéines en font des candidats assez difficiles à utiliser, d'autant plus qu'elles présentent généralement une faible versatilité de substrats. [248,253,254] Il faudrait donc utiliser des complexes à base de fer ou de cuivre, qui sont des métaux abondants et peu toxiques. Toutefois, ceux-ci réagissent difficilement avec O_2 et n'ont pas encore montré d'activité dans l'eau. Par ailleurs, ces complexes ont besoin d'un apport constant d'électrons pour réaliser des cycles catalytiques. Le problème majeur rencontré dans ces systèmes est de faire cohabiter un agent réducteur et un complexe oxydant. Ceci est problématique puisque l'agent réducteur peut entrer en compétition avec le substrat, et réduire l'espèce oxydante formée.[145]

Finalement, l'idée serait de réaliser un catalyseur d'oxydation supramoléculaire robuste, efficace dans des conditions douces de pression et de température et activant O_2 en présence d'un donneur d'électrons dans l'eau. Une stratégie intéressante serait de mimer la compartimentalisation et le confinement des composants cellulaires. En effet, cette compartimentalisation permet aux cellules de contrôler de manière séquentielle les réactions biochimiques et ainsi de maximiser leur précision et leur efficacité. Pour atteindre cet objectif, les dérivés de PEI peuvent être des candidats de choix pour la synthèse de nouveaux catalyseurs d'oxydation bio-inspirés au regard de ce qu'a rapporté la littérature pour les « synzymes » en termes de comportement et d'architecture (parties hydrophiles et hydrophobes).[261,273]

Références

(1) Hayaishi, O.; Katagiri, M.; Rothberg, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77* (20), 5450.
(2) Mason, H. S.; Fowlks, W. L.; Peterson, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77* (10), 2914.
(3) Guengerich, F. P. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (24), 17063.
(4) Porter, T. D.; Coon, M. J. *J. Biol. Chem.* **1991**, *481* (21), 13469.
(5) Kubota, M.; Sogawa, K.; Kaizu, Y.; Sawaya, T.; Watanabe, J.; Kawajiri, K.; Gotoh, O.; Fujii-Kuriyama, Y. *J. Biochem. (Tokyo)* **1991**, *110* (2), 232.
(6) Poulos, T. L. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (7), 3919.
(7) Munro, A. W.; Leys, D. G.; McLean, K. J.; Marshall, K. R.; Ost, T. W.; Daff, S.; Miles, C. S.; Chapman, S. K.; Lysek, D. A.; Moser, C. C.; Page, C. C.; Dutton, L. P. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27* (5), 250.
(8) Poulos, T. L.; Finzel, B. C.; Howard, A. J. *J. Mol. Biol.* **1987**, *195*, 687.
(9) Dmochowski, I. J.; Crane, B. R.; Wilker, J. J.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (23), 12987.
(10) Nahri, L. O.; Fulco, A. J. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261* (16), 7160.
(11) Schlichting, I.; Berendzen, J.; Chu, K.; Stock, A. M.; Maves, S. A.; Benson, D. E.; Sweet, R. M.; Ringe, D.; Petsko, G. A.; Sligar, S. G. *Science* **2000**, *287* (5458), 1615.
(12) Rittle, J.; Green, M. T. *Science* **2010**, *330* (6006), 933.
(13) Sligar, S. G. *Biochemistry* **1976**, *15* (24), 5399.
(14) Sligar, S. G.; Gunsalus, I. C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1976**, *73* (4), 1078.
(15) Meunier, B.; de Visser, S. P.; Shaik, S. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (9), 3947.
(16) Groves, J. T.; McClusky, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98* (3), 859.
(17) Groves, J. T. *J. Chem. Educ.* **1985**, *62* (11), 928.
(18) Ortiz de Montellano, P. R. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (2), 932.
(19) Fenton, H. J. H. *J. Chem. Soc. Trans.* **1894**, *65*, 899.
(20) Walling, C. *Acc. Chem. Res.* **1975**, *8* (4), 125.
(21) Walling, C. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31* (4), 155.
(22) Mahy, J.-P.; Maréchal, J.-D.; Ricoux, R. *Chem Commun* **2015**, *51* (13), 2476.
(23) Roitberg, A. E.; Holden, M. J.; Mayhew, M. P.; Kurnikov, I. V.; Beratan, D. N.; Vilker, V. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (35), 8927.
(24) Sevrioukova, I. F.; Li, H.; Zhang, H.; Peterson, J. A.; Poulos, T. L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (5), 1863.
(25) Im, S.-C.; Waskell, L. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *507* (1), 144.
(26) Roberts, G. A.; Celik, A.; Hunter, D. J. B.; Ost, T. W. B.; White, J. H.; Chapman, S. K.; Turner, N. J.; Flitsch, S. L. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (49), 48914.
(27) Wang, M.; Roberts, D. L.; Paschke, R.; Shea, T. M.; Masters, B. S. S.; Kim, J.-J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94* (16), 8411.
(28) Foster, J. W.; Davis, R. H. *J Bacteriol* **1966**, *91* (5), 1924.
(29) Takeguchi, M.; Miyakawa, K.; Okura, I. *Biometals* **1998**, *11* (3), 229.
(30) Nguyen, H. H.; Shiemke, A. K.; Jacobs, S. J.; Hales, B. J.; Lidstrom, M. E.; Chan, S. I. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (21), 14995.
(31) Merkx, M.; Kopp, D. A.; Sazinsky, M. H.; Blazyk, J. L.; Müller, J.; Lippard, S. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (15), 2782.
(32) Rosenzweig, A. C.; Frederick, C. A.; Lippard, S. J.; Nordlund, P. *Nature* **1993**, *366* (6455), 537.
(33) Banerjee, R.; Meier, K. K.; Münck, E.; Lipscomb, J. D. *Biochemistry* **2013**, *52* (25), 4331.
(34) Tinberg, C. E.; Lippard, S. J. *Biochemistry* **2009**, *48* (51), 12145.

(35) Banerjee, R.; Proshlyakov, Y.; Lipscomb, J. D.; Proshlyakov, D. A. *Nature* **2015**, *518* (7539), 431.
(36) Lund, J.; Woodland, M. P.; Dalton, H. *Eur J Biochem* **1985**, *147* (2), 297.
(37) Gassner, G. T.; Lippard, S. J. *Biochemistry* **1999**, *38* (39), 12768.
(38) Page, C. C.; Moser, C. C.; Chen, X.; Dutton, L. P. *Nature* **1999**, *402* (6757), 47.
(39) Walters, K. J.; Gassner, G. T.; Lippard, S. J.; Wagner, G. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (14), 7877.
(40) Liu, K. E.; Valentine, A. M.; Wang, D.; Huynh, B. H.; Edmondson, D. E.; Salifoglou, A.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (41), 10174.
(41) Wang, W.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (6), 2244.
(42) Wang, W.; Iacob, R. E.; Luoh, R. P.; Engen, J. R.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (27), 9754.
(43) Lee, S. J.; McCormick, M. S.; Lippard, S. J.; Cho, U.-S. *Nature* **2013**, *494* (7437), 380.
(44) Bollinger Jr, J. M. *Nature* **2010**, *465* (7294), 40.
(45) Lieberman, R. L.; Rosenzweig, A. C. *Nature* **2005**, *434* (7030), 177.
(46) Lieberman, R. L.; Kondapalli, K. C.; Shrestha, D. B.; Hakemian, A. S.; Smith, S. M.; Telser, J.; Kuzelka, J.; Gupta, R.; Borovik, A. S.; Lippard, S. J.; Hoffman, B. M.; Rosenzweig, A. C.; Stemmler, T. L. *Inorg. Chem.* **2006**, *45* (20), 8372.
(47) Balasubramanian, R.; Smith, S. M.; Rawat, S.; Yatsunyk, L. A.; Stemmler, T. L.; Rosenzweig, A. C. *Nature* **2010**, *465* (7294), 115.
(48) Martinho, M.; Choi, D. W.; Di Spirito, A. A.; Antholine, W. E.; Semrau, J. D.; Münck, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (51), 15783.
(49) Chan, S. I.; Yu, S. S.-F. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (8), 969.
(50) Sirajuddin, S.; Rosenzweig, A. C. *Biochemistry* **2015**, *54* (14), 2283.
(51) Citek, C.; Gary, J. B.; Wasinger, E. C.; Stack, T. D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (22), 6991.
(52) Newman, L. M.; Wackett, L. P. *Biochemistry (Mosc.)* **1995**, *34* (43), 14066.
(53) Solomon, E. I.; Brunold, T. C.; Davis, M. I.; Kemsley, J. N.; Lee, S.-K.; Lehnert, N.; Neese, F.; Skulan, A. J.; Yang, Y.-S.; Zhou, J. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (1), 235.
(54) Sjöberg, B.-M. *Structure* **1994**, *2* (9), 793.
(55) Uhlin, U.; Eklund, H. *Nature* **1994**, *370* (6490), 533.
(56) Solomon, E. I.; Heppner, D. E.; Johnston, E. M.; Ginsbach, J. W.; Cirera, J.; Qayyum, M.; Kieber-Emmons, M. T.; Kjaergaard, C. H.; Hadt, R. G.; Tian, L. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (7), 3659.
(57) Jones, S. M.; Solomon, E. I. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72* (5), 869.
(58) Heppner, D. E.; Kjaergaard, C. H.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (51), 17788.
(59) Que, L.; Ho, R. Y. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (7), 2607.
(60) Valegard, K.; Terwisscha van Scheltinga, A. C.; Lloyd, M. D.; Hara, T.; Ramaswamy, S.; Perrakis, A.; Thompson, A.; Lee, H.-J.; Baldwin, J. E.; Schofield, C. J.; Hajdu, J.; Andersson, I. *Nature* **1998**, *394* (6695), 805.
(61) Burzlaff, N. I. *Nature* **1999**, *401* (6754), 721.
(62) Roach, P. L.; Clifton, I. J.; Hensgens, C. M.; Shibata, N.; Schofield, C. J.; Hajdu, J.; Baldwin, J. E. *Nature* **1997**, *387* (6635), 827.
(63) Que, L. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7* (3), 182.
(64) Hegg, E. L.; Que, L. *FEBS J.* **1997**, *250* (3), 625.
(65) Koehntop, K. D.; Emerson, J. P.; Que, L. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10* (2), 87.
(66) Bugg, T. D. H.; Lin, G. *Chem. Commun.* **2001**, 941.
(67) Siegbahn, P. E. M.; Haeffner, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (29), 8919.
(68) Vaillancourt, F. H.; Bolin, J. T.; Eltis, L. D. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2006**, *41* (4), 241.
(69) Kovaleva , E.; Lipscomb, J. *Science* **2007**, *316* (5823), 453.

(70) Fielding, A. J.; Lipscomb, J. D.; Que, L. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2014**, *19* (4-5), 491.
(71) Brash, A. R. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (34), 23679.
(72) Kauppi, B.; Lee, K.; Carredano, E.; Parales, R. E.; Gibson, D. T.; Eklund, H.; Ramaswamy, S. *Structure* **1998**, *6* (5), 571.
(73) Barry, S. M.; Challis, G. L. *ACS Catal.* **2013**, *3* (10), 2362.
(74) Neibergall, M. B.; Stubna, A.; Mekmouche, Y.; Münck, E.; Lipscomb, J. D. *Biochemistry* **2007**, *46* (27), 8004.
(75) Karlsson, A.; Parales, J. V.; Parales, R. E.; Gibson, D. T.; Eklund, H.; Ramaswamy, S. *Science* **2003**, *299* (5609), 1039.
(76) Purpero, V.; Moran, G. R. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12* (5), 587.
(77) Hausinger, R. P. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *39* (1), 21.
(78) Clifton, I. J.; McDonough, M. A.; Ehrismann, D.; Kershaw, N. J.; Granatino, N.; Schofield, C. J. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100* (4), 644.
(79) Price, J. C.; Barr, E. W.; Glass, T. E.; Krebs, C.; Bollinger, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (43), 13008.
(80) Krebs, C.; Galonic Fujimori, D.; Walsh, C. T.; Bollinger Jr, J. M. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40* (7), 484.
(81) Eser, B. E.; Barr, E. W.; Frantom, P. A.; Saleh, L.; Bollinger, J. M.; Krebs, C.; Fitzpatrick, P. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (37), 11334.
(82) Chow, M. S.; Eser, B. E.; Wilson, S. A.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Fitzpatrick, P. F.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (22), 7685.
(83) Kappock, T. J.; Caradonna, J. P. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (7), 2659.
(84) Brown, C. D.; Neidig, M. L.; Neibergall, M. B.; Lipscomb, J. D.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (23), 7427.
(85) Higgins, L. J.; Yan, F.; Liu, P.; Liu, H.; Drennan, C. L. *Nature* **2005**, *437* (7060), 838.
(86) Yan, F.; Munos, J. W.; Liu, P.; Liu, H. *Biochemistry* **2006**, *45* (38), 11473.
(87) Chang, W.; Dey, M.; Liu, P.; Mansoorabadi, S. O.; Moon, S.-J.; Zhao, Z. K.; Drennan, C. L.; Liu, H. *Nature* **2013**, *496* (7443), 114.
(88) Urich, T.; Gomes, C. M.; Kletzin, A.; Frazao, C. *Science* **2006**, *311* (5763), 996.
(89) Hemsworth, G. R.; Taylor, E. J.; Kim, R. Q.; Gregory, R. C.; Lewis, S. J.; Turkenburg, J. P.; Parkin, A.; Davies, G. J.; Walton, P. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (16), 6069.
(90) Beeson, W. T.; Phillips, C. M.; Cate, J. H. D.; Marletta, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (2), 890.
(91) Kjaergaard, C. H.; Qayyum, M. F.; Wong, S. D.; Xu, F.; Hemsworth, G. R.; Walton, D. J.; Young, N. A.; Davies, G. J.; Walton, P. H.; Johansen, K. S.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Solomon, E. I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (24), 8797.
(92) Que, L.; Tolman, W. B. *Nature* **2008**, *455* (7211), 333.
(93) Roduner, E.; Kaim, W.; Sarkar, B.; Urlacher, V. B.; Pleiss, J.; Gläser, R.; Einicke, W.-D.; Sprenger, G. A.; Beifuß, U.; Klemm, E.; Liebner, C.; Hieronymus, H.; Hsu, S.-F.; Plietker, B.; Laschat, S. *ChemCatChem* **2013**, *5* (1), 82.
(94) Allen, S. E.; Walvoord, R. R.; Padilla-Salinas, R.; Kozlowski, M. C. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (8), 6234.
(95) Meunier, B. *Chem. Rev.* **1992**, *92* (6), 1411.
(96) Groves, J. T.; Nemo, T. E.; Myers, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101* (4), 1032.
(97) Banfi, S.; Legramandi, F.; Montanari, F.; Pozzi, G.; Quici, S. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 1285.
(98) Anelli, P. L.; Banfi, S.; Legramandi, F.; Montanari, F.; Pozzi, G.; Quici, S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 1345.

(99) Costas, M. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255* (23-24), 2912.
(100) Sorokin, A. B. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (10), 8152.
(101) Wang, S. H.; Mandimutsira, B. S.; Todd, R.; Ramdhanie, B.; Fox, J. P.; Goldberg, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (1), 18.
(102) Dong, Y.; Ménage, S.; Brennan, B. A.; Elgren, T. E.; Jang, H. G.; Pearce, L. L.; Que Jr, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (5), 1851.
(103) Avenier, F.; Dubois, L.; Dubourdeaux, P.; Latour, J.-M. *Chem. Commun.* **2005**, 480.
(104) Avenier, F.; Dubois, L.; Latour, J.-M. *New J Chem* **2004**, *28* (7), 782.
(105) Mekmouche, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (5), 949.
(106) Dongwhan, L.; Lippard, S. J. *Inorg. Chem.* **2002**, *41* (4), 827.
(107) Costas, M.; Rohde, J.-U.; Stubna, A.; Ho, R. Y.; Quaroni, L.; Münck, E.; Que, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (51), 12931.
(108) Kodera, M.; Itoh, M.; Kano, K.; Funabiki, T.; Reglier, M. *Angew. Chem.* **2005**, *117* (43), 7266.
(109) Kodera, M.; Kawahara, Y.; Hitomi, Y.; Nomura, T.; Ogura, T.; Kobayashi, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (32), 13236.
(110) Trehoux, A.; Roux, Y.; Guillot, R.; Mahy, J.-P.; Avenier, F. *J. Mol. Catal. Chem.* **2015**, *396*, 40.
(111) Martens, C. F.; Gebbink, R. J. M. K.; Feiters, M. C.; Nolte, R. J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (13), 5667.
(112) Sutradhar, M.; Martins, L. M. D. R. S.; Guedes da Silva, M. F. C.; Mahmudov, K. T.; Liu, C.-M.; Pombeiro, A. J. L. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, *2015* (23), 3959.
(113) Brinksma, J.; Feringa, B. L.; Hage, R.; Kerschner, J. *Chem. Commun.* **2000**, 537.
(114) de Boer, J. W.; Brinksma, J.; Browne, W. R.; Meetsma, A.; Alsters, P. L.; Hage, R.; Feringa, B. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (22), 7990.
(115) Friedle, S.; Reisner, E.; Lippard, S. J. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (8), 2768.
(116) White, M. C.; Doyle, A. G.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (29), 7194.
(117) Oldenburg, P.; Que, L. *Catal. Today* **2006**, *117* (1-3), 15.
(118) Chen, K.; Que, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38* (15), 2227.
(119) Costas, M.; Tipton, A. K.; Chen, K.; Jo, D.-H.; Que, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (27), 6722.
(120) Srour, H.; Le Maux, P.; Chevance, S.; Simonneaux, G. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257* (21-22), 3030.
(121) Legros, J.; Bolm, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (32), 4225.
(122) De Faveri, G.; Ilyashenko, G.; Watkinson, M. *Chem Soc Rev* **2011**, *40* (3), 1722.
(123) White, M. C. *Science* **2012**, *335* (6070), 807.
(124) Hitomi, Y.; Arakawa, K.; Funabiki, T.; Kodera, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (14), 3448.
(125) Bryliakov, K. P.; Talsi, E. P. *Coord. Chem. Rev.* **2014**, *276*, 73.
(126) Tse, M. K.; Döbler, C.; Bhor, S.; Klawonn, M.; Mägerlein, W.; Hugl, H.; Beller, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (39), 5255.
(127) Venkataramanan, N. S.; Kuppuraj, G.; Rajagopal, S. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249* (11-12), 1249.
(128) Bhyrappa, P.; Moore, J. S.; Suslick, K. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (24), 5708.
(129) Merlau, M. L.; et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (22), 4239.
(130) Vasylyev, M. V.; Neumann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (3), 884.
(131) Deutman, A. B.; Monnereau, C.; Elemans, J. A.; Ercolani, G.; Nolte, R. J.; Rowan, A. E. *Science* **2008**, *322* (5908), 1668.
(132) Thordarson, P.; Bijsterveld, E. J.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. *Nature* **2003**, *424* (6951), 915.
(133) Vinogradov, M. M.; Kozlov, Y. N.; Bilyachenko, A. N.; Nesterov, D. S.; Shul'pina, L. S.; Zubavichus, Y. V.; Pombeiro, A. J. L.; Levitsky, M. M.; Yalymov, A. I.; Shul'pin, G. B. *New J Chem* **2015**, *39* (1), 187.

(134) Wu, P.; Tatsumi, T. *Chem. Commun.* **2001**, No. 10, 897.
(135) Ueno, S.; Yoshida, K.; Ebitani, K.; Kaneda, K. *Chem Commun* **1998**, 295.
(136) Qi, W.; Wang, Y.; Li, W.; Wu, L. *Chem. - Eur. J.* **2010**, *16* (3), 1068.
(137) Nisar, A.; Lu, Y.; Zhuang, J.; Wang, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (14), 3187.
(138) Bleloch, A.; Johnson, B. F. G.; Ley, S. V.; Price, A. J.; Shephard, D. S.; Thomas, A. W. *Chem Commun* **1999**, 1907.
(139) Kim, Y.-H.; Hwang, S.-K.; Kim, J. W.; Lee, Y.-S. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2014**, *53* (31), 12548.
(140) *http://www.societechimiquedefrance.fr.*
(141) Mallat Tamas; Baiker, A. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (6), 3037.
(142) Behrens, M.; Zander, S.; Kurr, P.; Jacobsen, N.; Senker, J.; Koch, G.; Ressler, T.; Fischer, R. W.; Schlögl, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (16), 6061.
(143) Pistorio, B. J.; Chang, C. J.; Nocera, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (27), 7884.
(144) Groves, J. T.; Watanabe, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (25), 8443.
(145) Tabushi, I.; Koga, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101* (21), 6456.
(146) Tabushi, I.; Yazaki, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (24), 7371.
(147) Mansuy, D.; Fontecave, M.; Bartoli, J.-F. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 253.
(148) Battioni, P.; Bartoli, J. F.; Leduc, P.; Fontecave, M.; Mansuy, D. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 791.
(149) Barton, D. H.; Boivin, J.; Gastiger, M.; Morzycki, J.; Hay-Motherwell, R. S.; Motherwell, W. B.; Ozbalik, N.; Schwartzentruber, K. M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1986**, 947.
(150) Pistorio, B. J.; Chang, C. J.; Nocera, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (27), 7884.
(151) Rosenthal, J.; Luckett, T. D.; Hodgkiss, J. M.; Nocera, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (20), 6546.
(152) Neu, H. M.; et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (14), 4614.
(153) Ryland, B. L.; Stahl, S. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (34), 8824.
(154) Fukuzumi, S.; Karlin, K. D. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257* (1), 187.
(155) Kim, S.; Lee, J. Y.; Cowley, R. E.; Ginsbach, J. W.; Siegler, M. A.; Solomon, E. I.; Karlin, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (8), 2796.
(156) Réglier, M.; Jorand, C.; Waegell, B. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1752.
(157) Ording-Wenker, E. C. M.; Siegler, M. A.; Lutz, M.; Bouwman, E. *Dalton Trans* **2015**, *44* (27), 12196.
(158) Rolff, M.; Schottenheim, J.; Peters, G.; Tuczek, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (36), 6438.
(159) Itoh, S. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48* (7), 2066.
(160) Wang, Y.; DuBois, J. L.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Stack, T. D. P. *Science* **1998**, *279* (5350), 537.
(161) Chen, P. P.-Y.; Yang, R. B.-G.; Lee, J. C.-M.; Chan, S. I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (37), 14570.
(162) Chan, S. I.; Lu, Y.-J.; Nagababu, P.; Maji, S.; Hung, M.-C.; Lee, M. M.; Hsu, I.-J.; Minh, P. D.; Lai, J. C.-H.; Ng, K. Y.; Ramalingam, S.; Yu, S. S.-F.; Chan, M. K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (13), 3731.
(163) Iali, W.; Lanoe, P.-H.; Torelli, S.; Jouvenot, D.; Loiseau, F.; Lebrun, C.; Hamelin, O.; Ménage, S. *Angew. Chem.* **2015**, *127* (29), 8535.
(164) Kaizer, J.; Csonka, R.; Speier, G.; Giorgi, M.; Réglier, M. *J. Mol. Catal. Chem.* **2005**, *235* (1-2), 81.
(165) Wane, A.; Thallaj, N. K.; Mandon, D. *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15* (40), 10593.
(166) Martinho, M.; Blain, G.; Banse, F. *Dalton Trans* **2010**, *39* (6), 1630.
(167) Ségaud, N.; Anxolabéhère-Mallart, E.; Sénéchal-David, K.; Acosta-Rueda, L.; Robert, M.; Banse, F. *Chem Sci* **2015**, *6* (1), 639.

(168) MacBeth, C. E.; Gotombek, A. P.; Young Jr, V. C.; Yang, C.; Kuczera, K.; Hendrich, M. P.; Borovik, A. S. *Science* **2000**, *289*, 938.
(169) Hong, S.; Lee, Y.-M.; Shin, W.; Fukuzumi, S.; Nam, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (39), 13910.
(170) Ghosh, A.; Tiago de Oliveira, F.; Yano, T.; Nishioka, T.; Beach, E. S.; Kinoshita, I.; Münck, E.; Ryabov, A. D.; Horwitz, C. P.; Collins, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (8), 2505.
(171) Thallaj, N. K.; Rotthaus, O.; Benhamou, L.; Humbert, N.; Elhabiri, M.; Lachkar, M.; Welter, R.; Albrecht-Gary, A.-M.; Mandon, D. *Chem. - Eur. J.* **2008**, *14* (22), 6742.
(172) Friedle, S.; Reisner, E.; Lippard, S. J. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (8), 2768.
(173) Lee, D.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (19), 4611.
(174) Carson, E. C.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (11), 3412.
(175) Yamashita, M.; Furutachi, H.; Tosha, T.; Fujinami, S.; Saito, W.; Maeda, Y.; Takahashi, K.; Tanaka, K.; Kitagawa, T.; Suzuki, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (1), 2.
(176) Kitajima, N.; Ito, M.; Fukui, H.; Moro-oka, Y. *J Chem Soc Chem Commun* **1991**, 102.
(177) Jaafar, H.; Vileno, B.; Thibon, A.; Mandon, D. *Dalton Trans* **2011**, *40* (1), 92.
(178) Martell, A.; Motekaitis, R. J. *Chem. Commun.* **1998**, 1523.
(179) Avenier, F.; Herrero, C.; Leibl, W.; Desbois, A.; Guillot, R.; Mahy, J.-P.; Aukauloo, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (13), 3634.
(180) Kim, S. O.; Sastri, C. V.; Seo, M. S.; Kim, J.; Nam, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (12), 4178.
(181) Jastrzebski, R.; van den Berg, E. J.; Weckhuysen, B. M.; Bruijnincx, P. C. A. *Catal Sci Technol* **2015**, *5* (4), 2103.
(182) Gonzalez-de-Castro, A.; Xiao, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (25), 8206.
(183) Gonzalez-de-Castro, A.; Robertson, C. M.; Xiao, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (23), 8350.
(184) Scheuermann, M. L.; Goldberg, K. I. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20* (45), 14556.
(185) Neumann, R. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (8), 3594.
(186) Jiang, D.-L.; Aida, T. *Chem Commun* **1996**, 1523.
(187) Zhao, M.; Helms, B.; Slonkina, E.; Friedle, S.; Lee, D.; DuBois, J.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Fréchet, J. M. J.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (13), 4352.
(188) Neumann, R.; Khenkin, A. M.; Dahan, M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34* (15), 1587.
(189) Neumann, R.; Dahan, M. *Nature* **1997**, *388* (6640), 353.
(190) Nishiyama, Y.; Nakagawa, Y.; Mizuno, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (19), 3639.
(191) Khenkin, A. M.; Weiner, L.; Wang, Y.; Neumann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (35), 8531.
(192) Khenkin, A. M.; Weiner, L.; Neumann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (28), 9988.
(193) Haimov, A.; Neumann, R. *Chem. Commun.* **2002**, 876.
(194) Rhule, J. T.; Neiwert, W. A.; Hardcastle, K. I.; Do, B. T.; Hill, C. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (48), 12101.
(195) Rubinstein, A.; Carmeli, R.; Neumann, R. *Chem Commun* **2014**, *50* (87), 13247.
(196) Yuan, Q.; Deng, W.; Zhang, Q.; Wang, Y. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349* (7), 1199.
(197) Bernadou, J.; Fabiano, A.-S.; Robert, A.; Meunier, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (20), 9375.
(198) Egami, H.; Katsuki, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (29), 8940.
(199) Sorokin, A. B.; Kudrik, E. V.; Alvarez, L. X.; Afanasiev, P.; Millet, J. M. M.; Bouchu, D. *Catal. Today* **2010**, *157* (1-4), 149.
(200) Sorokin, A. B.; Kudrik, E. V.; Bouchu, D. *Chem. Commun.* **2008**, 2562.
(201) Kao, L. C.; Hutson, A. C.; Sen, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (2), 700.
(202) Rebilly, J.-N.; Colasson, B.; Bistri, O.; Over, D.; Reinaud, O. *Chem Soc Rev* **2015**, *44* (2), 467.
(203) Dong, Z.; Luo, Q.; Liu, J. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (23), 7890.
(204) Breslow, R.; Zhang, X.; Huang, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (19), 4535.
(205) Breslow, R.; Huang, Y.; Zhang, X.; Yang, J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94* (21), 11156.

(206) Djernes, K. E.; Moshe, O.; Richards, D. D.; Hooley, R. J. *Org. Lett.* **2012**, *14* (3), 788.
(207) Rabion, A.; Buchanan, R. M.; Seris, J.-L.; Fish, R. H. *J. Mol. Catal. Chem.* **1997**, *116*, 43.
(208) Bianchini, G.; Cavarzan, A.; Scarso, A.; Strukul, G. *Green Chem.* **2009**, *11* (10), 1517.
(209) Cavarzan, A.; Bianchini, G.; Sgarbossa, P.; Lefort, L.; Gladiali, S.; Scarso, A.; Strukul, G. *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15* (32), 7930.
(210) Zou, C.; Zhao, M.; Wu, C.-D. *Catal. Commun.* **2015**, *66*, 116.
(211) Islam, S. M.; Ghosh, K.; Roy, A. S.; Salam, N.; Chatterjee, T. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **2014**, *24* (2), 457.
(212) Milo, A.; Neumann, R. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (9), 2535.
(213) Sloboda-Rozner, D.; Alsters, P. L.; Neumann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (18), 5280.
(214) Groothaert, M. H.; Smeets, P. J.; Sels, B. F.; Jacobs, P. A.; Schoonheydt, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (5), 1394.
(215) Hammond, C.; Forde, M. M.; Ab Rahim, M. H.; Thetford, A.; He, Q.; Jenkins, R. L.; Dimitratos, N.; Dummer, N. F.; Murphy, D. M.; Carley, A. F.; Taylor, S. H.; Willock, D. J.; Stangland, E. E.; Kang, J.; Hagen, H.; Kiely, C. J.; Hutchings, G. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (21), 5129.
(216) Neimann, K.; Neumann, A.; Buchanan, R. M.; Fish, R. H. *Inorg. Chem.* **1999**, *38* (15), 3575.
(217) Ab Rahim, M. H.; Forde, M. M.; Jenkins, R. L.; Hammond, C.; He, Q.; Dimitratos, N.; Lopez-Sanchez, J. A.; Carley, A. F.; Taylor, S. H.; Willock, D. J.; Murphy, D. M.; Kiely, C. J.; Hutchings, G. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (4), 1280.
(218) Enache, D. I.; Edwards, J. K.; Landon, P.; Solsona-Espriu, B.; Carley, A. F.; Herzing, A. A.; Watanabe, M.; Kiely, C. J.; Knight, D. W.; Hutchings, G. J. *Science* **2006**, *311* (5759), 362.
(219) Buron, C.; Sénéchal-David, K.; Ricoux, R.; Le Caër, J.-P.; Guérineau, V.; Méjanelle, P.; Guillot, R.; Herrero, C.; Mahy, J.-P.; Banse, F. *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21* (34), 12188.
(220) Okamoto, Y.; Onoda, A.; Sugimoto, H.; Takano, Y.; Hirota, S.; Kurtz, D. M.; Shiro, Y.; Hayashi, T. *Chem Commun* **2014**, *50* (26), 3421.
(221) van Dongen, S. F. M.; Clerx, J.; Nørgaard, K.; Bloemberg, T. G.; Cornelissen, J. J. L. M.; Nelson, S. W.; Benkovic, S. J.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M. *Nat. Chem.* **2013**, *5* (11), 945.
(222) Esmieu, C.; Cherrier, M. V.; Amara, P.; Girgenti, E.; Marchi-Delapierre, C.; Oddon, F.; Iannello, A.; Cavazza, C.; Ménage, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (14), 3922.
(223) Muñoz Robles, V.; Vidossich, P.; Ward, T. R.; Maréchal, J.-D. *ACS Catal.* **2014**, *4* (3), 833.
(224) Schwizer, F.; Köhler, V.; Dürrenberger, M.; Knörr, L.; Ward, T. R. *ACS Catal.* **2013**, *3* (8), 1752.
(225) Yu, F.; Cangelosi, V. M.; Zastrow, M. L.; Tegoni, M.; Plegaria, J. S.; Tebo, A. G.; Mocny, C. S.; Ruckthong, L.; Qayyum, H.; Pecoraro, V. L. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (7), 3495.
(226) Taube, H. *J. Gen. Physiol.* **1965**, *49* (1), 29.
(227) Kimura, E.; Kodama, M.; Machida, R.; Ischizu, K. *Inorg. Chem.* **1982**, *21* (2), 595.
(228) Chen, B.-T.; Bukhryakov, K. V.; Sougrat, R.; Rodionov, V. O. *ACS Catal.* **2015**, *5* (2), 1313.
(229) Menage, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35* (20), 2353.
(230) Ménage, S.; Galey, J.-B.; Dumats, J.; Hussler, G.; Seité, M.; Luneau, I. G.; Chottard, G.; Fontecave, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (51), 13370.
(231) Breslow, R.; Overman, L. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (4), 1075.
(232) Van Esch, J.; Roks, M. F. M.; Nolte, R. J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108* (19), 6093.
(233) Roks, M. F. M.; et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105* (14), 4507.
(234) Groves, J. T.; Neumann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (16), 5045.
(235) Groves, J. T.; Ungashe, S. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (21), 7796.
(236) Groves, J. T.; Neumann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (8), 2900.
(237) Schenning, A. P. H. J.; Hubert, D. H. W.; Van Esch, J.; Feiters, M. C.; Nolte, R. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33* (23-24), 2468.

(238) Gosling, J. V.; Van Esch, J. H.; Hoffmann, M. A. M.; Nolte, R. J. M. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 472.
(239) Rezaeifard, A.; Haddad, R.; Jafarpour, M.; Hakimi, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (27), 10036.
(240) Bar-Nahum, I.; Khenkin, A. M.; Neumann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (33), 10236.
(241) Weinstock, I. A.; Barbuzzi, E. M.; Wemple, M. W.; Cowan, J. J.; Reiner, R. S.; Sonnen, D. M.; Heintz, R. A.; Bond, J. S.; Hill, C. L. *Nature* **2001**, *414* (6860), 191.
(242) Sarma, B. B.; Neumann, R. *Nat. Commun.* **2014**, *5* (4621), 1.
(243) Raynal, M.; Ballester, P.; van Leeuwen, P. W. N. M. *Chem Soc Rev* **2014**, *43* (5), 1734.
(244) Wang, A.; Jiang, H. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (7), 2321.
(245) Yoon, M.; Srirambalaji, R.; Kim, K. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (2), 1196.
(246) Lee, J.; Farha, O. K.; Roberts, J.; Scheidt, K. A.; Nguyen, S. T.; Hupp, J. T. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (5), 1450.
(247) Corma, A.; García, H.; Llabrés i Xamena, F. X. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (8), 4606.
(248) Cavazza, C.; Bochot, C.; Rousselot-Pailley, P.; Carpentier, P.; Cherrier, M. V.; Martin, L.; Marchi-Delapierre, C.; Fontecilla-Camps, J. C.; Ménage, S. *Nat. Chem.* **2010**, *2* (12), 1069.
(249) Marchi-Delapierre, C.; Rondot, L.; Cavazza, C.; Ménage, S. *Isr. J. Chem.* **2015**, *55* (1), 61.
(250) Dürrenberger, M.; Ward, T. R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 99.
(251) Li, A.; Liu, J.; Pham, S. Q.; Li, Z. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (98), 11572.
(252) Li, A.; Wu, S.; Adams, J. P.; Snajdrova, R.; Li, Z. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (63), 8771.
(253) Mekmouche, Y.; Schneider, L.; Rousselot-Pailley, P.; Faure, B.; Simaan, A. J.; Bochot, C.; Réglier, M.; Tron, T. *Chem Sci* **2015**, *6* (2), 1247.
(254) Schneider, L.; Mekmouche, Y.; Rousselot-Pailley, P.; Simaan, A. J.; Robert, V.; Réglier, M.; Aukauloo, A.; Tron, T. *ChemSusChem* **2015**, *8* (18), 3048.
(255) Sarma, B. B.; Efremenko, I.; Neumann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (18), 5916.
(256) Guillo, P.; Hamelin, O.; Batat, P.; Jonusauskas, G.; McClenaghan, N. D.; Ménage, S. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (4), 2222.
(257) Hamelin, O.; Guillo, P.; Loiseau, F.; Boissonnet, M.-F.; Ménage, S. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (17), 7952.
(258) Minten, I. J.; Claessen, V. I.; Blank, K.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M.; Cornelissen, J. J. L. M. *Chem Sci* **2011**, *2* (2), 358.
(259) Bode, S. A.; Minten, I. J.; Nolte, R. J. M.; Cornelissen, J. J. L. M. *Nanoscale* **2011**, *3* (6), 2376.
(260) Liu, L.; Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (18), 4978.
(261) Klotz, I. M.; Stryker, V. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90* (10), 2717.
(262) Klotz, I. M.; Royer, G. P.; Scarpa, I. S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1971**, *68* (2), 263.
(263) Spetnagel, W. J.; Klotz, I. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98* (25), 8199.
(264) Suh, J.; Scarpa, I. S.; Klotz, I. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98* (22), 7060.
(265) Hollfelder, F.; Kirby, A. J.; Tawfik, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (40), 9578.
(266) Liu, L.; Rozenman, M.; Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (43), 12660.
(267) Suh, J.; Hong, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (48), 12545.
(268) Avenier, F.; Domingos, J. B.; Hollfelder, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (24), 7611.
(269) Avenier, F.; Hollfelder, F. *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15* (45), 12371.
(270) Levi, N.; Neumann, R. *ChemPlusChem* **2012**, *77* (11), 977.
(271) Ren, Q.-Z.; Yao, Y.; Ding, X.-J.; Hou, Z.-S.; Yan, D.-Y. *Chem. Commun.* **2009**, 4732.
(272) Haimov, A.; Cohen, H.; Neumann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (38), 11762.
(273) Haimov, A.; Neumann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (49), 15697.

CHAPITRE II

Chapitre II : Description du projet

La nature a créé de nombreuses enzymes capables de réaliser des réactions d'oxydation, telles que les oxydases, les peroxydases, les dioxygénases et les monooxygénases à fer (méthane monooxygénase (MMOs), cytochrome P450 (cytP450) ou a cuivre (méthane monooxygénase particulaire (MMOp), polysaccharide monooxygénase (PMO)). La famille des monooxygénases est certainement l'une des plus attractives en termes d'oxydation de liaisons C-H de haute énergie. À ce jour, et ce malgré de nombreuses recherches sur ces différentes monooxygénases, très peu d'exemples de complexes utilisant directement l'oxygène de l'air pour oxyder une liaison C-H ont été publiés, la plupart étant développés dans des solvants organiques. De plus, aucun de ces complexes ne peut être utilisé de façon catalytique à cause de l'absence d'une source renouvelable d'électrons et de protons. Notre projet s'articule donc autour de la synthèse et l'étude d'enzymes artificielles capables d'activer le dioxygène dans l'eau. L'idée principale est de s'inspirer de la nature en compartimentant les sites où se déroulent la réduction et l'oxydation, afin d'éviter tout transfert d'électrons inopportun, ceci grâce à un polymère de type polyéthylèneimine modifié. Ces entités catalytiques vont être composées d'une part, d'un site actif catalytique (composé d'un complexe métallique), et d'autre part, soit d'un cofacteur redox de type flavinique (cofacteur naturel)[1] soit d'un complexe de ruthénium photoactivable.[2,3] Le site actif catalytique et le cofacteur redox seront maintenus à proximité au sein d'un polymère de type polyéthylène-imine modifié, constituant ainsi une véritable enzyme synthétique. Le but final est de parvenir à oxyder des substrats de type alcène ou alcane, dans l'eau, avec le dioxygène de l'air comme seule source d'oxygène (**Schéma II-1**).

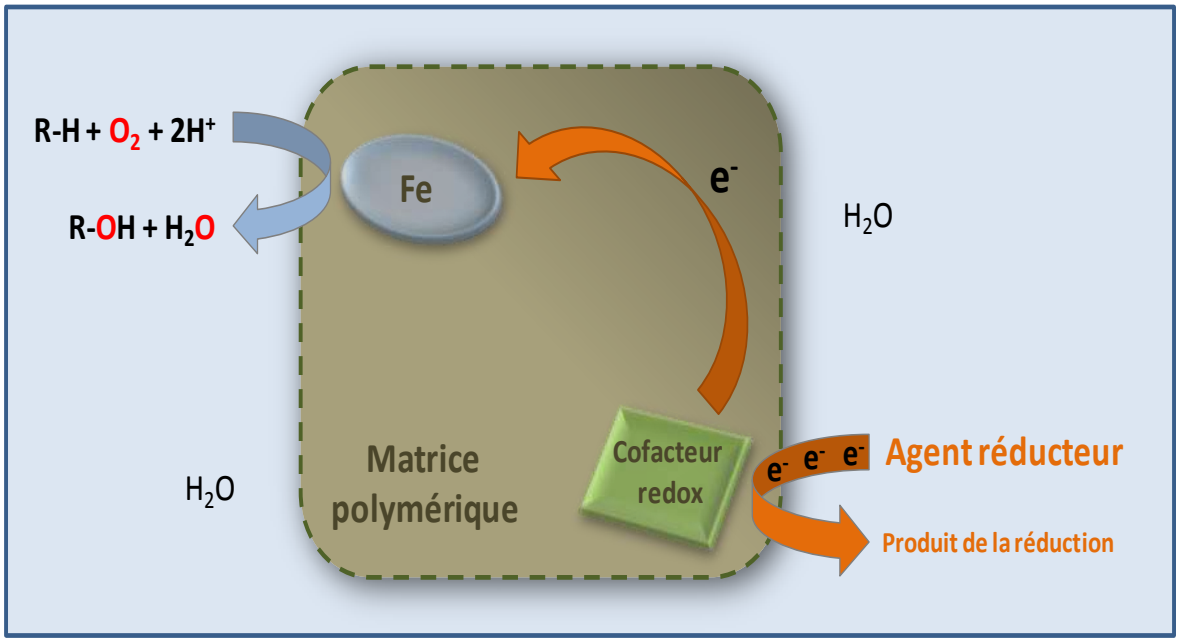


Schéma II.1 : Illustration du projet de thèse : enzyme synthétique « synzyme »

Le concept général de notre projet d'enzyme artificielle est représenté dans le **Schéma II.1** : le cofacteur redox (vert) transfère un électron au site actif catalytique (ici complexe de fer (bleu)) qui sert de catalyseur pour la réaction d'oxydation. Le fer, ainsi réduit à l'état fer(II), pourra catalyser l'activation réductrice du dioxygène de l'air pour permettre l'oxydation du substrat. Toutefois, pour réaliser un cycle catalytique complet, l'espèce fer(II) devra être régénérée par un agent réducteur, qui amènera les électrons nécessaires au cofacteur redox. Les deux cofacteurs sont maintenus à proximité par interaction avec une matrice polymérique, l'ensemble étant soluble dans l'eau. En parallèle, nous tenterons de caractériser le polymère modifié ainsi que l'ensemble de l'entité catalytique, même si cela semble très compliqué au regard de l'architecture du polymère et des catalyseurs utilisés. Cette caractérisation serait particulièrement bénéfique pour la compréhension du système et l'optimisation de son efficacité en catalyse d'oxydation.

Dans la suite de cet exposé, nous aborderons les résultats obtenus au cours de cette thèse. Tout d'abord, il sera question de la synthèse et de la caractérisation de la matrice polymérique (chapitre III), puis de la synthèse des cofacteurs catalytiques de type héminique et non-héminique, mono et binucléaires (chapitre IV). Ces complexes seront alors testés en catalyse d'oxydation dans l'eau en présence de H_2O_2 et de polymère (chapitre V). Par la suite, nous présenterons le choix du cofacteur redox avant d'étudier la fonctionnalité de la partie réductase (chapitre VI). Enfin, nous étudierons l'assemblage des deux cofacteurs pour créer l'enzyme artificielle (chapitre VII) avant de tester son utilisation en catalyse d'oxydation dans l'eau en présence de dioxygène (chapitre VIII). Dans le dernier chapitre, une conclusion générale sur les travaux de thèse sera présentée ainsi que les perspectives de ce travail.

Références

(1) Merkx, M.; Kopp, D. A.; Sazinsky, M. H.; Blazyk, J. L.; Müller, J.; Lippard, S. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (15), 2782.
(2) Avenier, F.; Herrero, C.; Leibl, W.; Desbois, A.; Guillot, R.; Mahy, J.-P.; Aukauloo, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (13), 3634.
(3) Iali, W.; Lanoe, P.-H.; Torelli, S.; Jouvenot, D.; Loiseau, F.; Lebrun, C.; Hamelin, O.; Ménage, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *127* (29), 8535.

CHAPITRE III

Chapitre III : Synthèse et caractérisation des différentes matrices polymériques

I) Synthèses des polymères fonctionnalisés

L'idée initiale est de fonctionnaliser le polymère commercial (PEIcom), qui est un polymère de polyéthylène-imine de 25 kDa, hyperbranché, avec des ratios respectivement en amines primaire/secondaire/tertiaire de 25/50/25 en pourcentage de masse. La fonctionnalisation envisagée est en réalité une poly-fonctionnalisation réalisée par greffage sur le PEIcom de trois groupements différents, chacun jouant un rôle spécifique. Le premier greffage permet de positionner un groupement carboxylate chargé négativement qui peut par exemple, interagir avec des complexes de fer chargés positivement. Le second groupement greffé est un groupement guanidinium, chargé positivement et très afin pour les groupements phosphates[1,2] ou encore des groupements chargés négativement. Enfin le troisième greffage met en place un groupement octyle permettant de créer un environnement localement hydrophobe au sein du polymère fonctionnalisé. Dans la suite de ce manuscrit, les polymères modifiés sont notés génériquement PEIF, et en fonction de la nature des groupements greffés nous préciserons la dénomination : PEIFg pour les polymères bifonctionnalisés PEI-guanidinium octylés et PEIFac pour les PEI-acide carboxylique octylés. Nous avons débuté cette étude par la synthèse de ces deux types de PEIF avant d'envisager la trifonctionnalisation. Leurs synthèses ont été adaptées de la littérature (**Schéma III.1**).[3]

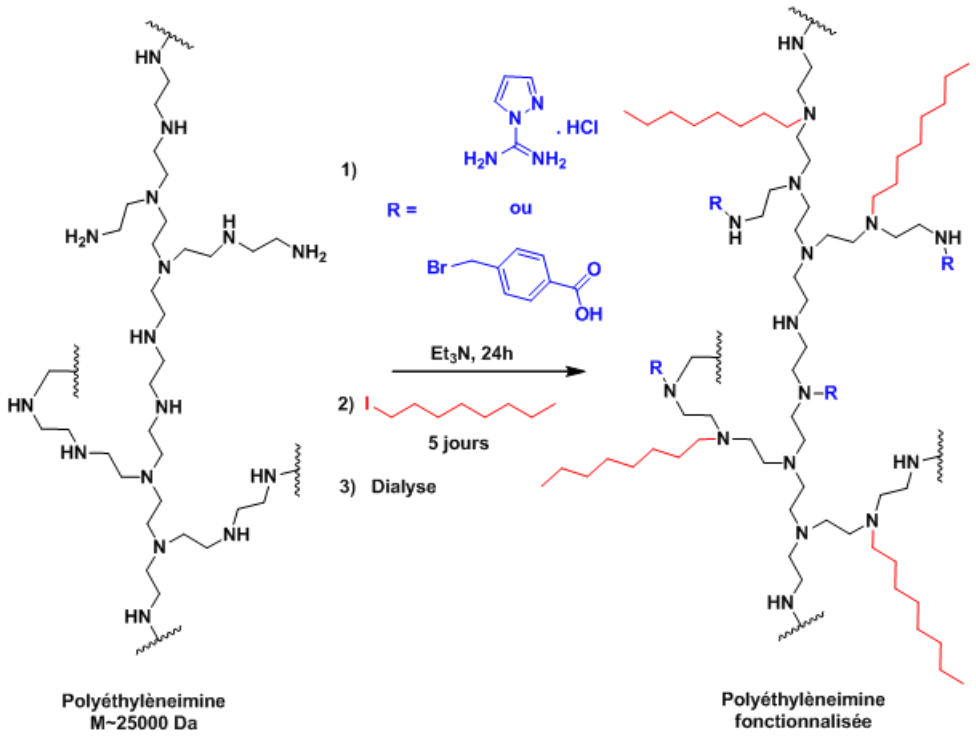


Schéma III.1 : Schéma de synthèse des PEI fonctionnalisés (PEIF)

Le polymère PEIcom est fonctionnalisé par substitution nucléophile, soit de l'atome de brome de l'acide 4-bromométhylbenzoique, soit du groupement pyrazole de la praxadine, par les fonctions amines du polymère, en présence de base, la triéthylamine. Après 24 heures, l'ajout de iodooctane, en présence de base, à la solution de polymère ainsi monofonctionnalisé, entraîne une seconde substitution nucléophile de l'atome d'iode du iodooctane par les fonctions amines encore libres du polymère. Cette réaction d'octylation est poursuivie pendant cinq jours de manière à ce que le temps ne soit pas un facteur limitant de la réaction de greffage des groupements octyle sur le polymère. Notons toutefois que cette durée pourrait sans doute être réduite à la lumière des résultats cinétiques observés lors de la formation des polymères monofonctionnalisés. Ce point sera détaillé ultérieurement.

Les polymères bifonctionnalisés résultants sont ensuite purifiés par dialyse et récupérés dans l'eau en fin de réaction. Les concentrations en polymères produits ont alors été estimées par résonance magnétique nucléaire (RMN). Dans ces échantillons la présence d'eau en grande quantité rend peu précise, voire impossible, la quantification sur les spectres RMN ^{1}H obtenus par une acquisition simple standard. Il a donc été nécessaire d'adapter le protocole de mesures afin de pouvoir déterminer les taux de greffage qui nous intéressent. La méthode de quantification utilisée pour ces échantillons sera décrite plus en détails dans un prochain paragraphe.

Dans le but de réaliser une bibliothèque de polymères avec des propriétés physiques variées, différentes proportions relatives de réactifs nucléophiles ont été testées (**Tableau III.1**). Au cours de cette étude certains polymères bifonctionnalisés ont précipité en solution durant la réaction ; de ce fait, ces polymères ont été éliminés de notre étude et leurs résultats ne sont pas rapportés dans ce manuscrit. Finalement, 46 polymères bifonctionnalisés par deux entités différentes ont été obtenus, dont 30 ont fait l'objet d'une quantification par RMN. Le bilan est dressé dans le **Tableau III.1**. Dans ce manuscrit nous ne rapporterons en détails que la méthode de quantification des greffages des polymères bifonctionnalisés. Les caractérisations qualitatives et structurales des polymères PEIcom, PEI monofonctionnalisés et bifonctionnalisés ont été réalisées à l'aide des techniques classiques RMN 1D ^{1}H (avec cependant la méthode WATERGATE pour (WATER-suppression by GrAdient-Tailored Excitation)), ^{13}C, et 2D ^{13}C-^{1}H et ^{15}N-^{1}H HMBC.

Tableau III.1 : Composition théorique des différents polymères fonctionnalisés (PEIF) en nombre d'équivalent par rapport à la concentration en monomère du polymère [mono].

	NUMEROS	Nombre éq. d'acide vs [mono]	Nombre éq. de guanidinium vs [mono]	Nombre éq. d'octyle vs [mono]	RMN
PEIFg	1	Ø	0,1	0,0	√
	2			0,2	√
	3			0,4	√
	4			0,6	√
	5			0,8	√
	6			1,0	√
	7	Ø	0,2	0,0	√
	8			0,2	√
	9			0,4	√
	10			0,6	√
	11			0,8	√
	12			1,0	√
	13			1,5	√
	14			2,0	√
	15	Ø	0,4	0,0	√
	16			0,2	√
	17			0,4	√
	18			0,6	√
	19			0,8	√
	20			1,0	√
	21			1,5	√
	22			2,0	√
	23	Ø	0,6	0,0	√
	24			0,2	√
	25			0,4	√
	26			0,6	√
	27			0,8	√
	28			1,0	√
	29			1,5	√
	30			2,0	√

	NUMEROS	Nombre éq. d'acide vs [mono]	Nombre éq. de guanidinium vs [mono]	Nombre éq. d'octyle vs [mono]	RMN
PEIFac	31	0,0	Ø	0,0	Ø
	32	0,2		0,0	
	33	0,4		0,0	
	34	0,6		0,0	
	35	0,0	Ø	0,2	Ø
	36	0,2		0,2	
	37	0,4		0,2	
	38	0,6		0,2	
	39	0,0	Ø	0,4	Ø
	40	0,2		0,4	
	41	0,4		0,4	
	42	0,6		0,4	
	43	0,0	Ø	0,6	Ø
	44	0,2		0,6	
	45	0,4		0,6	
	46	0,6		0,6	

Deux points particuliers sont à souligner. Tout d'abord, parmi les polymères reportés dans le **Tableau III.1**, les polymères notés 31 à 46 fonctionnalisés à la fois par des groupements acide carboxylique et octyle seront dénommés par la suite (PEIFac n acide/ n octyle). Par exemple le polymère 46 sera appelé PEIFac 0.6/0.6. Ces PEIFac n'ont pas été étudiés par spectroscopie RMN. En effet, d'une part, la méthode que nous exposerons dans le prochain paragraphe a été développée après leur synthèse. D'autre part, une fois la méthode acquise, notre intérêt s'est porté plus particulièrement sur les polymères de 1 à 30 fonctionnalisés à la fois par des groupements guanidinium et par des par des groupements octyle (PEIFg n guanidinium/ n octyle), en raison des résultats prometteurs obtenus en réduction de la FMN et en catalyse d'oxydation et qui font l'objet des chapitre VI, VII et VIII. De ce fait nous nous sommes concentrés sur l'étude des PEIFg et la quantification du greffage par RMN. Le second point à noter est le suivant : la synthèse de polymère tri-fonctionnalisé n'a pas encore été étudiée, mais est envisagée et sera *a priori* analytiquement possible. Dans le prochain paragraphe, nous allons donc nous attacher à décrire les caractérisations quantitatives des polymères bi-fonctionnalisés obtenus par spectroscopie RMN, en commençant par décrire la méthode mise au point.

II) Quantification des polymères PEI fonctionnalisés par RMN ^{1}H

II-A) Présentation de la méthode

Pour caractériser ces polymères fonctionnalisés synthétisés dans l'eau, la RMN s'est avérée être un outil de choix, permettant cette caractérisation sans manipulations contraignantes telle qu'une lyophilisation ou encore une évaporation des solutions de PEIF.

Dans le cas de nos études par RMN dans l'eau, nous nous plaçons dans un milieu isotrope. Les seuls observables RMN exploitables sur les spectres à l'origine des signaux et de leur structure fine émanent donc exclusivement des interactions RMN de déplacement chimique δ et de couplage scalaire J (homonucléaires ^{1}H/^{1}H et hétéronucléaires ^{13}C/^{1}H ou ^{15}N/^{1}H). L'expérience RMN « One – Pulse » 1D typique consiste à exciter la solution de polymère à étudier à la fréquence de Larmor associée au noyau que l'on souhaite observer, ici ^{1}H, en présence d'un champ magnétique statique et homogène B_0. Une fois l'excitation terminée, il s'agit de détecter le signal de précession libre ou FID (Free Induction Decay) généré par le retour à l'équilibre des noyaux ciblés. Après transformation de Fourier un spectre RMN peut être directement obtenu : il contient l'ensemble des informations structurales de chaque constituant de l'échantillon étudié. Dans le cas d'un échantillon multi-constituants, les amplitudes des signaux observés sont en rapport avec leurs compositions molaires. A l'aide d'une simple intégration des signaux, il est donc possible de remonter quantitativement à la composition de l'échantillon, et donc dans notre cas de pouvoir estimer le taux de greffage du polymère substrat, *lorsque le spectre RMN est obtenu dans des conditions quantitatives*. Pour cela, les conditions d'acquisition du signal RMN comme les conditions d'obtention et de traitement du spectre RMN doivent être vérifiées.

Concernant les conditions d'acquisition, tout d'abord, il est nécessaire de s'assurer que les conditions de répétition de l'expérience mise en jeu soient quantitatives. A cette fin, le temps de répétition global de l'expérience doit être optimisé en tenant compte de la valeur du temps de relaxation longitudinale T_1 des noyaux excités les plus lents à relaxer. En effet, nous devons être sûrs que les noyaux soient totalement relaxés et revenus à l'équilibre avant qu'une nouvelle accumulation de la même expérience ne commence, sinon nous n'enregistrons pas et n'accumulons pas toujours le même signal. De manière générale, pour un système de spins de temps de relaxation longitudinale T_1, il est possible de montrer que le signal RMN issu de de ce système excité par une impulsion égale à 90° s'atténue à 99% pour un temps total d'expérience égal à 5 fois la valeur du T_1. Dans ces conditions, l'accumulation du signal est réalisée dans des conditions quantitatives.[4,5,6,7] La calibration de l'angle d'excitation utilisé et l'estimation préalable de la valeur de T_1 la plus longue des spins de l'échantillon, indispensables afin d'obtenir des résultats quantitatifs, ont donc été effectués préalablement à toute acquisition. Les détails de ces réglages sont présentés en **Annexe**. Le temps d'acquisition AQ a été optimisé pour chaque échantillon afin de minimiser le bruit acquis et d'optimiser le nombre de points TD (Time Domain) d'acquisition du signal, sachant que la fenêtre spectrale du spectre obtenu après transformation de Fourier est fixée par la composition chimique de l'échantillon, et dans le cas de la séquence WATERGATE décrite dans le paragraphe suivant, par la position fréquentielle du signal de l'eau.

Intéressons-nous maintenant aux conditions d'obtention du spectre RMN et de son traitement avant exploitation quantitative. Le signal de précession libre est tout d'abord multiplié par une fonction exponentielle décroissante exp(-LB.t) dont la valeur positive de l'argument LB est *a posteriori* vérifiée de façon à ce que le signal reste quantitatif, *i.e* en le choisissant de sorte que LB reste inférieur à la demi-largeur à mi-hauteur du signal le plus fin du spectre RMN obtenu après transformation de Fourier sans apodisation. En général l'exponentielle appliquée est d'argument LB = 0.2Hz. Le signal après apodisation est Fourier-transformé en bénéficiant d'une étape de « Zero Filling » afin d'augmenter la résolution spectrale sans altérer le contenu informatif du signal acquis et sans augmenter le temps d'acquisition. Une fois la phase de l'ensemble des signaux du spectre RMN réglée, la ligne de base est systématiquement corrigée et la calibration du spectre contrôlée à l'aide du spectre de la référence interne (méthanol ou acétonitrile). Enfin, les signaux du spectre peuvent être intégrés. Pour cette étape, plusieurs signaux des polymères substrat et produit ont été choisis : pour le PEIF portant des groupements de type carboxylato-phényl nous avons choisi d'intégrer les signaux caractéristiques des protons aromatiques à δ = 7,72 ppm et 7,25 ppm. Pour le PEIF portant des groupements de type octyle, les signaux intégrés sont ceux du CH_3 terminal à δ = 0,90 ppm. Finalement, pour le PEIF portant des groupements de type guanidinium, les signaux intégrés sont ceux du méthylène guanidilé dans la zone de déplacement chimique δ = 3,56-3,03 ppm. La courbe intégrale de chaque signal intégré a été soigneusement contrôlée et corrigée le cas échéant afin de limiter les erreurs dues à une éventuelle distorsion de ligne de base. La quantification est réalisée en comparant les intégrales des signaux d'intérêt avec ceux de l'étalon interne de concentration connue. Les critères de choix de l'étalon interne sont : i) son inertie chimique, ii) sa capacité à donner peu de signaux RMN, et (au moins) un signal RMN distinct des signaux d'intérêt, iii) au moins un signal suffisamment intense malgré sa faible concentration. Pour toutes ces raisons, et bénéficiant de l'équivalence magnétique dynamique des protons des groupements CH_3 en rotation rapide à l'échelle de temps RMN à température ambiante, le méthanol (δ = 3.31 ppm) puis l'acétonitrile (δ = 1.94 ppm) ont été choisis.

Le traitement complet, pour une acquisition donnée, a été répété cinq fois par l'opérateur de manière à limiter sa contribution dans l'estimation de l'erreur globale de mesure. Enfin chaque acquisition a été répétée cinq fois. Ainsi chaque estimation de taux de greffage est le résultat d'un ensemble de vingt-cinq mesures traitées statistiquement (erreur de type A). Dans cette optique et afin de suivre au mieux les critères de validation de méthodes analytiques, les distributions statistiques ont été à chaque fois soumises aux tests paramétriques de Dixon (pour éliminer d'éventuelles données aberrantes), de Fischer-Snédécor et comparaison des moyennes expérimentales afin de contrôler la concordance entre les mesures. Comme c'est souvent le cas, nous avons opté arbitrairement pour un critère de Student à 5% (facteur de confiance à 95% ou facteur de risque à 5%) par acquisition pour définir l'erreur finale de la mesure, dans l'hypothèse usuelle d'une loi de distribution gaussienne des mesures.[8,9] La fidélité, ou précision des mesures effectuées, a été contrôlée à l'aide de la dispersion des données expérimentales pour chaque acquisition, *via* les valeurs de variance de chaque série. La reproductibilité de la méthode de mesure a été testée par un changement d'opérateur sur quelques acquisitions et traitements.

Les erreurs issues de la préparation des échantillons sur les concentrations des échantillons de la gamme étalon et des échantillons ont été évaluées en tenant compte des tolérances de la

verrerie et des seringues utilisées (erreurs de type B). La mesure de l'erreur finale est évaluée à l'aide de la propriété d'addition des variances des deux types de source d'erreurs : en général les erreurs issues de la préparation ne représentent pas une contribution importante dans l'évaluation des erreurs des mesures finales (**Annexe**).

Dans le but de doser les échantillons, une gamme étalon a été préparée à partir d'une solution mère de 100 mmol/L en PEI, diluée de manière à créer 5 étalons de 0 à 100 mmol/L également espacés en concentration toutes les 25 mmol/L. Les concentrations ont été choisies de manière à couvrir les concentrations usuellement atteintes. La linéarité de la méthode a été testée sur cette gamme étalon. La justesse, quant à elle, a été estimée à l'aide de la gamme étalon et un échantillon de concentration connue, dosée par la droite d'étalonnage, réalisée dans les mêmes conditions que les échantillons réels. Enfin, bien qu'utiles dans la validation complète d'une méthode, nous n'avons pas cherché à déterminer ni la limite de détection ni la limite de quantification, sans réel intérêt pour nos études jusqu'à maintenant.

La sensibilité de la méthode dépend essentiellement de la quantité d'eau de l'échantillon, et plus précisément de l'efficacité de la séquence WATERGATE à supprimer du spectre le signal de l'eau, bien que l'eau ne soit pas éliminée de l'échantillon, et ce, sans altérer le contenu informatif du spectre. Cette méthode est décrite en détails dans le paragraphe suivant. Les quantifications réalisées, autant que possible sur les échantillons avec et sans l'application de la séquence WATERGATE, ont montré que l'application de cette séquence améliorait significativement la quantification des signaux d'intérêt sur le spectre sans altérer sa quantitativité.

La méthode décrite est relativement aisée à mettre en place puisqu'une fois les réglages standards à toute acquisition RMN réalisés, il suffit de placer le signal de l'eau au milieu de la fenêtre spectrale (« on resonance ») et de définir un délai caractéristique égal à l'inverse de largeur spectrale du spectre. Il s'agit d'une méthode robuste puisque nous avons pu l'utiliser sur plusieurs spectromètres RMN. Le point limitant techniquement est d'obtenir une bonne homogénéité de champ magnétique, car la méthode WATERGATE est assez sensible à ce paramètre. Dans notre cas, nous avons travaillé sur un spectromètre RMN à 9.4 T (fréquence de Larmor de 400.13 MHz pour le proton) plutôt que sur le spectromètre RMN 600 MHz du laboratoire. En effet, après quelques tests, nous nous sommes rendu compte que les réglages d'homogénéité sur cet appareillage sont plus chronophages que sur le spectromètre 400 MHz pour un gain en résolution et en sensibilité inutile dans le cas des échantillons étudiés, voire nuisibles dans le cas du développement d'une méthode que l'on a souhaité de routine.

Une fois tous les réglages effectués pour une acquisition standard, nous nous trouvons dans des conditions opératoires quantitatives pour réaliser nos expériences RMN. Cependant, pour réaliser un spectre RMN dans l'eau, il est nécessaire de s'affranchir du signal de l'eau car celui-ci sature la dynamique du détecteur (convertisseur analogique-numérique) du spectromètre et ne permet pas corollairement de détecter convenablement les autres signaux présents sur le spectre. Le rapport signal/ bruit (S/B) est souvent très faible pour la molécule d'intérêt, et les signaux ne sont pas toujours visibles.

Afin de supprimer ou limiter fortement l'amplitude du signal de l'eau, trois techniques sont en général à disposition. La première technique consiste à pré-saturer sélectivement le signal de l'eau avant acquisition du signal complet, pendant environ une seconde à faible puissance. Cette

technique fonctionne souvent bien, mais à pour désavantages : i) de ne pas pouvoir être répétée rapidement sous peine de ne pas réussir à maintenir constante la température de l'échantillon, ii) de ne plus faire apparaître les signaux des protons en échange avec l'eau avec une cinétique inférieure à une seconde, également atteints par la présaturation, iii) le résultat expérimental est quelquefois décevant en terme de distorsion de ligne de base. La seconde technique consiste à utiliser les propriétés dynamiques de l'eau par rapport aux autres constituants de l'échantillon. L'eau est une petite molécule dont le coefficient d'autodiffusion est en général très différent de ceux des autres constituants du mélange. En particulier s'agissant des polymères substrat et produit, leur poids moléculaire et leur taille permet de prévoir une très grande différence de dynamique moléculaire. De ce fait, il est possible de réaliser une expérience dite DOSY-1D (Diffusion Ordered SpectroscopY) dans laquelle les amplitudes des signaux sont affectées en fonction de leur coefficient de diffusion. De ce fait, le signal de l'eau est plus atténué que celui des autres composés, ce qui permet de diminuer artificiellement le ratio thermodynamique eau/autres constituants sans saturer le solvant (**Figure III.1**).[10,11,12] En contrepartie, la détection qualitative des signaux d'intérêt est donc nettement améliorée, bien qu'en général il soit nécessaire pour conserver un rapport S/B intéressant d'augmenter nettement le nombre d'accumulations de l'expérience et donc le temps global de l'expérience. Toutefois, pour rester quantitatif, il faut paramétrer l'expérience de manière à ne pas altérer le ratio entre les signaux de l'étalon interne et les signaux d'intérêt, tout en altérant grandement le ratio entre les signaux de l'eau et les signaux d'intérêt ce qui est assez complexe puisque l'étalon interne, méthanol ou acétonitrile, est également une petite molécule, et donc présente un coefficient de diffusion plus proche de celui de l'eau que de ceux des polymères. Des essais ont été menés par cette méthode mais ont donné de moins bons résultats en terme de robustesse et d'automatisation de la méthode que la troisième technique, WATERGATE que nous allons maintenant développer. En effet, la séquence est plus difficile et longue à paramétrer que la séquence que nous avons utilisée. Nous reparlerons toutefois de l'intérêt de la séquence DOSY, cette fois bidimensionnelle, dans le cas de l'identification structurale des signaux du polymère substrat par rapport à ceux du polymère produit.

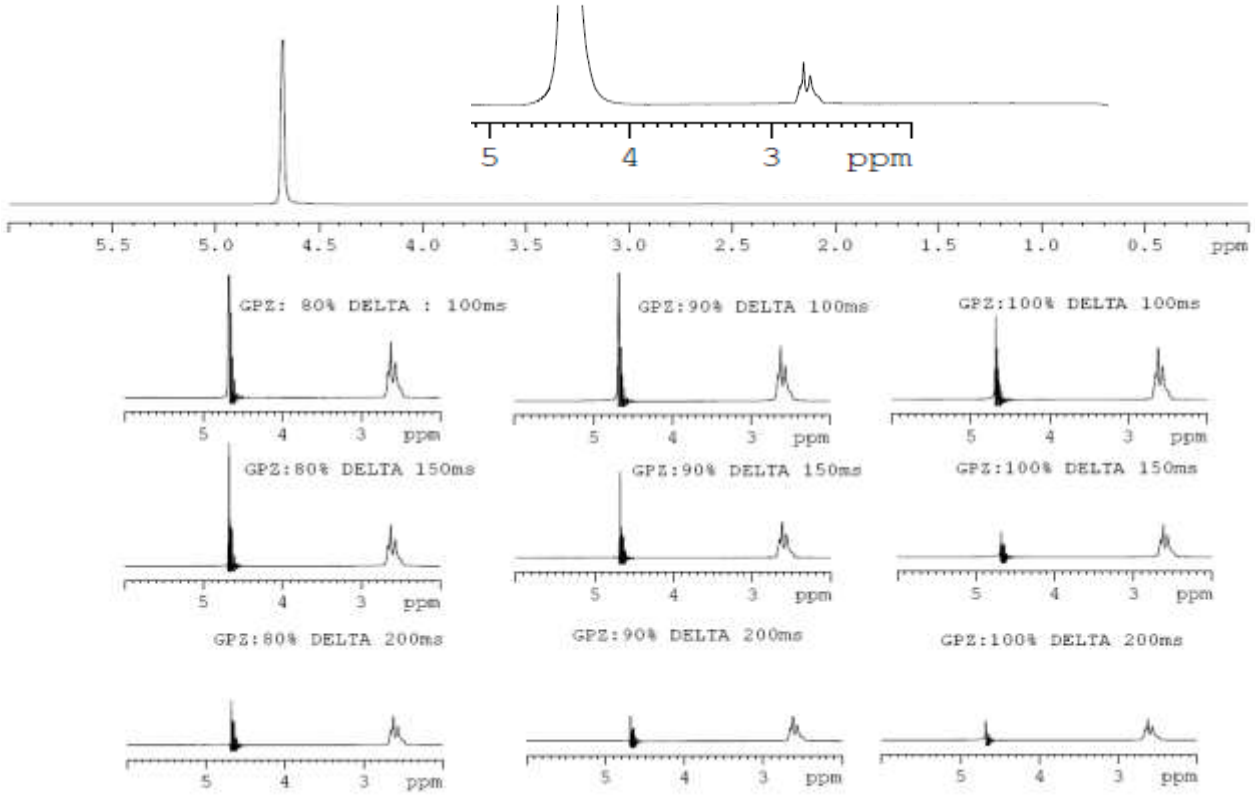


Figure III.1*:* Spectres RMN ^{1}H 400 MHz obtenus par différentes séquences pour un échantillon test constitué de PEIcom dans l'eau (100 mmol/L). En haut, spectre complet et agrandissement du spectre obtenu par la séquence « One-Pulse ». En bas, spectres obtenus par la séquence DOSY-1D en faisant varier les paramètres adéquats afin de trouver le meilleur compromis (ici GPZ : 100%, DELTA = 100ms).

La dernière méthode, est celle que nous avons utilisée. La séquence WATERGATE permet de s'affranchir efficacement du signal de l'eau (**Figure III.2**).[13,14,15] Pour y parvenir, la séquence d'impulsions impose que le signal dont la fréquence de résonance coïncide avec le milieu de la fenêtre spectrale, dit signal « on resonance » et ceux équidistants d'une distance d paramétrable par l'utilisateur du signal « on resonance » ne subissent pas la même évolution au cours de la séquence que les signaux disposés de manière quelconque sur le spectre. En général, la distance d est choisie égale à la demi-largeur spectrale : de ce fait seul le signal de l'eau «on resonance » est affecté par la séquence. En première approximation, tout se passe comme si tous les protons subissaient une excitation d'un angle de 90 degrés comme lors d'une acquisition standard à l'exception des protons du signal « on resonance » peu ou pas excité, ce qui a pour conséquence de ne pas générer de signal RMN pour ces protons. Cette différence de traitement permet d'inhiber ou limiter le signal de l'eau, augmentant ainsi le rapport S/B des signaux d'intérêt (ici le PEI). Cette méthode a nécessité de long mois de mises au point afin de s'assurer de sa validité pour des résultats quantitatifs et pas seulement qualitatifs, mais finalement, elle s'avère être très facile à utiliser et permet de réaliser des spectres RMN en routine de bonne qualité sans signal de solvant. Le tube RMN peut être rempli directement par une solution de polymère dans l'eau sans autre traitement

au préalable que la dialyse. Puis l'ajout d'un étalon interne permet de quantifier la fonctionnalisation du polymère.

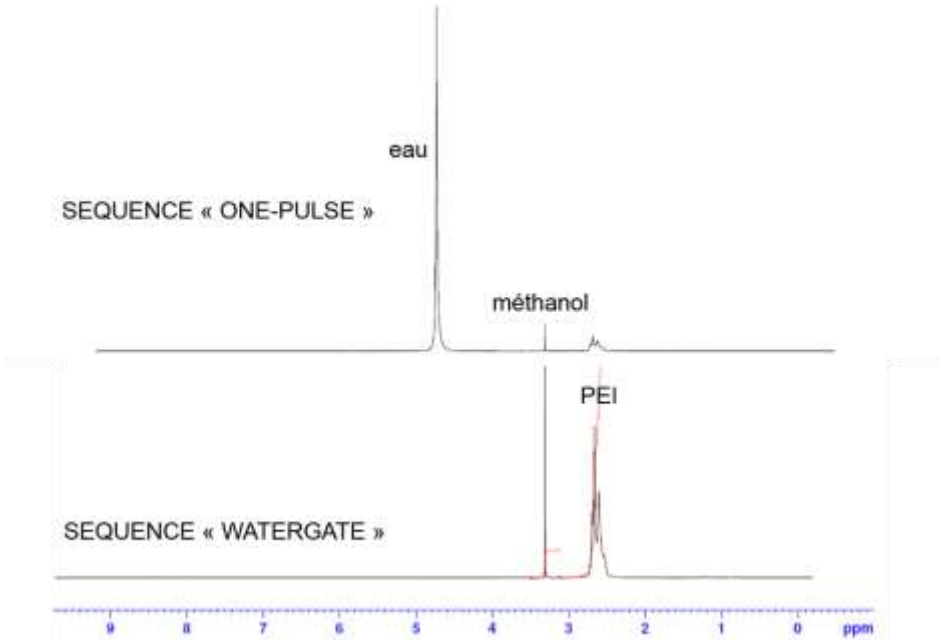


Figure III.2 : RMN ^{1}H à 400 MHz dans l'eau du polymère PEI commercial, séquence « one pulse » (haut) et séquence « WATERGATE » (bas). La résonance du groupement hydroxyle du méthanol en échange chimique avec l'eau apparaît au même déplacement chimique et donc subit le même effet de suppression que le signal de l'eau.

Un dernier point est à soulever lors du traitement des intégrales afin de les convertir en taux de fonctionnalisation. En observant les signaux RMN du PEI et du PEI-fonctionnalisé, nous constatons l'apparition des signaux dûs aux groupements greffés, mais également la superposition des signaux méthylène du PEI sur ceux du PEI fonctionnalisé. Nous avons donc travaillé avec l'hypothèse que le greffage était statistique. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de diffusion DOSY 2D. Dans cette expérience, à la manière d'une plaque de chromatographie en couche mince, il est possible de générer des cartes bidimensionnelles avec en abscisse une dimension fréquentielle qui correspond au spectre RMN ^{1}H, et en ordonnée une échelle de coefficients de diffusion. Ainsi, pour un mélange de composés, tous les signaux appartenant à un même type de molécules vont apparaître sous forme de taches dont l'ordonnée correspond au coefficient de diffusion caractéristique de la dynamique moléculaire d'ensemble de ce type de molécules. Dans notre cas, comme le PEI greffé est plus volumineux, plus lourd et possède une dynamique d'ensemble plus lente que celle du PEI commercial, les signaux des groupement méthylène caractéristiques du PEI commercial apparaissent sur la carte associés à un coefficient de diffusion différent de celui auquel sont associés les signaux méthylène du PEI greffé, et ceux des protons portés par les groupements greffés. Il est donc possible d'identifier facilement dans le massif des méthylènes de PEI ceux qui appartiennent au PEI modifié de ceux du PEI substrat. Il n'a pas été constaté dans les tests que nous avons réalisés de signaux associés au PEIcom. *A priori* il est également possible d'extraire ainsi sélectivement les signaux issus du PEI commercial de ceux du

PEI greffé et de ceux issus de l'eau et de l'étalon interne, à la manière d'une CCM préparative, mais ce traitement est plus long, nécessite plus de travail d'optimisation que la méthode WATERGATE, et en général le signal de l'eau saturant la détection, l'expérience est d'assez faible qualité, bien qu'il existe une version DOSY-WATERGATE de cette expérience que nous avons testée. Nous n'avons donc utilisé que l'aspect qualitatif de cette expérience pour montrer que l'hypothèse du greffage statistique était vérifiée (**Annexe**).

II-B) Gamme étalon et expériences de corrélations

Le polymère commercial, ou certains de ses dérivés, ont déjà été caractérisés par RMN ^{1}H dans $CDCl_3$,[16-20] mais pas dans l'eau à notre connaissance. Une gamme étalon a été réalisée pour le polymère commercial en utilisant la méthode WATERGATE décrite précédemment (**Figure III.3 A**). A l'aide de cette gamme étalon le dosage des échantillons a été réalisé. En parallèle, un échantillon de concentration connue et dosée par la gamme étalon permet de vérifier la justesse de la méthode. À titre comparatif, le même dosage a été effectué à l'aide d'une séquence « One-Pulse » *i.e* sans l'usage du module WATERGATE (**Figure III.3 B**). Nous constatons ainsi l'intérêt de la méthode utilisée en termes d'efficacité de dosage. En effet, avec la méthode WATERGATE l'incertitude sur la valeur de la concentration en polymère quantifiée par RMN ^{1}H est plus petite, nous sommes donc plus précis.

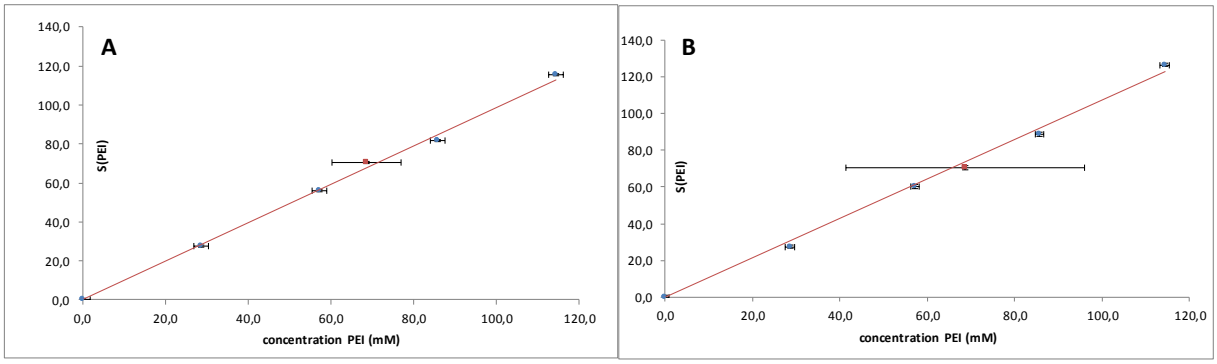


Figure III.3 : Gamme étalon avec WATERGATE (A) et sans WATERGATE (B), le point orange représente le tube témoin.

II-C) Quantification : étude cinétique

Les cinétiques de fonctionnalisation des différents composés ont d'abord été étudiées séparément. Les synthèses sont effectuées comme énoncées ci-dessus, et des aliquotes de la réaction sont prélevés à différents temps et mis dans des tubes RMN en présence d'un étalon interne (méthanol pour les groupements acide carboxylique et octyle ; acétonitrile pour les groupements guanidinium). Les expériences de quantification sont ensuite réalisées et répétées cinq fois pour chacun des aliquotes, puis chaque spectre RMN est intégré cinq fois. Les données sont insérées dans des tableaux statistiques afin d'en déduire pour chaque temps échantillonné le taux de greffage.

Nous avons commencé par étudier la cinétique de fonctionnalisation des groupements acide carboxylique. Une quantité d'acide carboxylique, correspondant à 0.1 équivalent par rapport à la concentration de polymère commercial en monomère ([mono]), est additionné sur le polymère, en solution dans le DMF. Des aliquotes sont prélevés à différents temps de la réaction (t= 0, 1, 10, 30 min., 1, 2, 4, 6, 24 et 48h), purifiés par dialyse et quantifiés par RMN ^{1}H. L'analyse ainsi effectuée par RMN montre que la réaction est achevée au bout d'une minute (**Figure III.4**).

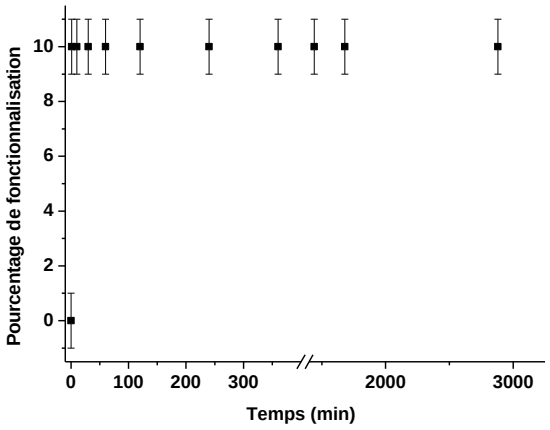


Figure III.4 : Cinétique de fonctionnalisation du PEI par l'acide carboxylique.

Nous observons en effet qu'au-delà d'une minute il n'y plus d'évolution des signaux du spectre RMN. L'intégration des signaux d'intérêt rapportée au signal de l'étalon interne permet de déterminer que le polymère est fonctionnalisé statistiquement à 10 ± 1 %, ce qui correspond à la valeur attendue, et donc à un rendement de la réaction quantitatif (**Figure III.5**).

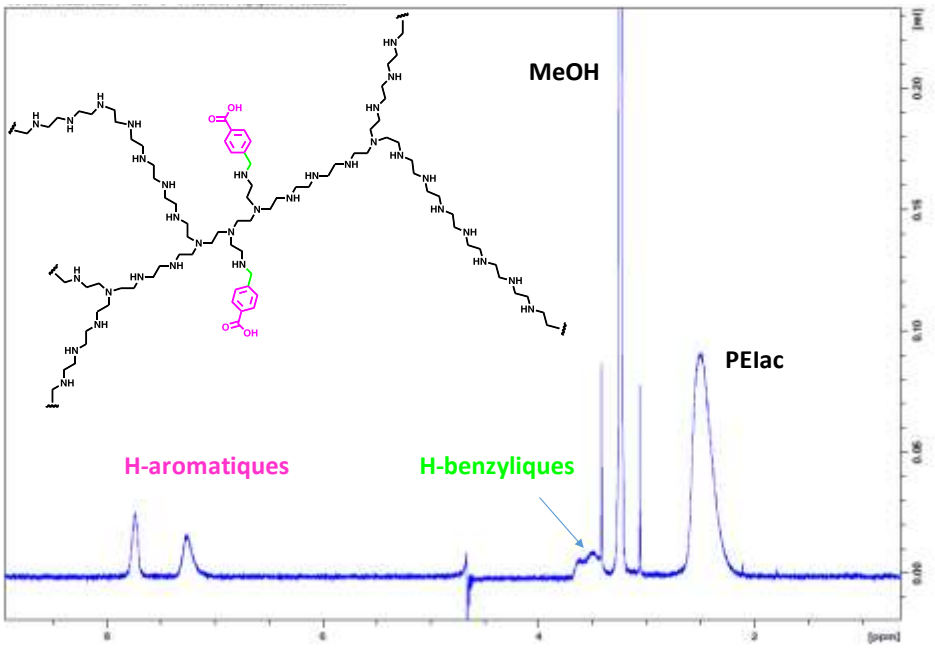


Figure III.5 : Exemple de spectre RMN ^{1}H à 400 MHz dans l'eau du polymère monofonctionnalisé par l'acide méthylbenzoïque (PEIac) en utilisant la méthode dite WATERGATE.

Compte-tenu de la rapidité de la réaction, nous avons considéré dans la suite des travaux que la durée de cette réaction de fonctionnalisation ne constituait pas un facteur limitant. Des études pour un nombre variable d'équivalents en acide permettraient de vérifier cette assertion et d'optimiser, si nécessaire, le temps de réaction pour des proportions en acide plus élevées.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la mono-fonctionnalisation du PEI par les groupements de type octyle. Nous avons choisi l'échantillon correspondant au greffage d'une quantité d'octyle égale à 0.4 équivalents de la quantité de monomère pour cette étude. Pour des concentrations plus élevées le polymère modifié précipite. Comme précédemment des aliquotes sont prélevés à différents temps (t = 2, 4, 6, 24 et 48h), dialysés, puis quantifiés par RMN. Les résultats obtenus sont résumés dans la **Figure III.6**.

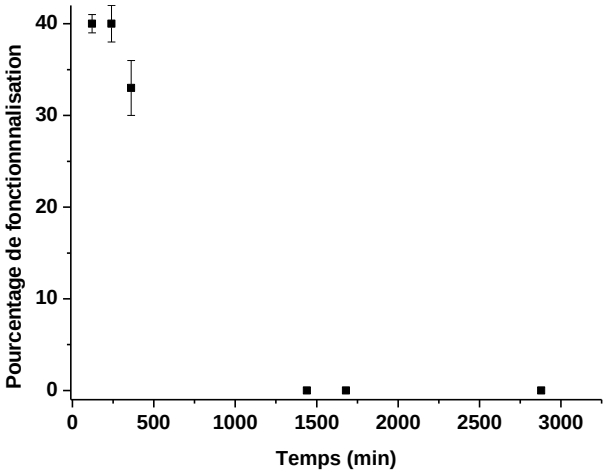


Figure III.6 : Cinétique de fonctionnalisation du PEI par les groupements octyle.

Nous observons que la réaction est achevée au bout de 2 heures. Lorsque nous laissons réagir plus longtemps, le PEI précipite doucement en solution, n'apparaissant plus sur le spectre RMN. L'intégration des signaux nous permet de déterminer un taux de fonctionnalisation statistique du PEI de 40 ± 3 %. Le rendement de la réaction est quantitatif (**Figure III.7**).

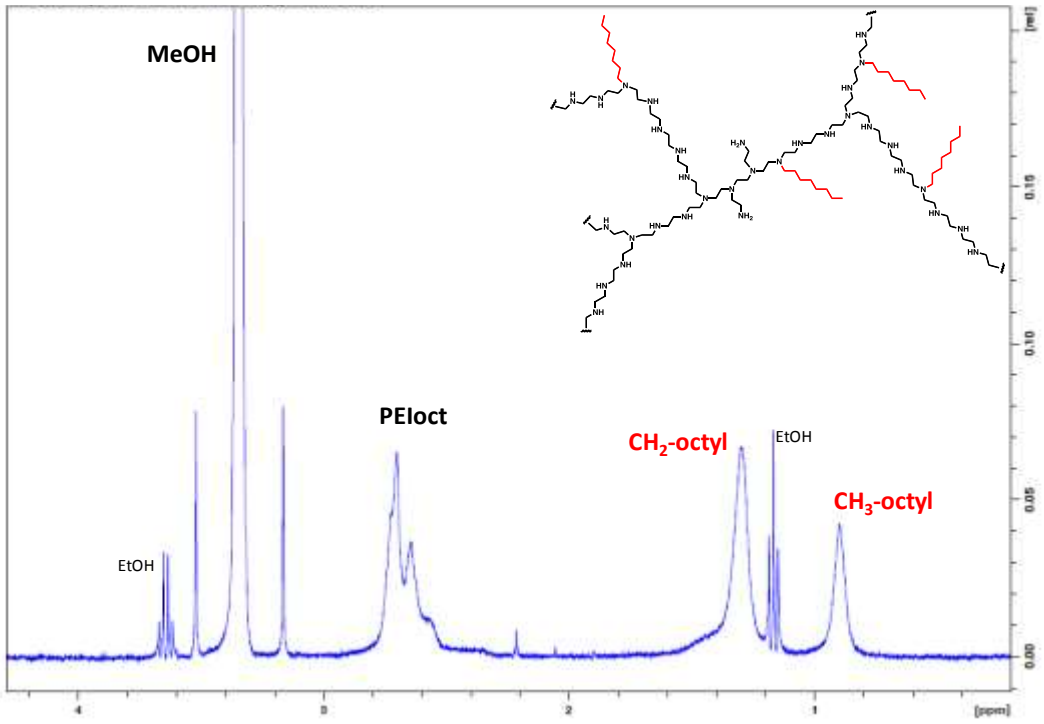


Figure III.7 : Exemple de spectre RMN ^{1}H à 400 MHz dans l'eau du polymère monofonctionnalisé par un groupement octyle (PEIoct) utilisant la méthode dite WATERGATE.

Enfin, nous terminons par l'étude de la cinétique de modification du polymère par des groupements de type guanidinium. Nous avons également choisi l'échantillon correspondant au greffage d'une quantité de guanidinium égale à 0.4 équivalents de la quantité de monomère pour cette étude. Les aliquotes sont prélevés à différents temps (t = 1, 30 min, 1, 2, 4 et 24h) dialysé puis quantifié par RMN ^{1}H. Les résultats sont reportés sur la **Figure III.8**. Dans ce dernier cas de figure, l'étalon interne a dû être changé. En effet, le signal du groupement méthyle du méthanol présente le même déplacement chimique que celui des protons des atomes de carbone portant les groupements guanidinium. Nous avons donc opté pour le remplacement du méthanol par de l'acétonitrile. (**Figure III.9**).

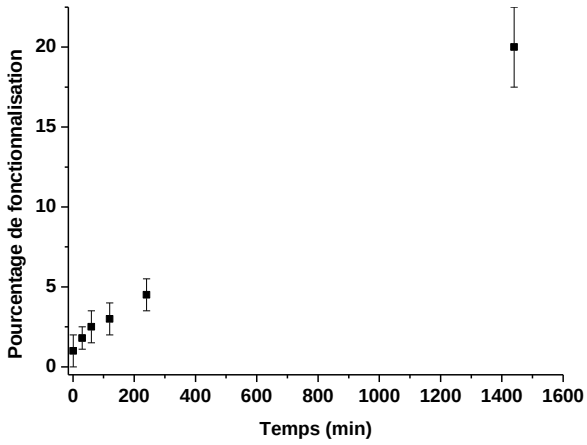


Figure III.8 : Cinétique de fonctionnalisation du PEI par des groupements guanidinium.

Nous observons que le PEI est fonctionnalisé statistiquement à 20 ± 2,5 % en 24 heures au lieu des 40 % escomptés idéalement, ce qui représente un rendement de 50 %. Ce résultat est vraisemblablement relié à la sélectivité de la réaction de guanidilation pour les amines primaires dont la proportion dans le polymère, qui est de 25 %,.

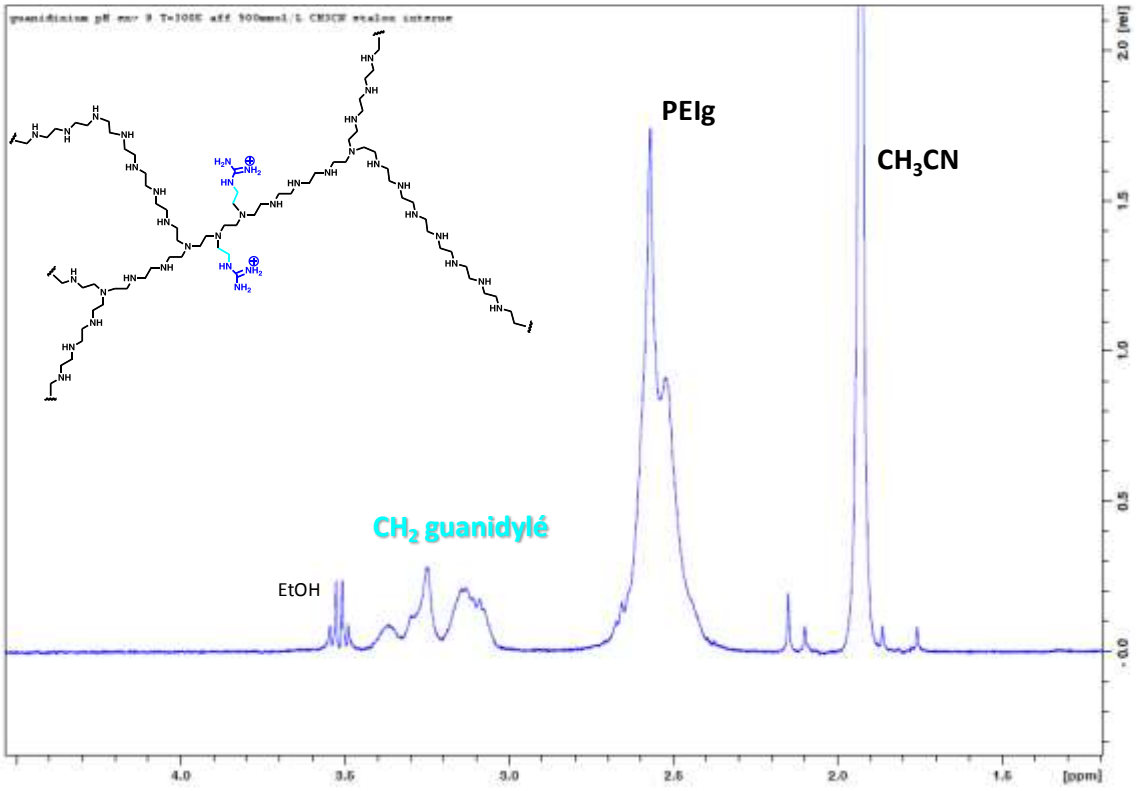


Figure III.9 : Exemple de spectre RMN ^{1}H à 400 MHz dans l'eau du polymère mono-fonctionnalisé par une fonction guanidinium (PEIg) en utilisant la méthode dite WATERGATE.

Les études cinétiques sur les polymères fonctionnalisés par deux groupements à la fois (PEIFg ou PEIFac) n'ont pas encore été réalisées, ce qui explique que nous avons préféré laisser les produits en réaction pendant cinq jours au cours des bi-fonctionnalisations de façon à ce que le temps ne soit pas un facteur limitant de la réaction. D'après nos premiers tests, il s'est effectivement avéré que les temps nécessaires aux fonctionnalisations à deux composantes sont en général plus grands qu'avec un seul composant. Toutefois, en nous basant sur les résultats cinétiques des mono-fonctionnalisations (24 heures pour les PEI-guanidylés, 2 heures pour les PEI-octylés) nous pouvons estimer que la durée complète pourrait être réduite de cinq à deux ou trois jours probablement, même en tenant compte du fait qu'un polymère mono-fonctionnalisé encombré est plus lent à être bi-fonctionnalisé.

II-D) Spectres typiques et quantification des PEIFg synthétisés

La synthèse des polymères fonctionnalisés à la fois par des groupements guanidinium et octyle (PEIFg), est réalisée avec différentes quantités de chacun des composants (**Tableau III.1,**

entrées 1 à 30). Nous avons souhaité créer une bibliothèque de polymères possédant des propriétés différentes grâce à leur fonctionnalisation. Pour cela, des PEIFg fonctionnalisés avec des quantités de guanidinium allant de 0.1 équivalent à 0.6 équivalent par rapport à la quantité de monomère en solution, et des quantités d'octyles allant de 0 à 2 équivalents ont été synthétisés. Pour plus de clarté, ces PEIFg seront désignés dans le reste de ce manuscrit par PEIFg, indexé par le numéro du polymère et la valeur quantifié par RMN ^{1}H du greffage en guanidinium et en octyle. Ces polymères ont ensuite été caractérisés par RMN ^{1}H par la méthode WATERGATE décrite précédemment et dont deux exemples de spectres sont présentés ci-dessous (**Figure III.10)**.

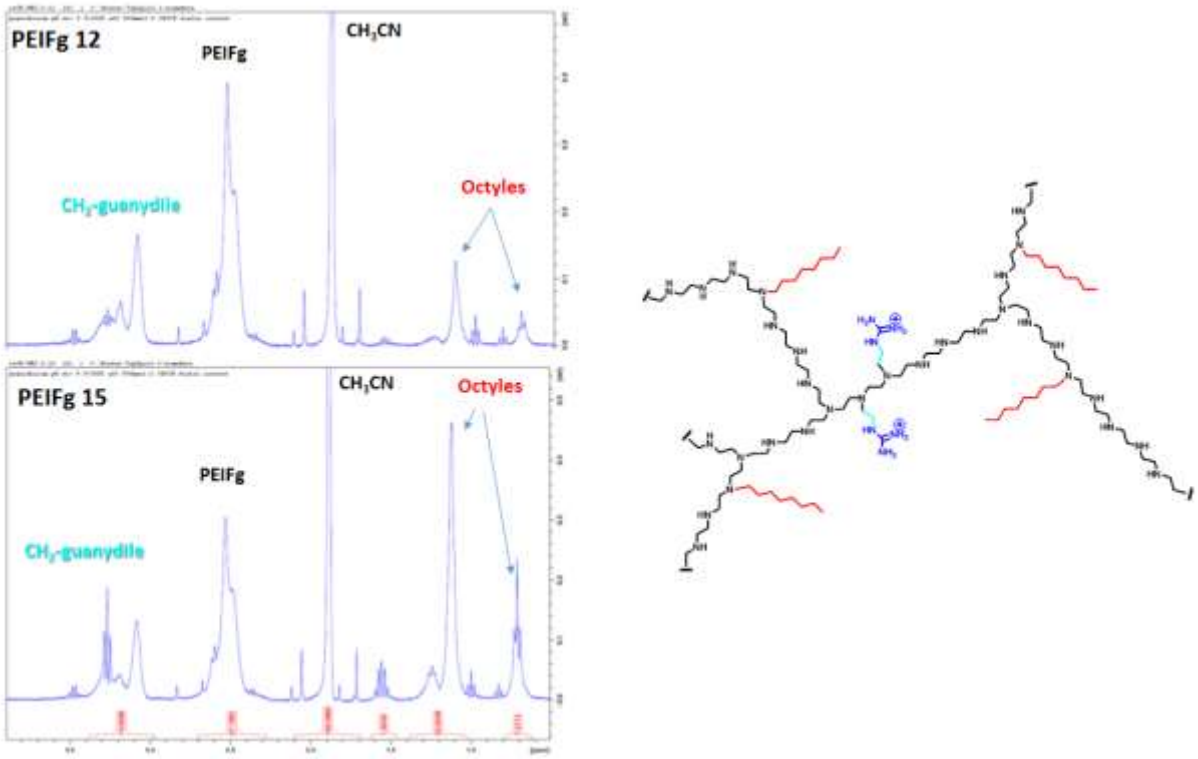


Figure III.10: Spectre RMN ^{1}H à 400 MHz dans l'eau des PEIFg 12 (en haut à gauche) et 15 (en bas à gauche) ainsi que le schéma général d'un PEIFg (à droite).

Les résultats des caractérisations obtenus pour les 30 polymères sont présentés dans le **Tableau III.2** et la **Figure III.11 A et B**. Ces résultats mettent en avant que les taux de greffage des polymères sont différents de ce que l'on aurait pu attendre d'après les résultats du paragraphe II.C, montrant que la réaction de mono-fonctionnalisation par des groupements octyle était quantitative, et que celle par des groupements guanidinium se faisait au mieux avec un rendement de 50%.

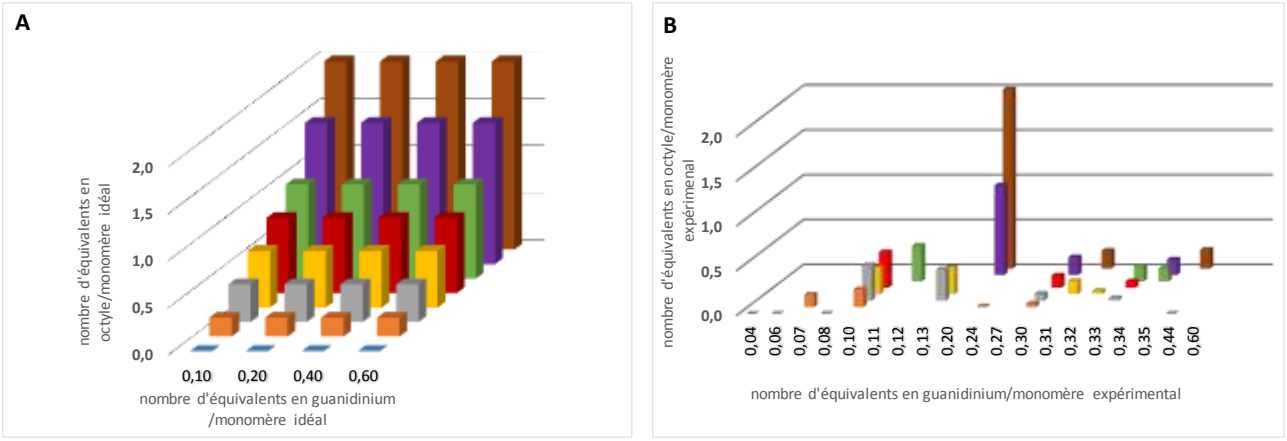


Figure III.11 : Graphiques représentant (A et B) la fonctionnalisation idéale des différents polymères, (C et D) la fonctionnalisation expérimentale de ces mêmes polymères quantifiée par RMN ^{1}H.

Tableau III.2 : Fonctionnalisation du polymère commercial idéale et expérimentale quantifiée par RMN ^{1}H.

Numéro polymère	Rapport idéal guanidinium/octyl vs [mono]	Rapport expérimental quantifié par RMN guanidinium/octyl vs [mono]	Numéro polymère	Rapport idéal guanidinium/octyl vs [mono]	Rapport expérimental quantifié par RMN guanidinium/octyl vs [mono]
1	0,10/0,00	0,04/0,00	16	0,40/0,20	0,30/0,04
2	0,10/0,20	0,10/0,20	17	0,40/0,40	0,30/0,08
3	0,10/0,40	0,10/0,40	18	0,40/0,60	0,31/0,15
4	0,10/0,60	0,10/0,30	19	0,40/0,80	0,30/0,14
5	0,10/0,80	turbide	20	0,40/1,00	0,33/0,17
6	0,10/1,00	turbide	21	0,40/1,50	0,30/0,20
7	0,20/0,00	0,06/0,00	22	0,40/2,0	0,31/0,20
8	0,20/0,20	0,07/0,14	23	0,60/0,00	0,44/0,00
9	0,20/0,40	0,13/0,35	24	0,60/0,20	0,24/0,01
10	0,20/0,60	0,13/0,30	25	0,60/0,40	0,33/0,03
11	0,20/0,80	0,10/0,40	26	0,60/0,60	0,32/0,04
12	0,20/1,00	0,11/0,4	27	0,60/0,80	0,33/0,07
13	0,20/1,50	0,20/1,00	28	0,60/1,00	0,34/0,15
14	0,20/2,00	0,20/2,00	29	0,60/1,50	0,34/0,18
15	0,4/0,00	0,08/0,00	30	0,60/2,00	0,35/0,20

Lorsqu'on étudie le taux de greffage effectif des groupements de type guanidinium, pour des greffages en groupements de type octyle donnés, nous observons que plus le taux de greffage en guanidinium est élevé et plus il est difficile d'atteindre le taux de greffage idéal (**Figure III.12 A**). Néanmoins, ces résultats sont assez proches de ce qu'on pouvait espérer en tenant compte du rendement du greffage observé lors de la mono-fonctionnalisation du PEI par les groupements guanidinium (50 %) (**Figure III.12 A (—)**), les taux de greffage expérimentaux étant en accord avec ces taux de greffage maximaux. Nous fonctionnalisons donc le polymère par des guanidinium au mieux de ce que la chimie peut permettre. Par ailleurs, nous observons sur la (**Figure III.12 B**), que plus on rajoute de groupements octyle, plus il y a de guanidinium greffés sur le polymère (sauf pour un point dans le cas du polymère PEIFg 23 (0.44/0.00)).Par ailleurs, en ce qui concerne le greffage des groupements octyle nous constatons que plus le taux de greffage idéal en octyle est élevé et plus il est difficile d'atteindre une fonctionnalisation maximale (**Figure III.12 C**). De plus, nous observons sur la **Figure III.12 D** que plus le nombre de groupements de type guanidinium est élevé sur le polymère et moins il est facile de positionner des groupements de type octyle sur celui-ci. Finalement, pour des taux de greffage en octyle élevé (> 1 équiv. *vs* [mono]), nous avons observé que les polymères précipitent en solution pour la série 1 (0,1 équiv. guanidinium). Par ailleurs, pour les séries 3 et 4 (0.4 et 0.6 équiv. de guanidinium), il est impossible de greffer plus de 20 % de groupements de type octyle sur le polymère. Notre interprétation est la suivante : à faible taux de guanidinium (série 1), le polymère peut être très hydrophobe et précipite en solution car le greffage en octyle n'est pas limitant. Au fur et à mesure que le taux de guanidinium augmente (série 2,3 et 4), leurs groupements cationiques vont contrebalancer l'effet hydrophobe et faciliter la stabilité en solution des polymères. Au-delà d'une concentration seuil en guanidinium autour de 30-40 %, la taille des groupements cationiques et leur charge ne permettent plus de laisser suffisamment de place aux groupements octyle et leur nombre reste faible. Tenons compte également du fait que les amines primaires et la moitié des amines secondaires ont peut-être déjà réagies et de ce fait, que la réaction n'est plus possible, excepté peut-être en forçant les conditions opératoires (chauffage par exemple).

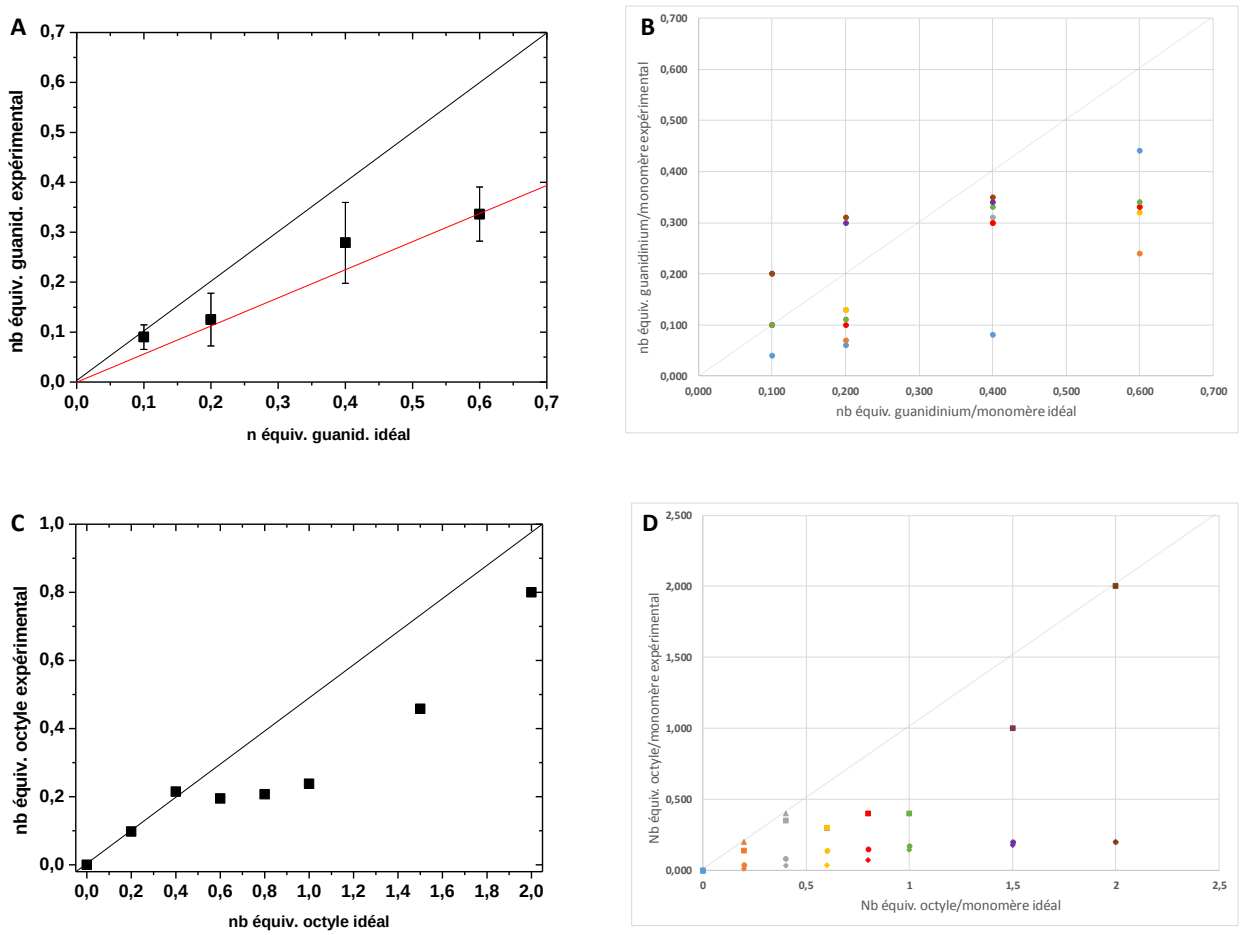


Figure III.12 : Concordance entre les fonctionnalisations idéales et expérimentales des PEIFg dans le cas du taux greffage (A) des groupements guanidinium sans prendre en compte les groupements octyle, (B) des groupements guanidinium en fonction des groupements octyle (0 équiv. (bleu), 0.2 équiv. (orange), 0.4 équiv. (gris), 0.6 équiv. (jaune), 0.8 équiv. (rouge), 1 équiv. (vert), 1.5 équiv. (violet), 2 équiv. (marron), (C) des groupements octyle sans prendre en compte les groupements guanidinium et (D) des groupements octyle (même code couleur) en fonction des groupements guanidinium (0,1 équiv. (▲), 0.2 équiv. (■), 0.4 équiv. (●), 0.6 équiv. (◆)).

Nous concluons donc qu'il n'a pas été possible de synthétiser l'ensemble des polymères de la composition prévue dans la bibliothèque originale. Un grand nombre de polymères a néanmoins été préparé. Nous avons mis en évidence que possiblement plusieurs d'entre eux sont chimiquement inaccessibles pour les raisons détaillées ci-dessus. Néanmoins, nous proposons ici quelques pistes à explorer pour éventuellement améliorer ces synthèses et accéder à de nouveaux polymères différemment greffés : i) suivi cinétique des polymères bifonctionnalisés ce qui permettra d'optimiser le temps de réaction, ii) injection de la base en flux continu, iii) utilisation d'autres bases organiques non nucléophiles comme la lutidine, ou autres.

III) Conclusion

Pour conclure ce chapitre, nous avons mis au point les conditions expérimentales nécessaires à l'application de deux méthodes RMN complémentaires utilisant les séquences DOSY et WATERGATE. La première permet de démontrer le greffage effectif des groupements sur les PEIF. La deuxième sert à quantifier le taux de fonctionnalisation des PEIF. Cette quantification est possible et validée grâce aux paramètres choisis, ainsi que par la réalisation de tests statistiques. Les synthèses de 46 polymères ont été réalisées ; le taux de greffage de 30 d'entre eux a été quantifié par RMN ^{1}H. Bien que le taux de greffage soit plus faible que celui idéalement escompté, nous avons obtenu une bibliothèque de PEIFg importante. Ces polymères sont disponibles pour la suite des expériences. Leur dénomination sera la suivante : par exemple le polymère modifié 1, dans le **Tableau III.2**, sera dénommé PEIFg 1 (0.10/0.00), 0.10 correspondant au greffage des groupements guanidinium et 0.00 à celui des groupements octyle. Le polymère de référence utilisé pour toutes les expériences de caractérisation sera appelé PEIFg (0.20/0.30).

Références

(1) Perreault, D. M.; Cabell, L. A.; Anslyn, E. V. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5* (6), 1209.
(2) Schug, K. A.; Lindner, W. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (1), 67.
(3) Avenier, F.; Domingos, J. B.; Van Vliet, L. D.; Hollfelder, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (24), 7611.
(4) Rouessac, F.; Rouessac, A.; Cruché, D.; Duverger-Arfuso, C.; Martel, A. *Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales*, Dunod.; 2009.
(5) Mendham, J.; Denney, R. C.; Barnes, J.; Thomas, M. *Analyse chimique quantitative de Vogel*, de boeck.; 2005.
(6) Ducauze, C. Chimie analytique, *Analyse chimique et chimiométrie : Concepts, démarche et méthodes*, Lavoisier.; 2014.
(7) http//www.sciences.univ-Nantes.fr\CEISAM\data\43\RMN-Chap9pdf.
(8) Fredon, D. *Statistique et probabilités pour les sciences de la vie et de la santé en 30 fiches*, Dunod.; 2008.
(9) Feinberg, M. *La validation des méthodes d'analyse : Une approche chimiométrique de l'assurance qualité au laboratoire,* Masson.
(10) Wu, D.; Chen, A.; Johnson, C. S. *J. Magn. Reson. A* **1995**, *115*, 265.
(11) Gozansky, E. K.; Gorenstein, D. G. *J. Magn. Reson. B* **1996**, *111*, 94.
(12) Stejskal, E. O.; Tanner, J. E. *J. Chem. Phys.* **1965**, *42* (1), 288.
(13) Adams, R. W.; Holroyd, C. M.; Aguilar, J. A.; Nilsson, M.; Morris, G. A. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (4), 358.
(14) Berger, S.; Braun, S. *200 and More NMR Experiments: A Practical Course*, Wiley-vch.; 2004.
(15) Liu, M.; Mao, X.; Ye, C.; Huang, H.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. *J. Magn. Reson.* **1998**, *132*, 125.
(16) Holycross, D. R.; Chai, M. *Macromolecules* **2013**, *46* (17), 6891.
(17) Idris, S. A.; Mkhatresh, O. A.; Heatley, F. *Polym. Int.* **2006**, *55* (9), 1040.
(18) Liu, L.; Zhou, W.; Chruma, J.; Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (26), 8136.
(19) Wang, Y.-Q.; Su, J.; Wu, F.; Lu, P.; Yuan, L.-F.; Yuan, W.-E.; Sheng, J.; Jin, T. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 693.
(20) Haimov, A.; Cohen, H.; Neumann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (38), 11762.

CHAPITRE IV

Chapitre IV : Synthèse des catalyseurs d'oxydation

Synthèse des ligands et des complexes mononucléaires de fer(III) et de fer(II)

Dans le but de mimer l'activité des enzymes mononucléaires à fer, nous avons décidé de synthétiser à la fois des complexes de fer(II) et fer(III). La réactivité des complexes de fer(II) avec H_2O_2 sera tout d'abord étudiée dans les solvants organiques et dans l'eau. L'utilisation de complexes de fer(II) pour réagir avec le peroxyde d'hydrogène est nécessaire car les complexes de fer(III) sont souvent coordinés par des atomes de chlore, ce qui diminue leur réactivité vis-à-vis d'H_2O_2 pour la catalyse de réactions d'oxydation. Par ailleurs, les complexes de fer(III) seront utilisés afin d'étudier leur réduction, puis leur réactivité avec O_2. Le but ultime étant de réaliser la catalyse de réactions d'oxydation dans l'eau par activation réductrice du dioxygène de l'air.

I-A) Synthèse des ligands

Nous avons choisi d'utiliser des ligands tétra-azotés de la famille N_2Py_2 avec deux pyridines portant différents groupes fonctionnels car ces ligands sont connus pour permettre la formation d'espèces à haut degré d'oxydation, limitant ainsi lors de la catalyse des réactions d'oxydation, la formation de produits secondaires provenant d'une chimie radicalaire. La synthèse des trois ligands BPMEN, BPMENméthoxy et BPMENG, dont la structure est présentée dans le **(Schéma IV.1)** a été menée à bien

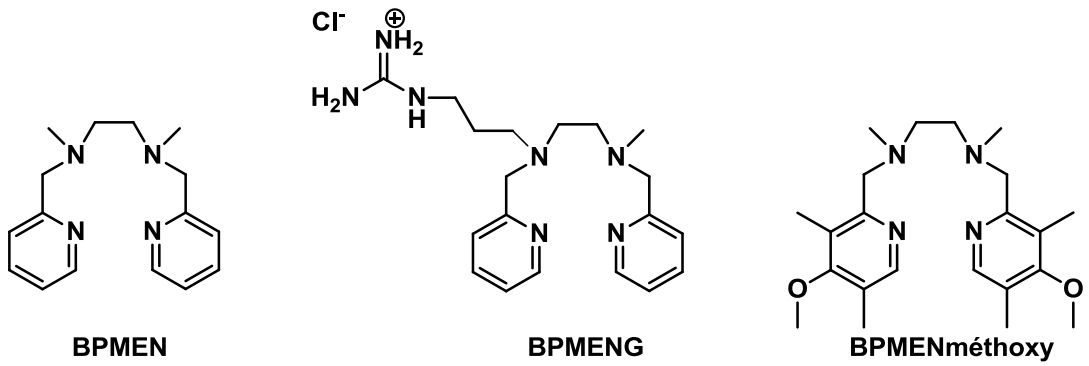


Schéma IV.1 : Structure des ligands utilisés pour la synthèse des complexes mononucléaires de fer.

Le ligand BPMEN, une fois synthétisé, sera complexé avec du fer(III) ou du fer(II) et utilisé comme complexe de référence. En effet, il est connu comme étant un des meilleurs catalyseurs mononucléaires à fer pour l'époxydation du cyclooctène. Le BPMENméthoxy a, quant à lui, été synthétisé pour étudier l'effet des groupements méthoxy sur la catalyse et sur la stabilisation d'intermédiaires de haute énergie du fer. Cependant, la publication d'études très similaires utilisant ce même ligand au cours de l'année 2014,[1] nous a poussés à interrompre nos travaux à son sujet. Enfin, le ligand BPMENG a été synthétisé avec un bras guanidinium pour permettre, une fois complexé, son insertion dans le polymère portant des fonctions carboxylate (PEIFac) grâce à des interactions ioniques entre la fonction guanidinium et les groupements carboxylate.

Les ligands BPMEN et BPMENméthoxy sont synthétisés suivant un protocole décrit dans la littérature et présenté dans le **Schéma IV.2**.[1,2,3] Leur synthèse se fait en une étape par substitution nucléophile des atomes de chlore des deux pyridines par les deux atomes d'azote de la N,N'-diméthyléthylènediamine pour former les ligands correspondants avec des rendements de 80 % en 24 heures.

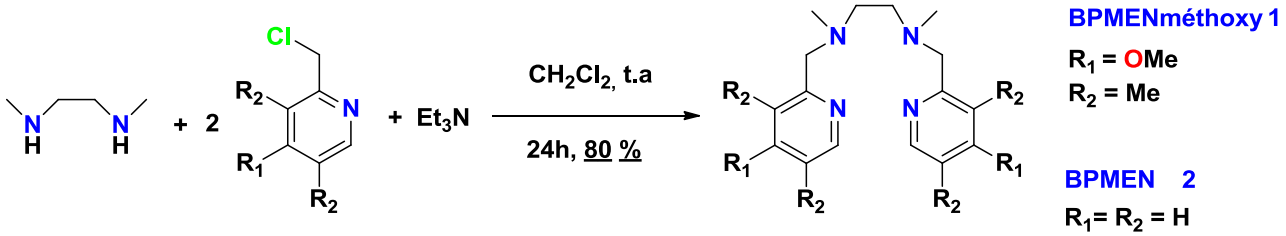


Schéma IV.2 : Schéma de synthèse des ligands BPMEN et BPMENméthoxy.

La synthèse du ligand BPMENG est, quant à elle, adaptée de la synthèse du composé **5** déjà décrite dans la littérature (**Schéma IV.3**).[4]

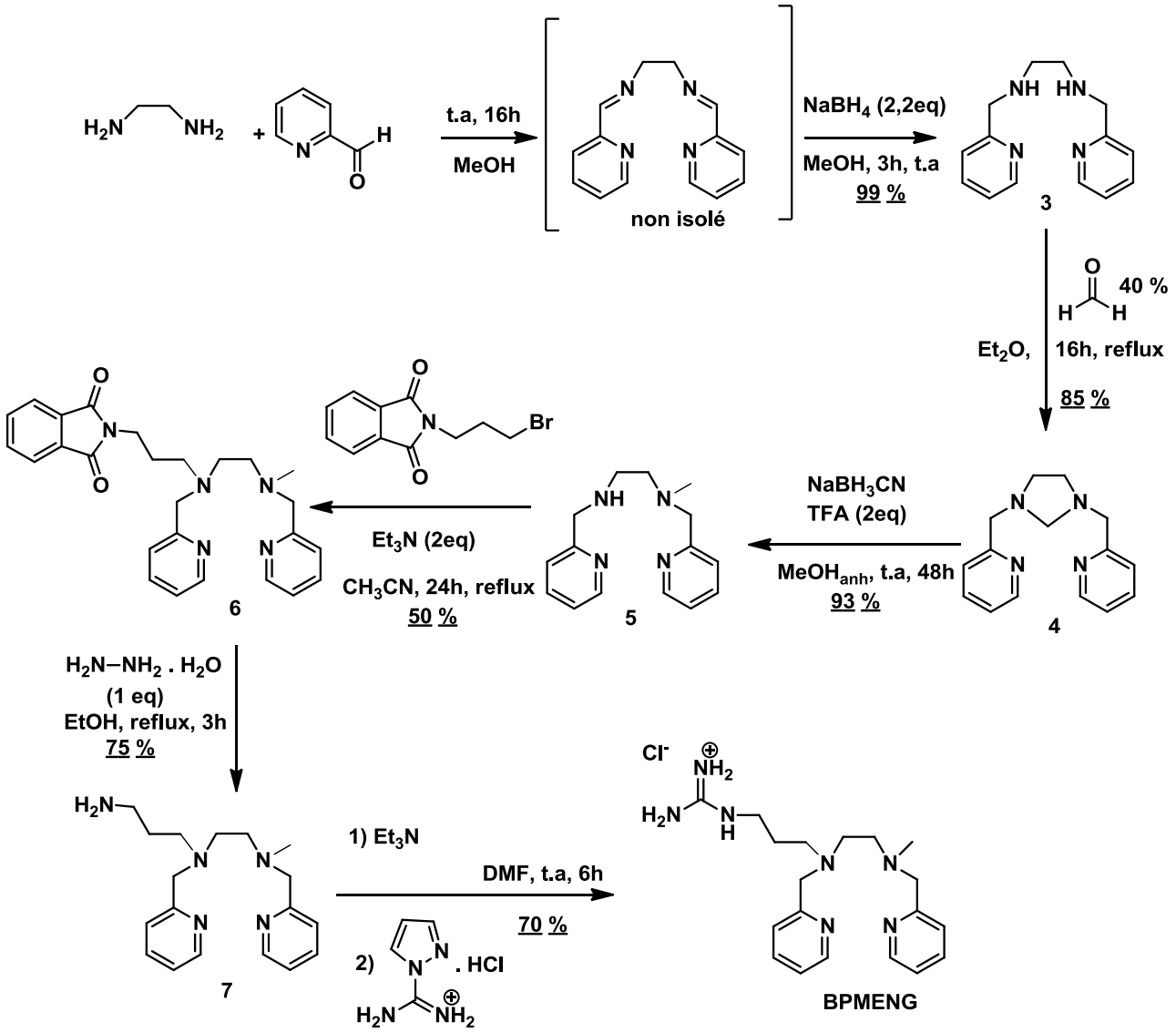


Schéma IV.3 : Schéma de synthèse du ligand BPMENG.

La première étape est la condensation de l'éthylènediamine sur la 2-pyridine carboxaldéhyde, formant un produit non isolé durant la synthèse qui, après réduction par $NaBH_4$, donne le composé **3** avec un rendement de 99 %. Ce produit, dans une deuxième étape, est cyclisé en présence de formaldéhyde pour donner le composé **4** avec un rendement de 85 %, puis l'ouverture du cycle par des ions hydrure, suivie d'une protonation, forme le composé disymétrique **5** avec un rendement de 93 %. En présence de bromopropylphtalimide, le composé **5** réalise une substitution nucléophile conduisant au produit **6** qui est une amine protégée. C'est l'étape difficile de cette synthèse, dont l'optimisation n'aboutit qu'à un rendement de 50 %. La déprotection est réalisée en présence d'hydrazine, donnant le composé portant la fonction amine libre correspondant **7** avec un rendement de 75 %. L'amine primaire est ensuite guanidilée par réaction avec le pyrazole en présence de base pour donner le ligand final **BPMENG** avec un rendement de 70 %. En conclusion, le ligand BPMENG est synthétisé en 6 étapes avec un rendement global de 20 %. L'étape limitante de cette synthèse est le greffage de la branche amine primaire protégée sous

la forme d'un phtalimide. Ces trois ligands ont été caractérisés par Spectrométrie de Masse Haute Résolution à ionisation electrospray (ESI-MS HR), par RMN ^{1}H ainsi que par RMN ^{13}C pour le BPMENG.

I-B) Synthèse et caractérisation des complexes mononucléaires de fer

I-B-1) Complexes de fer(III)

La synthèse se fait de la même façon pour tous les complexes. La source de fer(III) utilisée, qui est la seule variable de cette synthèse, est ajoutée goutte à goutte à une solution du ligand dans le méthanol, puis le complexe résultant est précipité par ajout d'une grande quantité d'éther ou une solution de KPF_6 dans le méthanol. Les poudres obtenues sont ensuite recristallisées. Le complexe $[Fe^{III}(BPMEN)Cl_2]PF_6$ est obtenu à partir de $FeCl_3$, puis est précipité avec KPF_6 avec un rendement quantitatif. La poudre obtenue est solubilisée dans l'acétonitrile puis recristallisée par diffusion d'éther avec un rendement de 50 %. Les complexes $[Fe^{III}_2(\mu\text{-}oxo)(BPMENméthoxy)_2Cl_2](CHCl_3)_4Cl_2$ et $[Fe^{III}_2(\mu\text{-}oxo)(BPMENG)_2Cl_2]Cl_4$ sont préparés respectivement à partir de $FeCl_3$ et de $Fe(ClO_4)_3$ dans le méthanol, puis précipités avec de l'éther. La poudre obtenue est solubilisée, soit dans le chloroforme pour $[Fe^{III}_2(\mu\text{-}oxo)(BPMENméthoxy)_2Cl_2](CHCl_3)_4Cl_2$ et recristallisée par diffusion de pentane, soit dans MeCN pour $[Fe^{III}_2(\mu\text{-}oxo)(BPMENG)_2Cl_2]Cl_4$ puis solubilisée et recristallisée par diffusion d'éther, avec des rendements respectifs de 46 % et 6 %. Le très faible rendement obtenu pour la recristallisation du complexe $[Fe^{III}_2(\mu\text{-}oxo)(BPMENG)_2Cl_2]Cl_4$ peut s'expliquer par la présence de six atomes de chlore dans la structure du dimère, alors que l'on utilise une source de fer à base de perchlorate. Ces complexes ont été caractérisés par diffraction des rayons X et par spectrométrie de masse (ESI-MS HR). Les structures obtenues sont présentées dans la **Figure IV.1**.

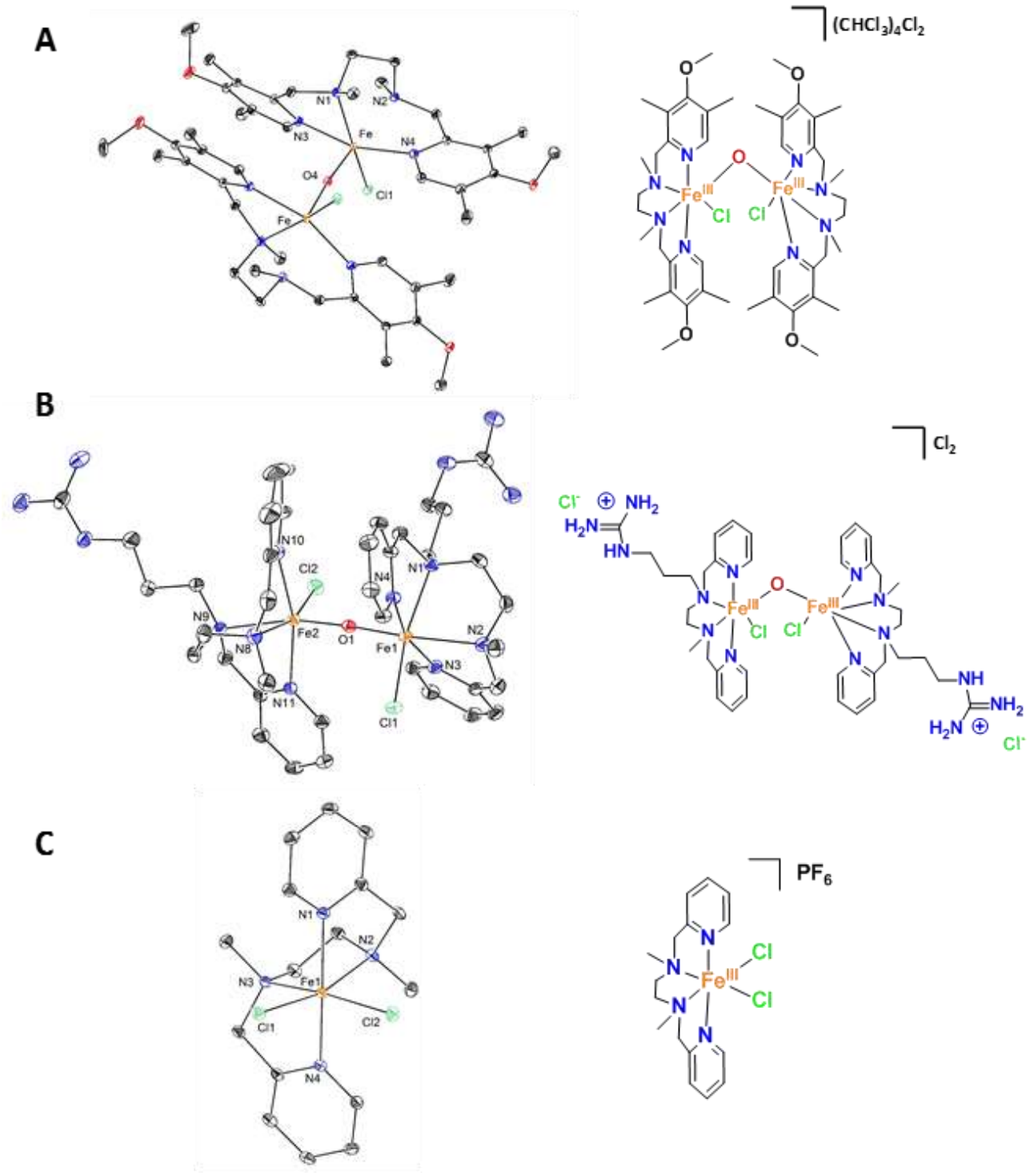


Figure IV.1 : Diagrammes ORTEP (à 30 % de probabilité) des complexes de fer(III) (à gauche) associés à leur représentation schématique (à droite) ; (A) est le complexe $[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENméthoxy)_2Cl_2](CHCl_3)_4Cl_2$, (B) est le complexe $[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENG)_2Cl_2]Cl_4$ et (C) est le complexe $[Fe^{III}(BPMEN)Cl_2]PF_6$. Les anions et les molécules de solvants ont été omis pour plus de clarté.

Un seul complexe cristallise sous la forme d'un complexe mononucléaire : $[Fe^{III}(BPMEN)Cl_2]PF_6$. Les deux autres complexes, quant à eux, ont cristallisé sous la forme de dimères de fer(III) pontés par un ion μ-oxo. Les principaux paramètres structuraux à 100 K ainsi que les tableaux regroupant l'ensemble des paramètres pour chacune des trois structures sont disponibles en **Annexes**. Toutefois, il est utile de préciser que les complexes A et B reliés par un pont μ-oxo sont hautement symétriques avec des distances Fe-N de 2,20 Å pour les deux atomes de fer caractéristiques d'une espèce fer(III) haut spin. Pour finir, le complexe C, possède des distances Fe-N d'environ 2,18 Å caractéristiques d'un complexe fer(III) haut spin.[5,6] Le complexe $[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENG)_2Cl_2]Cl_4$ a aussi été caractérisé par spectrométrie de masse ESI-MS HR (**Figure IV.2**). Cependant, on observe majoritairement le ligand seul à m/z = 356,2544, ce qui met en évidence une probable dé-complexation du métal dans la source du spectromètre de masse, même si le pic caractéristique du complexe di-chargé est visible à m/z = 205,5906 avec une réduction de fer(III) en fer(II) dans le spectromètre. En effet, il est assez courant que des complexes de Fe(III) soient réduits lors de leur exposition à une source d'ionisation de type electro-spray.[7] Ce spectre de masse nous conforte dans l'idée de l'obtention du complexe $[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENG)_2Cl_2]Cl_4$.

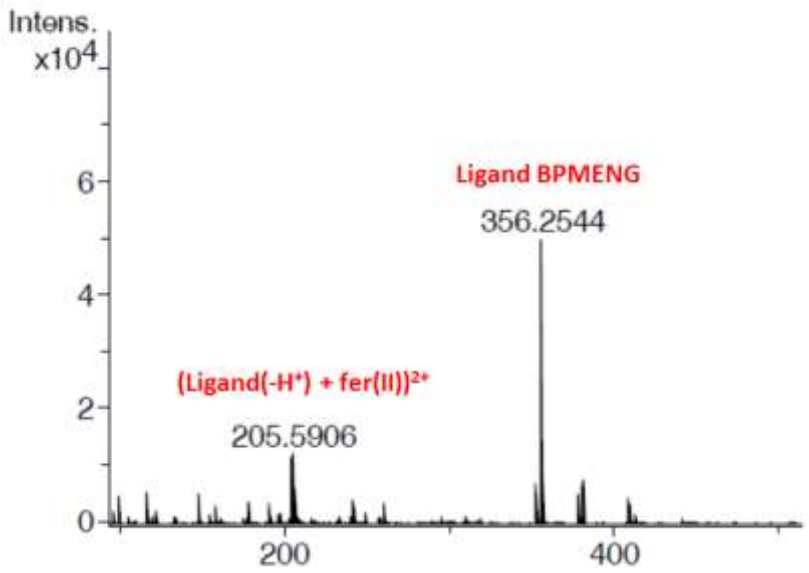


Figure IV.2 : Spectre de masse ESI-MS HR réalisé sur une solution issue des cristaux de $[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENG)_2Cl_2]Cl_4$.

I-B-2) Complexes de fer(II)

Tous les complexes de fer(II) sont synthétisés en boîte à gants, à partir des ligands déjà présentés ci-dessus et de $FeCl_2$. Le complexe de fer(II) formé à partir du ligand BPMEN a été préparé d'après la littérature et le complexe avec le ligand BPMENG a été obtenu dans les mêmes conditions.[8,9] Le ligand BPMENG est solubilisé dans du méthanol, puis une solution de $FeCl_2$ dans un mélange MeCN/eau (9:1) est additionnée goutte à goutte. Le complexe ainsi formé précipite en solution et est filtré. Il est par la suite recristallisé dans MeCN par diffusion d'éther, et le complexe

$[Fe^{II}(BPMENG)Cl_2]Cl$ est obtenu avec un rendement de 38 % en cristaux. Il est ensuite mis en suspension dans MeCN, en présence de $AgSbF_6$; AgCl précipite, ce qui permet le remplacement des deux ions chlorure coordinés à l'atome de fer par deux molécules d'acétonitrile. Après filtration, le complexe $[Fe^{II}(BPMENG)(CH_3CN)_2](SbF_6)_3$ obtenu est précipité par diffusion d'éther. Le rendement en cristaux pour le complexe $[Fe^{II}(BPMEN)(CH_3CN)_2](SbF_6)_2$ est de 30 % alors que le rendement en précipité pour le complexe $[Fe^{II}(BPMENG)(CH_3CN)_2](SbF_6)_3$ est de 20 %. Ces faibles rendements peuvent s'expliquer par la difficulté d'obtenir un produit propre après filtration, à cause de la présence de sels d'$AgSbF_6$ en solution dans MeCN, qui perturbent les recristallisations. La synthèse des complexes de fer(II) est plus contraignante. Cependant, cela nous permet d'obtenir des espèces plus réactives avec H_2O_2, grâce à la présence d'acétonitrile à la place des ions chlorure. Les complexes synthétisés sont représentés **Schéma IV.4**. Le ligand BPMENméthoxy a été écarté de nos études par souci de gain de temps, pour concentrer les études sur une comparaison entre les complexes obtenus à partir de BPMEN et de BPMENG.

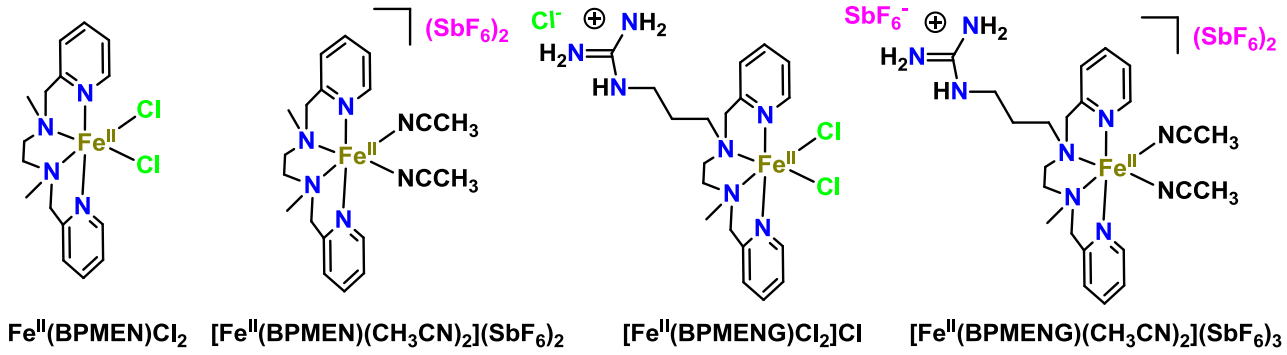


Schéma IV.4 : Structure des complexes de fer(II) synthétisés.

Les complexes $[Fe^{II}(BPMEN)(CH_3CN)_2](SbF_6)_2$, $Fe^{II}(BPMEN)Cl_2$ et $[Fe^{II}(BPMENG)Cl_2]Cl$ ont été caractérisés par spectroscopie de diffraction des rayons X et par spectrométrie de masse ESI-MS HR. Le complexe $[Fe^{II}(BPMENG)(CH_3CN)_2](SbF_6)_3$ quant à lui, n'a pas pu être recristallisé et a été caractérisé par analyse élémentaire et spectrométrie de masse ESI-MS HR. Les complexes contenant le ligand BPMEN sont entièrement décrits dans la littérature et ne seront donc pas décrits ici, mais seulement en annexe. La structure par diffraction des rayons X du complexe $[Fe^{II}(BPMENG)Cl_2]Cl$ est présentée ci-dessous (**Figure IV.3**), ainsi que les spectres de masse de ce complexe et du complexe $[Fe^{II}(BPMENG)(CH_3CN)_2](SbF_6)_3$ (**Figure IV.4**).

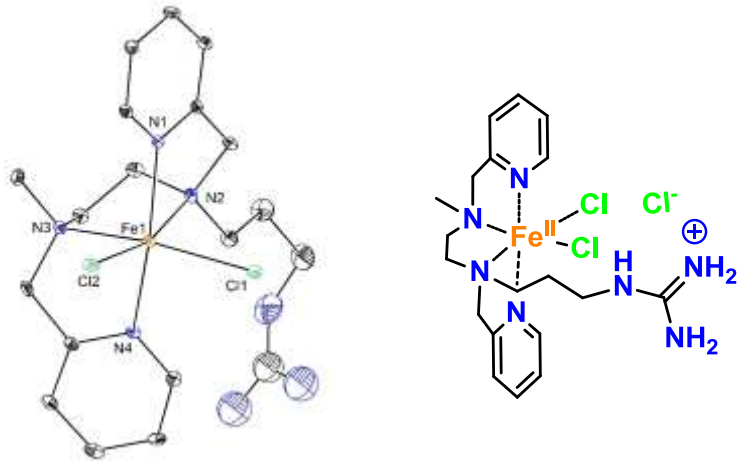


Figure IV.3: Diagramme ORTEP (à 30 % de probabilité) du complexe [Fe^{II}(BPMENG)Cl$_2$]Cl. Les anions et les molécules de solvants ont été omis pour plus de clarté.

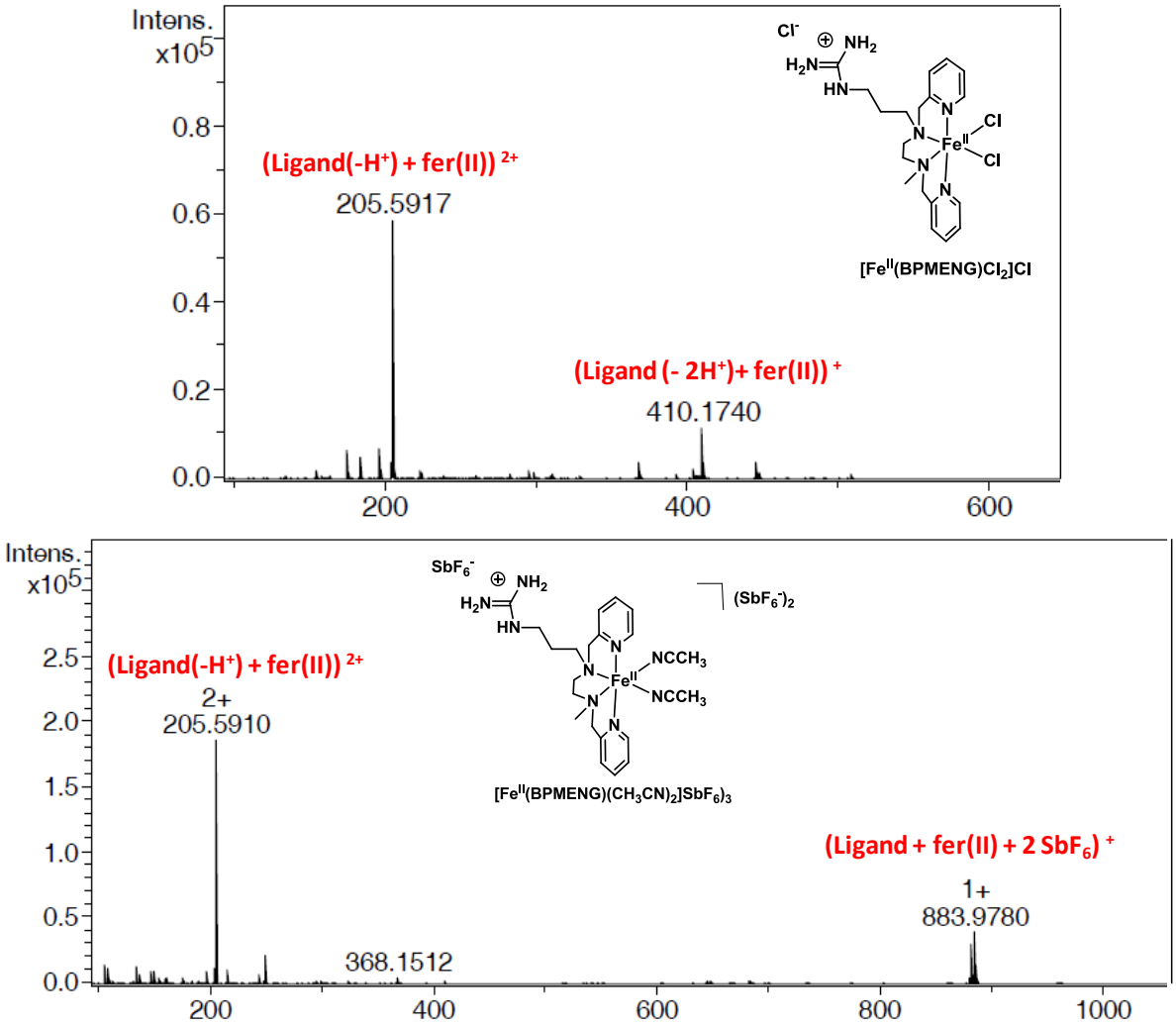


Figure IV.4 : Spectres de masse ESI-MS HR des complexes [Fe^{II}(BPMENG)Cl$_2$]Cl (en haut) et [Fe^{II}(BPMENG)(CH$_3$CN)$_2$](SbF$_6$)$_3$ (en bas).

Les distances Fe-N d'environ 2,20 Å pour le complexe $[Fe^{II}(BPMENG)Cl_2]Cl$ sont caractéristiques d'un complexe fer(II) haut spin.[5, 6] En spectrométrie de masse, le pic principal à m/z = 205,5906 correspond au complexe dichargé où le fer(II) est coordiné par le ligand déprotoné une fois et sans les atomes de chlore ($[ligand(-H^+) + fer(II)]^{2+}$), le deuxième pic à m/z = 410,1740 correspond à ce même complexe monochargé avec le ligand déprotoné deux fois. Pour le complexe $[Fe^{II}(BPMENG)(CH_3CN)_2]$ $(SbF_6)_3$, le pic principal à m/z = 205,5906 correspond au même complexe dichargé que dans le spectre de masse précédent, et le pic à m/z = 883,9780 correspond par contre au complexe monochargé avec deux ions SbF_6^- $[ligand + fer(II) + 2\ SbF_6]^+$). L'analyse élémentaire réalisée sur ce complexe est donnée dans le **Tableau IV.1**.

Tableau IV.1 : Analyse élémentaire du complexe $[Fe^{II}(BPMENG)(CH_3CN)_2](SbF_6)_3$ supposé.

		% expérimental	% théorique	Formule de l'espèce
Complexe synthétisé à partir de $Fe^{II}(BPMENG)Cl_2$	C	24,01	24,05	$C_{28}H_{49}FeN_8O_2F_{18}Sb_3$ M= 1234 g.mol^{-1}
	H	3,37	3,31	
	N	8,6	8,97	

Cette analyse nous suggère la présence d'une molécule de MeCN et d'une molécule d'AcOEt sur le fer. La présence de l'acétate d'éthyle pourrait être issue des conditions de recristallisation utilisées. Le complexe isolé semble donc être finalement le suivant $[Fe^{II}(BPMENG)(CH_3CN)(AcOEt)](SbF_6)_3$.

I-B-3) Autre complexe de Fe(II) synthétisé

En parallèle de ces recherches, le complexe $[Fe^{II}(BPMEN)(CH_3CN)_2](SbF_6)_2$ a pu être utilisé pour synthétiser un mime du site actif de l'ACC oxydase, enzyme responsable de la production d'éthylène chez les plantes, le complexe $[Fe^{II}(BPMEN)ACC]SbF_6$, qui a été cristallisé et caractérisé par spectrométrie de masse ESI-MS HR et par diffraction des rayons X (**Figure IV.5**).[10] Les longueurs des distances de la première sphère de coordination sont décrites dans le **Tableau IV.2**.

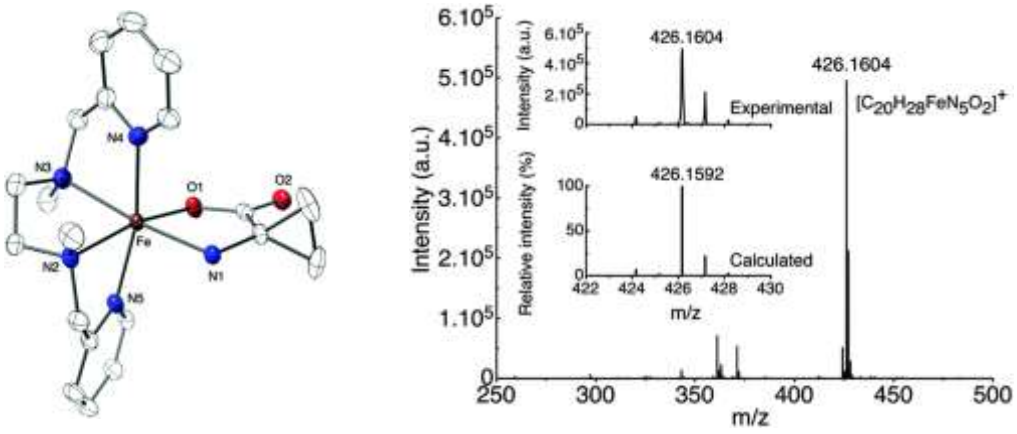


Figure IV.5: Diagramme ORTEP et spectre de masse ESI-MS HR du complexe [Fe^{II}(BPMEN)ACC] SbF_6.[10]

Tableau IV.2 : Distances Fe-N et angles entre les atomes de N, Fe et O de la première sphère de coordination du complexe [Fe^{II}(BPMEN)$(CH_3CN)_2$]$(SbF_6)_2$.[10]

	Bond length (Å)		Angle (°)
Fe-N1	2.203(2)	O1-Fe-N1	79.89(8)
Fe-N2	2.232(2)	O1-Fe-N4	96.69(9)
Fe-N3	2.242(3)	O1-Fe-N3	103.04(9)
Fe-N4	2.203(2)	O1-Fe-N5	93.35(8)
Fe-N5	2.211(2)	N1-Fe-N4	96.08(9)
Fe-O1	2.0164(19)	N1-Fe-N2	97.74(8)
		N1-Fe-N5	93.18(8)

Le complexe est hexaccordiné comme le montre sa structure par diffraction des rayons X, et les distances Fe-N de l'ordre de 2.2 Å sont en accord avec une espèce fer(II) haut spin.[5, 6] Le pic observé à m/z = 426,1592 par spectrométrie de masse correspond au complexe (Fe^{II})BPMEN ayant également coordiné une molécule d'ACC comme ligand du fer. En présence de H_2O_2, ce complexe est capable de produire de l'éthylène avec un rendement supérieur de 7 % à celui obtenu lorsque le ligand ACC réagit en solution avec H_2O_2 en présence de Fe$^{II}ClO_4$ comme catalyseur. Cette faible réactivité provient essentiellement du fait que le complexe est hexacoordiné et par conséquent, la décoordination d'un ligand est nécessaire pour permettre l'entrée de H_2O_2 dans la sphère de de coordination du métal pour former le complexe peroxo du fer responsable de la production d'éthylène.

Des exemples à base de complexes binucléaires de fer[11] ainsi que de complexes mononucléaires de cuivre[12,13] impliquant un ligand ACC avaient déjà été synthétisés, et récemment, un complexe de fer pentacoordiné, possédant une activité catalytique plus importante pour la production d'éthylène a été décrit.[14] Néanmoins, le complexe [Fe^{II}(BPMEN)ACC]SbF_6 préparé ici constitue le premier modèle fonctionnel d'ACCO à base de complexe mononucléaire de fer décrit dans la littérature (**Figure IV.5**).[10]

II) Synthèse de ligands homoditopiques pour la synthèse de complexes binucléaires de fer(III)

Il existe de très nombreuses études décrites concernant des complexes de fer comportant un ligand BPMEN. Ces études portent aussi bien sur la caractérisation d'intermédiaires à haut degré d'oxydation, que sur la catalyse de réactions d'oxydation de différents substrats. Cependant, aucun ligand homoditopique constitué d'unités BPMEN n'a été synthétisé à notre connaissance. Nous avons donc envisagé de réaliser la synthèse de ligands homoditopiques à partir de ligands BPMEN pontés par une chaîne propyle ou hydroxypropyle (**Schéma IV.5**).

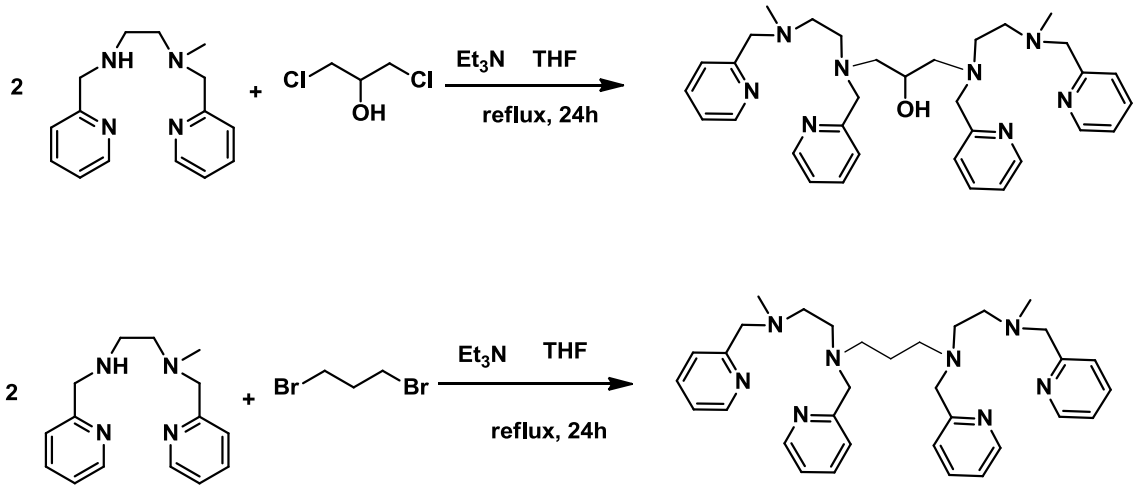


Schéma IV.5 : Voies de synthèse proposées pour deux nouveaux ligands binucléaires.

Les produits désirés n'ont jamais pu être observés, ni par spectrométrie de masse ESI-MS HR, ni par RMN ^{1}H, malgré de nombreux tests d'optimisation (solvants, températures et temps). Plusieurs raisons peuvent être invoquées pour expliquer ces résultats, telles que la mauvaise réactivité des amines secondaires déjà très encombrées ou la formation de composés cycliques, issus d'une réaction intramoléculaire plus favorable.

III) Synthèse des ligands porphyriniques et des complexes métalliques correspondants

III-A) Synthèse des porphyrines base libre

Deux ligands de type *méso*-tétraarylporphyrine ont été synthétisés suivant la méthode décrite par Adler et Longo (**Schéma IV.6**), [15,16] la *méso*-5,10,15,20-tétrapyridinylporphyrine (TPyP), et la *méso*-5,10,15,20-tétra-2,6-dichloropyridinylporphyrine (TDCPyP).

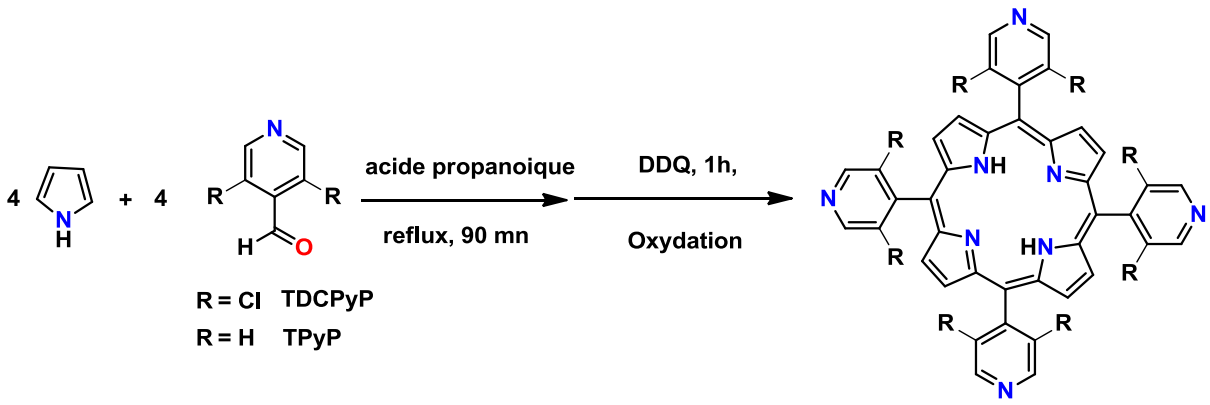


Schéma IV.6 : Voie de synthèse des ligands porphyriniques.

Au cours de cette synthèse, l'aldéhyde est activé en milieu acide propionique et le pyrrole réalise une addition nucléophile sur l'aldéhyde pour donner l'alcool correspondant. Après protonation et départ d'une molécule d'eau, le carbocation formé subit une attaque nucléophile d'un deuxième pyrrole. Cette réaction est répétée 4 fois pour conduire à un oligomère tétra-pyrrolique α-substitué qui se cyclise en milieu acide pour former le porphyrinogène qui, après oxydation en présence de DDQ, permet l'obtention du ligand porphyrinique aromatique. Les ligands TPyP et TDCPyP ont été obtenus après purification avec des rendements respectifs de 7 % et moins de 1 % avant d'être caractérisés par spectrométrie de masse ESI-MS HR et RMN ^{1}H. Concernant le ligand TDCPyP, un rendement supérieur aurait sans doute pu être obtenu par la méthode de Lindsey dont l'efficacité a été montrée pour la synthèse de porphyrines possédant des substituants *méso*-chlorophényle.[17,18]

III-B) Synthèse des complexes de porphyrines.

Le mauvais rendement de la synthèse du ligand TDCPyP ne nous a pas permis de réaliser une réaction de complexation. En revanche, la complexation du fer dans le ligand porphyrinique TPyP a pu être réalisée (**Schéma IV.7**).[19,20]

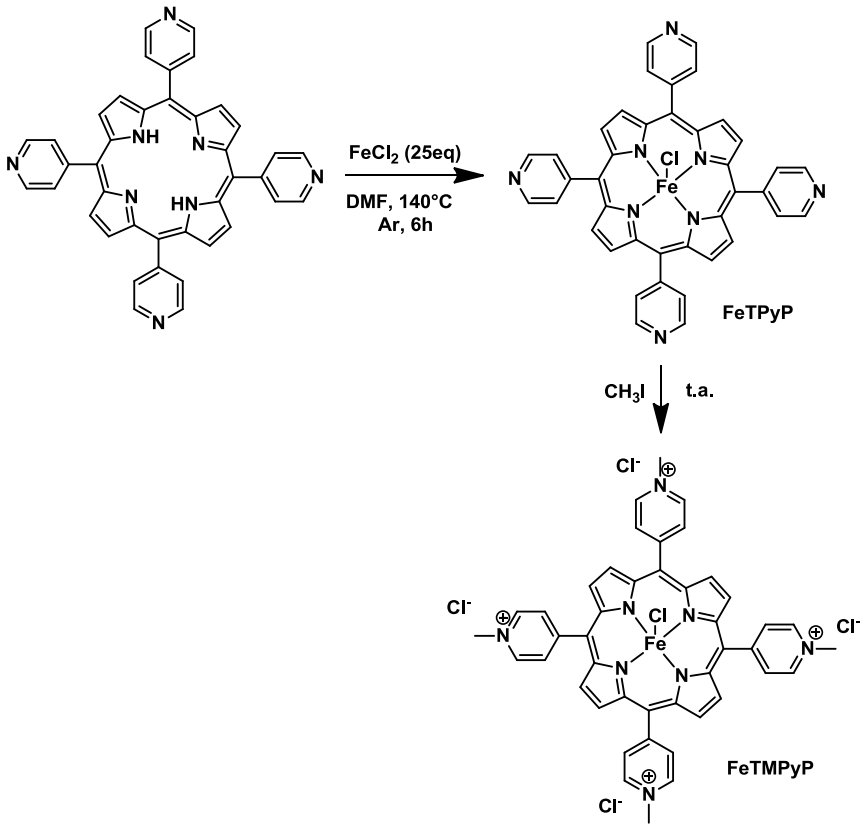


Schéma IV.7 : Synthèse des complexes Fe^{III}TPyP et Fe^{III}TMPyP

Le ligand TPyP est complexé par un sel de fer(II), $FeCl_2$, sous argon, dans le DMF à reflux, pendant 24 heures. L'utilisation de sels de fer(II) est nécessaire car les sels de fer(III) sont plus difficiles à incorporer dans la porphyrine. Cette complexation est difficile, et une fois réalisée, la porphyrine est laissée à l'air libre pour oxyder le fer(II) en fer(III). Le complexe Fe^{III}TPyP est synthétisé avec un rendement de 53 % sous la forme d'une poudre violette. A partir de ce complexe, la synthèse d'un deuxième complexe soluble dans l'eau est possible, par méthylation des pyridines en présence d'iodure de méthyle. Après 24 heures le produit est précipité dans de l'acétone, avant d'être filtré sous forme d'une poudre verte. Cette poudre est mise en solution dans l'eau puis éluée sur une colonne échangeuse d'ions afin de remplacer les ions iodure par des ions chlorure. Le complexe Fe^{III}TMPyP est obtenu avec un rendement de 23 %.

IV) Autres complexes disponibles au laboratoire et utilisés au cours de cette thèse

IV-A) Métalloporphyrines

Voici un aperçu de la structure des métalloporphyrines disponibles au laboratoire synthétisées par notre équipe et qui ont été utilisées par la suite au cours de ces travaux de thèse (**Schéma IV.8**).[21]

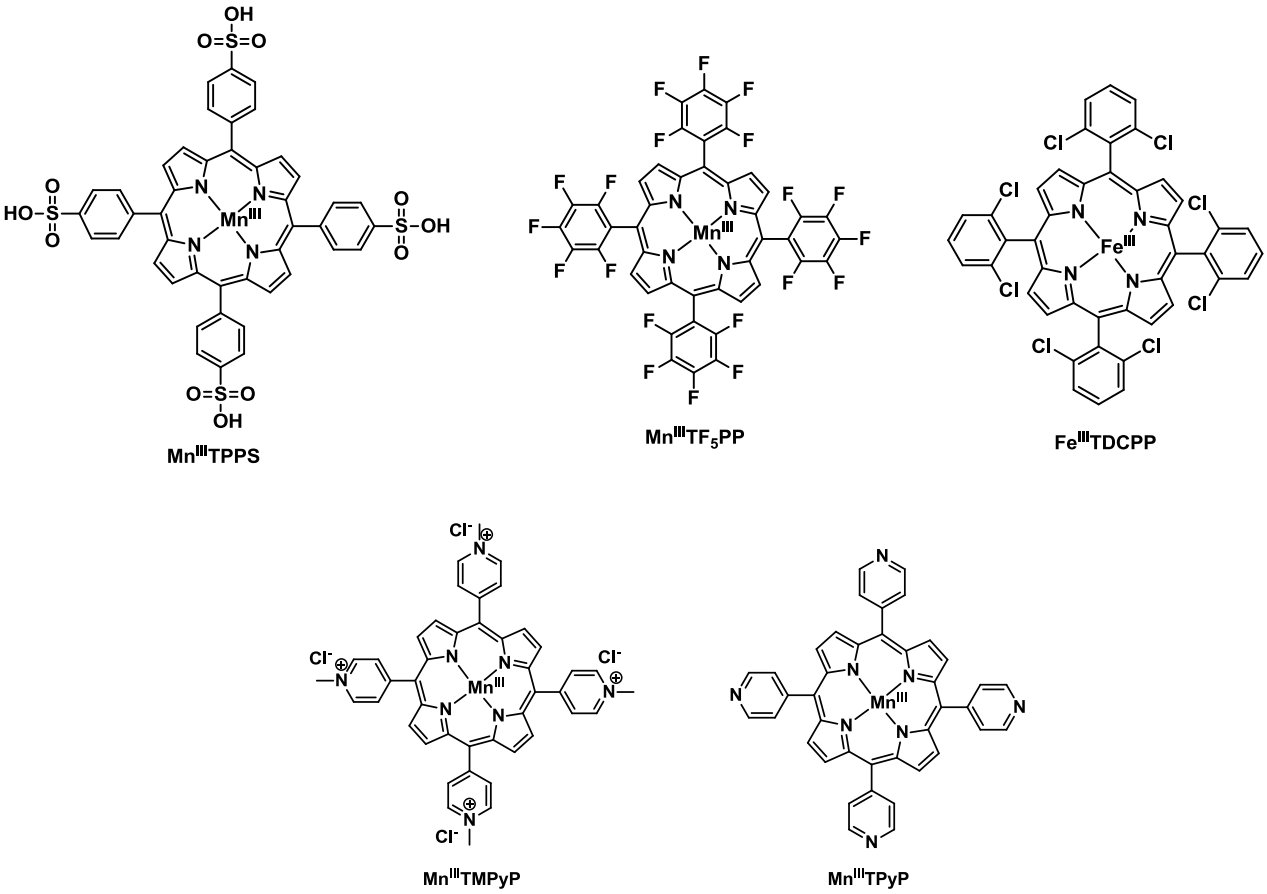


Schéma IV.8 : Structure des métalloporphyrines utilisées.

IV-B) Complexes binucléaires de fer

Les complexes $[Fe^{III}_2(N\text{-}EtHPTB)(CH_3O)(CH_3OH)(H_2O)_2](ClO_4)_4$ appelé par la suite $Fe^{III}_2(N\text{-}EtHPTB)$ et $[Fe^{III}_2(HTPDP)(CH_3OH)_3(CH_3O)](ClO_4)_4$ appelé par la suite $Fe^{III}_2(HTPDP)$ disponibles au laboratoire ont quant à eux été utilisés dans les chapitres suivants. Ils ont été synthétisés suivant la littérature[22] et leur structure cristalline a été obtenue par diffraction des rayons X. Ils ont aussi été caractérisés par spectrométrie de masse ESI-MS HR et analyses élémentaires. Ces complexes sont présentés pour une meilleure compréhension des chapitres suivants. N-EtHPTB correspond au ligand N,N,N',N'-tétrakis(N-éthyl-2-benzimidazolylméthyl)-2-hydroxy-1,3-diaminopropane, HTPDP

correspond au ligand (N,N,N',N'-tétrakis(2-pyridylméthyl)-2-hydroxy-1,3-diaminopropane) (**Schéma IV.9**).[22,23,24]

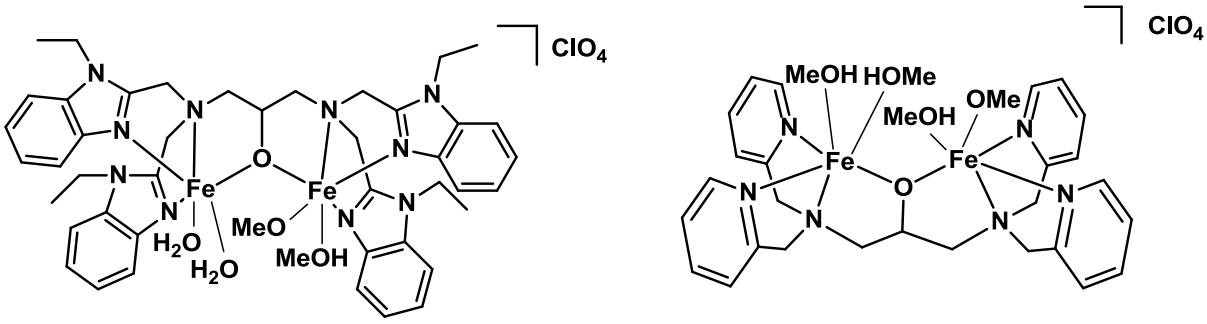


Schéma IV.9 : Structure des complexes binucléaires de fer(III) $[Fe^{III}_2(N\text{-}EtHPTB)(CH_3O)(CH_3OH)(H_2O)_2](ClO_4)_4$ (à gauche) et $[Fe^{III}_2(HTPDP)(CH_3OH)_3(CH_3O)](ClO_4)_4$ (à droite) utilisés dans les chapitres suivants.

IV-C) Complexes mononucléaires de cuivre

Pour finir, deux autres complexes mononucléaires de cuivre(II) synthétisés au laboratoire suivant des protocoles décrits dans la littérature, $[Cu^{II}(TPA)H_2O](OTf)_2$ et $[Cu^{II}(HGPBP)Cl](ClO_4)_2$ (HGPBP désigne le ligand 1-(bis((2-pyridyl)methyl)amino))-3-((guanidino)amino)propan-2-ol) sont utilisés dans les chapitres VII et VIII. Ils ont été caractérisés par mesure des paramètres de maille et par spectrométrie de masse ESI-MS HR. La structure de ces complexes est présentée ci-dessous (**schéma IV.10**).[25]

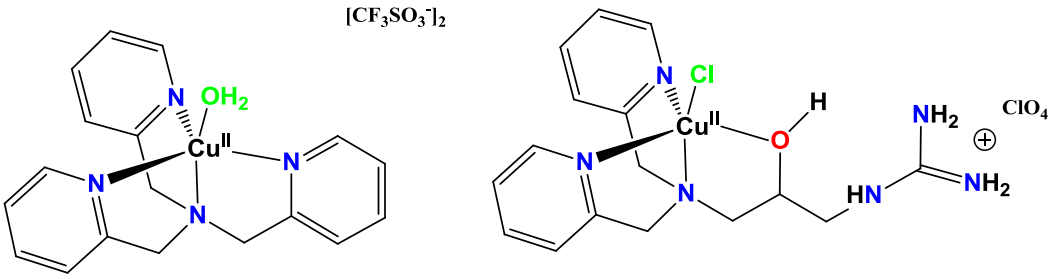


Schéma IV.10 : Structure des complexes $[Cu^{II}(TPA)H_2O](OTf)_2$ (à gauche) et $[Cu^{II}(HGPBP)Cl](ClO_4)_2$ (à droite).

V) Conclusion

Pour conclure, la synthèse des ligands BPMENG et BPMENméthoxy, ainsi que des complexes mononucléaires de fer(II) et de fer(III) correspondants, ont été menées à bien. Ces synthèses sont adaptées de celle du ligand BPMEN. Les complexes $[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENméthoxy)_2Cl_2](CHCl_3)_4Cl_2$, $[Fe^{III}(BPMEN)Cl_2]PF_6$, $[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENG)_2Cl_2]Cl_4$, $[Fe^{II}(BPMEN)ACC]SbF_6$, $[Fe^{II}(BPMEN)(CH_3CN)_2](SbF_6)_2$ et $[Fe^{II}(BPMENG)Cl_2]Cl$ ont tous été caractérisés par diffraction des rayons X et par spectrométrie de masse ESI-MS HR. Le complexe $[Fe^{II}(BPMENG)(CH_3CN)_2](SbF_6)_3$, quant à lui, a été caractérisé par analyse élémentaire. Les métalloporphyrines Fe^{III}TMPyP et Fe^{III}TPyP ont seulement été caractérisées par spectrométrie de masse ESI-MS HR et spectroscopie UV-Visible, leur caractérisation complète étant déjà décrite dans la littérature. Ces complexes miment structuralement trois types de sites actifs que l'on retrouve chez les monooxygénases à fer et à cuivre, ce qui nous permet d'envisager la mise au point de systèmes biomimétiques de ces enzymes capables de catalyser l'oxydation d'une très grande variété de substrats.

Références

(1) Makhlynets, O. V.; Oloo, W. N.; Moroz, Y. S.; Belaya, I. G.; Palluccio, T. D.; Filatov, A. S.; Müller, P.; Cranswick, M. A.; Que, L.; Rybak-Akimova, E. V. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (6), 645.
(2) Toftlund, H.; Pederson, E.; Yde-Anderson, S. *Acta Chim. Scand. A* **1984**, *38*, 693.
(3) Poussereau, S.; Blondin, G.; Cesario, M.; Guilhem, J.; Chottard, G.; Gonnet, F.; Girerd, J.-J. *Inorg. Chem.* **1998**, *37* (13), 3127.
(4) Martinho, M.; Banse, F.; Sainton, J.; Philouze, C.; Guillot, R.; Blain, G.; Dorlet, P.; Lecomte, S.; Girerd, J.-J. *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (5), 1709.
(5) Balland, V.; Banse, F.; Anxolabéhère-Mallart, E.; Nierlich, M.; Girerd, J.-J. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, *2003* (13), 2529.
(6) Simaan, J.; Poussereau, S.; Blondin, G.; Girerd, J.-J.; Defaye, D.; Philouze, C.; Guilhem, J.; Tchertanov, L. *Inorganica Chim. Acta* **2000**, *299*, 221.
(7) Henderson, W.; McIndoe, J. *Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compunds : Tools-Techniques-Tips*, John Wiley & Sons.; 2005.
(8) White, M. C.; Doyle, A. G.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (29), 7194.
(9) Chen, K.; Que Jr, L. *Chem. Commun.* **1999**, 1375.
(10) Roux, Y.; Ghattas, W.; Avenier, F.; Guillot, R.; Simaan, A. J.; Mahy, J.-P. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (13), 5966.
(11) Ghattas, W.; Serhan, Z.; Bakkali-Taheri, N. El; Réglier, M.; Kodera, M.; Hitomi, Y.; Simaan, A. J. *Inorg. Chem.* **2009**, *48* (9), 3910.
(12) Ghattas, W.; Gaudin, C.; Giorgi, M.; Rockenbauer, A.; Simaan, A. J.; Réglier, M. *Chem. Commun.* **2006**, 1027.
(13) Ghattas, W.; Giorgi, M.; Mekmouche, Y.; Tanaka, T.; Rockenbauer, A.; Réglier, M.; Hitomi, Y.; Simaan, A. J. *Inorg. Chem.* **2008**, *47* (11), 4627.
(14) Sallmann, M.; Oldenburg, F.; Braun, B.; Réglier, M.; Simaan, A. J.; Limberg, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, acceptée.
(15) Adler, A. D.; Longo, F. R.; Finarelli, J. D.; Goldmacher, J.; Assour, J.; Korsakoff, L. *J. Org. Chem.* **1967**, *32* (2), 476.
(16) Adler, A. D.; Longo, F. R.; Shergalis, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (15), 3145.
(17) Lindsey, J. S. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43* (2), 300.
(18) Lindsey, J. S.; Wagner, R. W. *J. Org. Chem.* **1989**, *54* (4), 828.
(19) Fleischer, E. B.; Palmer, J. M.; Srivastava, T. S.; Chatterjee, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* (13), 3162.
(20) Pasternack, R. F.; Huber, P. R.; Boyd, P.; Engasser, G.; Francesconi, L.; Gibbs, E.; Fasella, P.; Cerio Venturo, G.; Hinds, L. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94* (13), 4511.
(21) Lindsey, J. S.; Schreiman, I. C.; Hsu, H. C.; Kearney, P. C.; Marguerettaz, A. M. *J. Org. Chem.* **1987**, *52* (5), 827.
(22) McKee, V.; Zvagulis, M.; Dagdigian, J. V.; Patch, M. G.; Reed, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106* (17), 4765.
(23) Trehoux, A.; Roux, Y.; Guillot, R.; Mahy, J.-P.; Avenier, F. *J. Mol. Catal. Chem.* **2015**, *396*, 40.
(24) Avenier, F.; Herrero, C.; Leibl, W.; Desbois, A.; Guillot, R.; Mahy, J.-P.; Aukauloo, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (13), 3634.
(25) Jacobson, R. R.; Tyeklar, Z.; Karlin, K. D.; Zubieta, J. *Inorg. Chem.* **1991**, *30* (9), 2035.

CHAPITRE V

Chapitre V : Catalyse d'oxydation avec H_2O_2

Concernant les complexes de fer(III), une étude préliminaire concernant l'oxydation du styrène par H_2O_2, catalysée par le complexe $[Fe^{III}(BPMEN)Cl_2]PF_6$, a été réalisée dans MeCN, puis dans l'eau en présence ou non de PEIFac 0.6/0.6. Dans les deux cas, la réaction est inefficace et deux produits d'oxydations, le benzaldéhyde et l'époxyde sont obtenus avec un faible rendement (moins de 1 TON), le PEIFac n'a donc aucune influence sur le déroulement de la réaction. Ceci n'est pas surprenant car les complexes mononucléaires de fer(III), coordinés par des ions chlorures, sont connus pour être peu réactifs vis-à-vis de H_2O_2. Ceci nous a donc conduits à envisager principalement la réactivité des complexes de fer(II).

I) Réactions d'oxydation catalysées par des complexes mononucléaires de fer(II) : comparaison des réactions réalisées dans MeCN et dans H_2O

Les complexes utilisés dans cette étude sont les complexes mononucléaires de fer(II) $[Fe^{II}(BPMEN)(CH_3CN)_2](SbF_6)_2$ et $[Fe^{II}(BPMENG)(CH_3CN)_2](SbF_6)_3$ ils seront appelés par la suite respectivement Fe(II)BPMEN et Fe(II)BPMENG. Dans un premier temps, nous avons suivi par spectroscopie UV-Visible l'évolution des spectres de ces complexes lors de l'ajout d'H_2O_2 (10 équivalents) (**Figure V.1**).

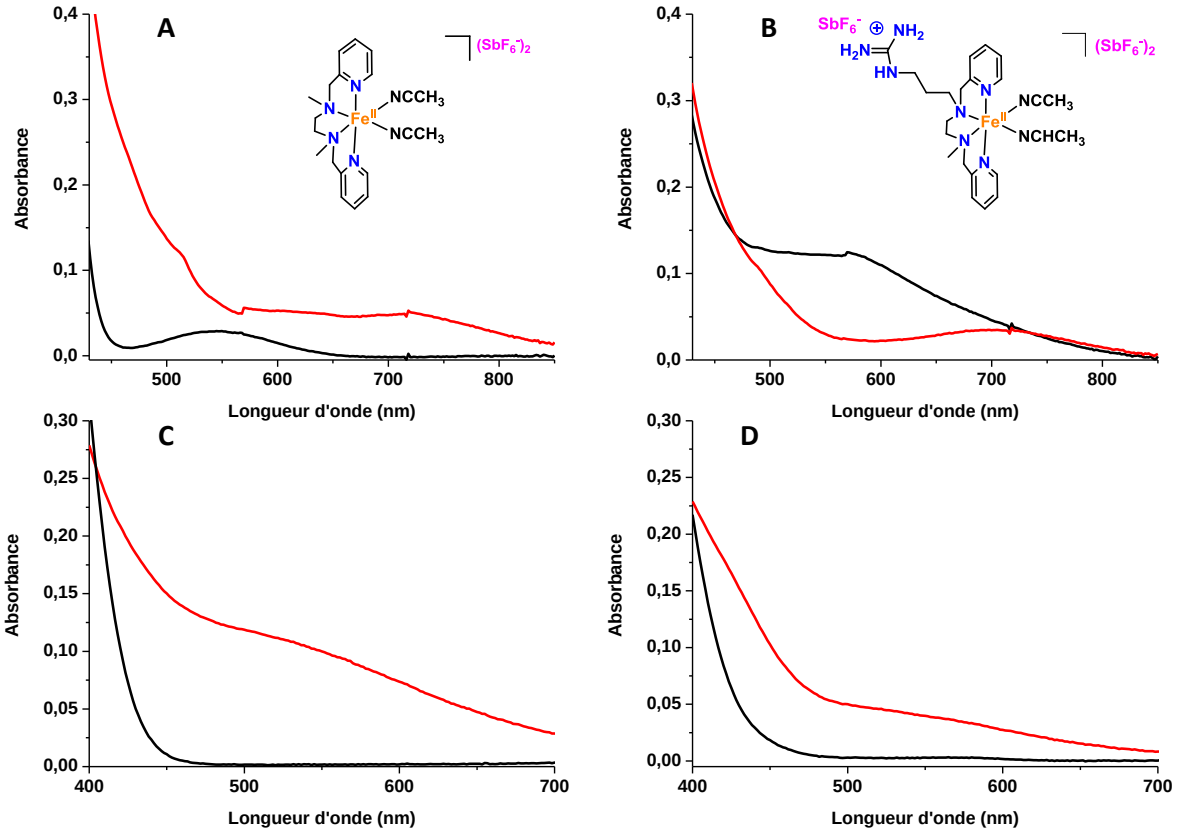


Figure V.1 : Spectres UV-Visible à 20°C de solutions à 1mM des complexes Fe(II)BPMEN (A) dans MeCN , (C) dans H_2O et Fe(II)BPMENG (B) dans MeCN, (D) dans l'eau, avant (——) et après ajout de H_2O_2 (10mM) (——).

Dans l'acétonitrile, la réactivité des complexes Fe(II)BPMEN et Fe(II)BPMENG avec H_2O_2 est sensiblement la même, avec l'apparition dans le spectre UV-Visible d'une bande à 710 nm caractéristique de la présence en solution d'une espèce fer(III)-hydroperoxo. Dans l'eau, cette bande à 710 nm n'apparaît pas, mais on observe la formation d'une nouvelle bande vers 550 nm dont la provenance n'a pas été élucidée. En matière de catalyse, nous avons étudié dans un premier temps, l'activité des deux complexes pour la réaction d'époxydation du cyclooctène par H_2O_2 dans MeCN. L'activité du complexe Fe(II)BPMEN dans l'acétonitrile, déjà décrite dans la littérature, a tout d'abord été reproduite, de façon à pouvoir la comparer à l'activité catalytique de son pendant guanidinylé, Fe(II)BPMENG.[1] Ceci a permis de montrer que ce catalyseur nouvellement synthétisé était aussi efficace que le complexe Fe(II)BPMEN. En effet, dans MeCN, en injectant H_2O_2 à l'aide d'un pousse-seringue, les deux complexes réalisent l'oxydation quasi sélective du cyclooctène en époxyde avec un rendement de 84 % (8,4 TON) en 30 minutes, le diol correspondant étant obtenu très minoritairement (les expériences ont été tripliquées). Le complexe Fe(II)BPMEN est toutefois légèrement plus sélectif que le complexe Fe(II)BPMENG, les proportions relatives d'époxyde obtenu étant respectivement de 98,8 % et 95,6 % (**Figure V.2**).

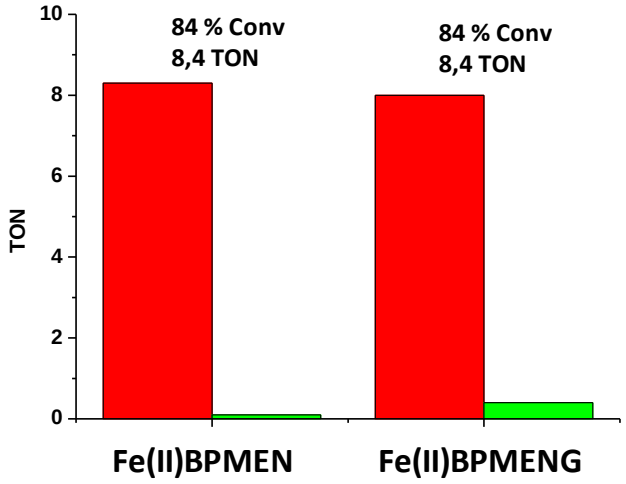


Figure V.2 : Nombre de TON réalisés lors de l'oxydation du cyclooctène en époxyde (rouge) et diol (vert) par les complexes Fe(II)BPMEN et Fe(II)BPMENG dans les conditions : cat/substrat/H_2O_2 1 : 200 : 10. H_2O_2 est ajouté au pousse seringue en 30 minutes.

Comme nous pouvions le présager au vu de sa structure, le catalyseur guanidinylé est aussi efficace que le complexe Fe(II)BPMEN, qui est, parmi les complexes mononucléaires de fer référencés à ce jour, le meilleur catalyseur de réactions d'oxydation en présence de H_2O_2. La preuve de son efficacité dans MeCN étant faite, l'influence de l'eau sur le rendement catalytique des deux complexes a pu être étudiée, en espérant que le groupement guanidinium puisse apporter, grâce à sa meilleure solubilité dans l'eau une plus grande activité catalytique. Cette étude se fait par ajout de quantités croissantes d'eau dans le milieu réactionnel. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure V.3**.

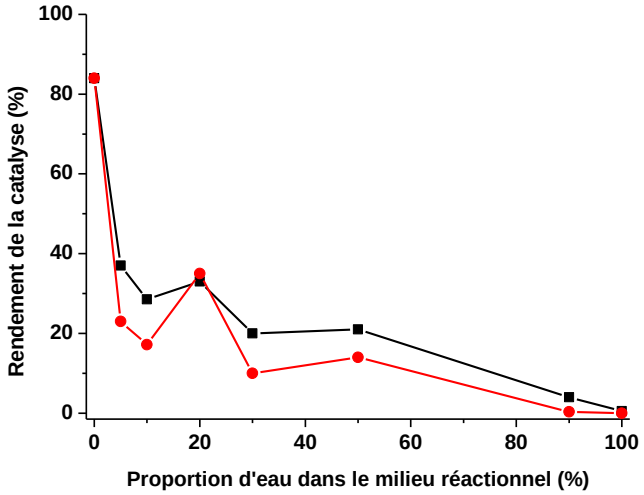


Figure V.3 : Influence de l'eau sur le rendement de l'oxydation du cyclooctène par H_2O_2 catalysée par les complexes Fe(II)BPMEN (■) et Fe(II) BPMENG (●), dans les proportions cat/substrat/H_2O_2 : 1 /200/10. H_2O_2 est ajouté au pousse seringue en 30 minutes. Les points sont reliés pour faciliter la lecture du graphique.

La **Figure V.3** montre que l'ajout d'une faible proportion d'eau (5 %) fait déjà perdre respectivement 70 et 80 % d'activité catalytique aux complexes Fe(II)BPMEN et Fe(II)BPMENG. Cette chute d'efficacité s'amplifie pour atteindre des rendements proches de 0 lorsque l'on réalise la catalyse par l'un ou l'autre des complexes en milieu 100 % aqueux. Ce résultat, bien qu'un peu décevant, nous a poussé à envisager l'utilisation de polyéthylèneimine fonctionnalisé (PEIF) pour permettre une amélioration de ces rendements dans l'eau.

II) Catalyse des réactions d'oxydation par des complexes mononucléaires de fer(II) dans l'eau en présence de polymère fonctionnalisé (PEIF)

II-A) Incorporation du catalyseur dans le polymère

Dans un premier temps, il nous est apparu indispensable de caractériser l'incorporation du catalyseur au sein du polymère fonctionnalisé par des groupements carboxylate (PEIFac 0.6/0.6), afin de relier son incorporation à une éventuelle influence sur la catalyse. Ainsi, plusieurs tests ont été effectués. En premier lieu, cette incorporation a été suivie par spectroscopie UV-Visible. Pour cela, une solution de PEIFac 0.6/0.6 (9,3 mM) dans l'eau pure est placée dans une membrane de dialyse qui est ensuite immergé dans une solution de complexe de cuivre $[Cu^{II}(HGPBP)Cl]ClO_4$ sous agitation dans l'eau. En parallèle, la même expérience est réalisée avec le polymère commercial (PEIcom, 2,5 mM). L'absorbance de la solution à 660 nm, correspondant à la bande de transfert de charge du complexe, est suivie par spectroscopie UV-Visible (**Figure V.4**).

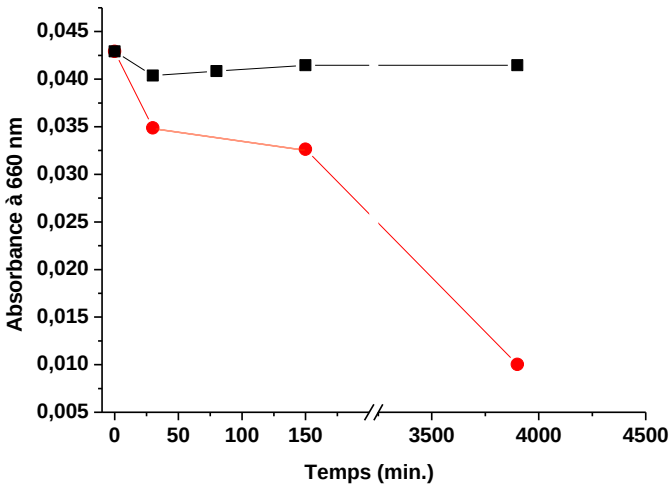


Figure V.4 *:* Décroissance de l'absorption d'une solution de complexe $[Cu^{II}(HGPBP)Cl]ClO_4$ (1.1 mM) à 660 nm en présence de polymère commercial (2.5mM) (■) ou de polymère fonctionnalisé PEIFac 0.6/0.6 (9.3 mM en monomère) (●). Les points sont reliés pour faciliter la lecture du graphique.

Les résultats obtenus montrent une décroissance de l'absorbance à 660 nm dans le cas où le PEIFac 0.6/0.6 est utilisé avec la disparition presque complète de l'absorbance à 660 nm après 65h. Au contraire, avec le PEIcom, l'absorbance de la solution reste identique pendant les 65 h que dure l'expérience. Une différence de comportement intéressante apparaît ainsi entre le PEIcom et le PEIFac mais qui peut être seulement due à la différence de concentration des polymères. Toutefois, ce résultat est positif car il suggère fortement une interaction spécifique entre le complexe guanidinium et le polymère carboxylate. Cette méthode a également été utilisée pour examiner l'incorporation du complexe binucléaire $[Fe^{III}_2(N\text{-}EtHMPTB)(CH_3OH)_2(H_2O)_2](ClO_4)_4$ et des complexes de porphyrine dans les PEIF sans succès. En particulier, dans ce dernier cas, les porphyrines se collent à la membrane de dialyse, empêchant toute étude.

Une autre méthode a alors été entreprise avec les complexes de porphyrine dont le complexe Fe^{III}TMCPyP. Cette méthode consiste à enregistrer le spectre d'absorbance UV-Visible du complexe après ajout de différentes quantités de polymère pour voir si l'on observe un déplacement de la longueur d'onde de la bande de Soret caractéristique d'un changement d'environnement de la métalloporphyrine. Malheureusement, aucun déplacement n'a pu être observé durant cette expérience.

Suite à cet échec, nous nous sommes tournés vers des expériences d'extinction de la fluorescence des différentes métalloporphyrines par le polymère. Ainsi, en présence d'une grande quantité de PEIFg 0.20/0.30 pour le complexe Fe^{III}TDCPP et de PEIFac 0.6/0.6 pour les complexes Mn^{III}TPyP et Mn^{III}TMPyP, une extinction de la fluorescence des trois complexes a pu être mis en évidence. Cependant, l'ajout de quantités importantes de polymère est nécessaire pour observer un effet notoire. Pour 300 équivalents en monomèrede PEIF, les complexes ont perdu 70 % de leur fluorescence alors que pour 1000 équivalents en monomère de PEIF, la fluorescence observée n'est plus que de 10 %. Cette expérience met donc en lumière une interaction entre le polymère modifié et les différents complexes de porphyrines pour des concentrations élevées en PEIF, suggérant fortement une incorporation des complexes dans le polymère. En revanche, cette expérience tend à nous faire penser que pour de faibles concentrations en PEIF l'incorporation des métalloporphyrines dans le PEIF ne se fait pas ou du moins n'est pas caractérisable par cette méthode **(Figure V.5).**

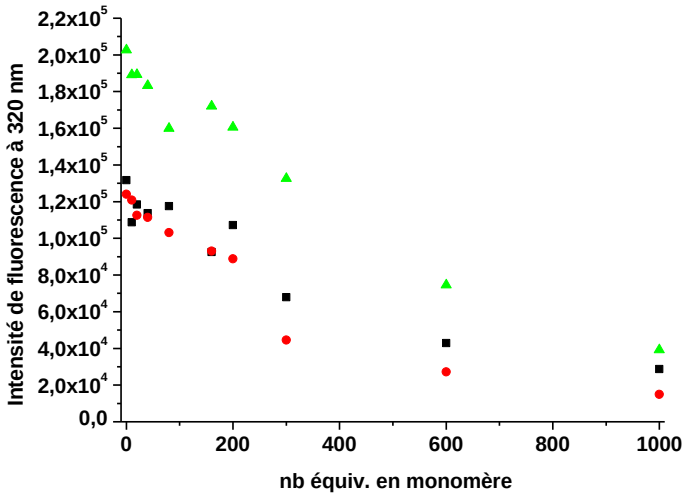


Figure V.5 : Extinction de la fluorescence à 320 nm des complexes Fe^{III}TDCPP (■), Mn^{III}TPyP (▲) et Mn^{III}TMPyP (●) 10 µM dans l'eau en présence de PEIF, longueur d'onde d'excitation : 230 nm.

Finalement, une dernière expérience, visant à incorporer le complexe Fe^{III}TDCPP dans la partie hydrophobe du polymère pour aider sa solubilisation dans l'eau a été réalisée (**Figure V.6)**.

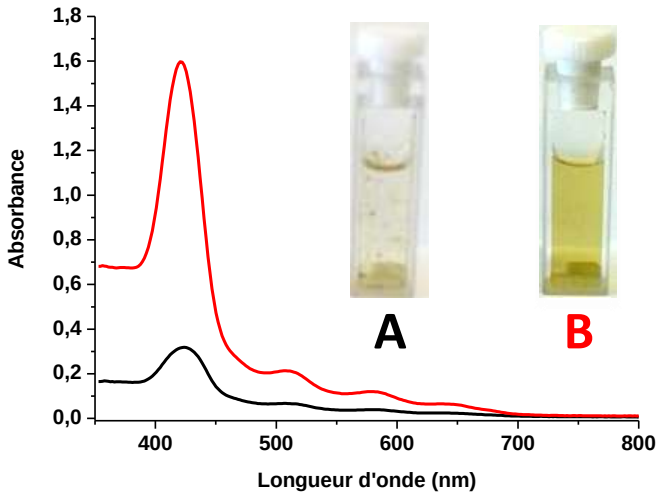


Figure V.6 : Spectres UV-Visible du complexe Fe^{III}TDCPP en solution dans l'eau (65 µM) (A) en absence (——), (B) en présence de PEIFg 0.20/0.30 (——), après 24 heures au repos.

Pour cela, le complexe Fe^{III}TDCPP**,** très hydrophobe, a été solubilisé dans l'eau, à une concentration de 65 µM, en présence ou non du polymère PEIFg 0.20/0.30. Après 24 heures, en l'absence du polymère, un précipité apparaît (**Figure V.6 A**), alors qu'en présence du polymère la métalloporphyrine reste en solution (**Figure V.6 B**). Ceci s'avère être une preuve assez claire de l'incorporation du complexe, probablement dans l'environnement localement hydrophobe du polymère, permettant ainsi le maintien de l'ensemble en solution.

II-B) Oxydation de divers substrats par H_2O_2 catalysée par Fe(II)BPMENG dans l'eau en présence de polymère fonctionnalisé.

Dans un deuxième temps, des tests de catalyse ont pu être menés en présence ou non de PEIF fonctionnalisé par des fonctions carboxylate et octyle (PEIFac 0.6/0.6, 0.6/0.4 et 0.6/0.2), le but étant d'étudier l'influence de l'incorporation du complexe Fe(II)BPMENG dans l'environnement hydrophobe du polymère sur son activité catalytique dans l'eau. Malgré tous nos efforts et énormément de conditions de catalyse testées, en faisant varier les quantités de H_2O_2, de PEIFac, de substrat, la composition (n équiv. carboxylate/n équiv. d'octyle) des PEIFac eux-mêmes, le pH, les temps des réaction, il n'a pas été possible d'améliorer de façon importante l'activité, très faible dans l'eau, du complexe Fe(II)BPMENG. Les meilleurs résultats obtenus sont résumés sur la **Figure V.7**.

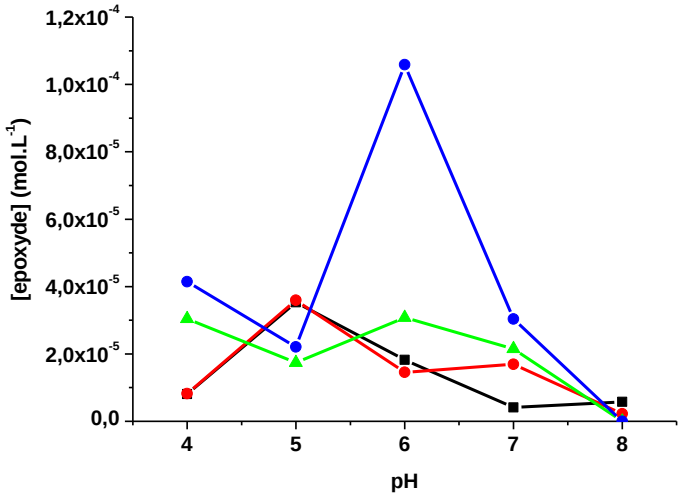


Figure V.7 : Concentration d'époxyde formé à différents pH lors de la catalyse d'oxydation du cyclooctène dans les conditions de catalyse cat/substrat/oxydant 1/1000/10, dans l'eau (——) et avec les PEIFac 0.6/0.2 (——) ; 0.6/0.4 (——) ; 0.6/0.6 (——). Les points sont reliés pour faciliter la lecture du graphique.

La réaction d'oxydation du cyclooctène par H_2O_2 catalysée par Fe(II)BPMENG a été étudiée en présence de polymère modifié à différents pH. Les conditions optimales pour cette réaction ont été obtenues pour un pH égal à 6 dans un tampon MES, en présence du polymère PEIFac 0.6/0.6 (**Figure V.7 courbe bleue**). Dans ces conditions, on observe une efficacité catalytique multipliée par 7 par rapport à celle observée dans l'eau (**Figure V.7 courbe noire**) avec un rendement optimal de 1,4 % en époxyde. La réactivité du complexe Fe(II)BPMENG pour la catalyse de la sulfoxydation du thioanisole par H_2O_2 dans l'eau a également été étudiée. Là aussi, les résultats obtenus se sont avérés meilleurs en présence de PEI modifié que dans l'eau, avec toutefois des rendements ne dépassant pas 12 % en sulfoxyde soit 1,2 TON. Finalement, l'oxydation du styrène par H_2O_2 a également été étudiée. La production majoritaire de benzaldéhyde, qui peut se former par autoxydation du styrène ne nous a pas encouragé à poursuivre les études. Face à ce manque de

résultats, nous nous sommes tournés vers l'utilisation de complexes binucléaires non héminiques et de complexes métalloporphyriniques.

II-C) Catalyse d'oxydation avec des complexes binucléaires de fer

Le complexe [Fe^{III}_2HTPDP] a été utilisé comme catalyseur dans les réactions d'oxydation du thioanisole et du cyclooctène par H_2O_2. Il est très efficace dans MeCN, avec des rendements respectifs pour l'oxydation du thioanisole en sulfoxyde et du cyclooctène en 1,2-époxycyclooctane de 100 % (10 TON) et de 85 % (8.5 TON) en 30 minutes en présence de 10 équivalents de H_2O_2 ajoutés au pousse seringue. En revanche, l'oxydation de ces mêmes substrats, dans les mêmes conditions dans un mélange MeCN/eau (1 : 9), conduit à des résultats totalement différents. Pour le cyclooctène, l'activité catalytique est très faible, et un rendement de seulement 0.2 % a pu être observé au bout de 30 minutes. Au contraire, pour le thioanisole, l'activité catalytique est meilleure, et un rendement de 36 % en sulfoxyde, soit 3.6 TON, a pu être obtenu au bout de 30 minutes. Il s'agit là d'un résultat très intéressant, mais qui n'a pu, malheureusement, être amélioré en présence de PEIFac 0.6/0.6, le rendement obtenu en sulfoxyde restant de 36 % dans le meilleur des cas. Néanmoins, ces résultats ont permis de montrer que [Fe^{III}_2 HTPDP] s'avérait être un bon candidat pour la catalyse de réactions d'oxydation dans l'eau. Le complexe [Fe^{III}_2 N-EtHPTB] quant à lui, ne permet pas de catalyser des réactions d'oxydation dans l'eau. Par la suite, nous avons voulu étudier le potentiel des porphyrines en termes de catalyse dans l'eau.

II-D) Catalyse d'oxydation avec des porphyrines de fer et de manganèse

De nombreuses métalloporphyrines ont été testées en tant que catalyseurs de réactions d'oxydation d'alcènes, de sulfures, etc…, en présence de H_2O_2.[2] Les porphyrines de fer(III) et de Mn(III), qui ont été les plus utilisées, présentent en outre l'avantage de pouvoir être réduites et ainsi de pouvoir réaliser l'activation réductrice du dioxygène de l'air, tout comme les complexes mono et binucléaires de fer ou de cuivre. La première métalloporphyrine hydrosoluble utilisée, la Fe^{III}TMPyP (voir **Schéma IV.8**), catalyse l'oxydation du styrène par H_2O_2, dans l'eau de manière peu efficace et de façon non sélective (rendement en époxyde < 0,2 %, en aldéhyde < 0,2 %, diol < 0,2 % (0,6 TON). De plus, l'ajout de PEIF dans le milieu n'augmente pas son activité catalytique. Cette même porphyrine de fer catalyse l'oxydation du cyclooctène en époxyde correspondant par H_2O_2 (10 équivalents), avec un rendement de 1,6 % (0,16 TON). Cette fois-ci l'ajout de PEIFac 0.6/0.6 (10 équivalents *vs* Fe^{III}TMPyP) diminue le rendement de la réaction, qui atteint 0,3 %.

Finalement, le complexe Fe^{III}TMPyP a aussi été utilisé pour catalyser l'oxydation du thioanisole, dans l'eau, et l'influence de différents polymères sur le rendement de la réaction a été étudiée. Après de nombreux tests d'optimisation, les conditions opératoires optimales ont été déterminées : elles associent dans un tampon phosphate 50 mM, pH 3, le catalyseur, le substrat et l'oxydant, H_2O_2, dans le rapport 1/1000/10. Un rendement de 53 % (5,3 TON) en sulfoxyde a été obtenu dans ces conditions, et l'ajout du polymère modifié PEIFac 0.6/0.6, 10 équivalents *vs* Fe^{III}TMPyP a permis son accroissement jusqu'à 66 % (6.6 TON). Ce résultat est encourageant dans

la perspective de la catalyse de réactions d'oxydation par Fe^{III}TMPyP dans l'eau, en présence de polymère, mais en utilisant comme oxydant le dioxygène de l'air.

En parallèle, d'autres métalloporphyrines dont l'activité catalytique a déjà été étudiée avec *m*-CPBA dans l'eau,[3, 4] ont aussi été testées comme catalyseurs d'oxydation du thioanisole par H_2O_2 dans l'eau, afin de déterminer le candidat idéal pour la suite des études. Les porphyrines utilisées sont la Fe^{III}TDCPP et la $Mn^{III}TPF_5P$, très hydrophobes et très efficaces en catalyse d'oxydation, la Mn^{III}TPyP partiellement soluble dans l'eau, ainsi que la Mn^{III}TMPyP, qui elle est complétement soluble dans l'eau mais également chargée positivement, ce qui lui confère la possibilité d'interagir avec les substituants carboxylate des polymères de type PEIFac. Enfin, la Mn^{III}TPPS, portant quatre substituants sulfonate négatifs, pourrait être intéressante pour une incorporation dans les polymères de type PEIFg. Tous ces complexes métalloporphyriniques sont susceptibles de réaliser l'activation réductrice du dioxygène, toutefois, les quelques exemples décrits dans la littérature pour ce type de réaction utilisent préférentiellement des porphyrines à base de manganèse.[5] Des tests préliminaires ont seulement été réalisés, concernant l'oxydation du thioanisole par H_2O_2, catalysée par ces complexes dans les conditions décrites précédemment pour Fe^{III}TMPyP. H_2O_2 est ajouté au pousse seringue en 30 minutes, afin d'éviter la réaction catalasique bien connue, qui conduit à la transformation d'H_2O_2 en H_2O et O_2 et qui est catalysée par certaines porphyrines de manganèse (**Tableau V.1**).[6,7]

Tableau V.1: Efficacité des différentes porphyrines en sulfoxydation du thioanisole dans l'eau dans les conditions cat/substrat/H_2O_2 de 1/1000/10, H_2O_2 étant ajouté au pousse seringue en 30 minutes.

Catalyseur	Substrat	Rendement (%)	TON
Fe^{III}TMPyP	Thioanisole	53	5,3
Fe^{III}TDCPP	Thioanisole	25	2,5
Mn^{III}TPyP	Thioanisole	80	8
Mn^{III}TMPyP	Thioanisole	0	0
$Mn^{III}TPF_5P$	Thioanisole	20	2
Mn^{III}TPPS	Thioanisole	0	0

Sur les métalloporphyrines étudiées, seulement quatre catalysent la réaction d'oxydation du thioanisole et conduisent à la formation sélective du sulfoxyde. Les complexes Mn^{III}TMPyP et Mn^{III}TPPS étant inactifs dans les conditions utilisées. Mn^{III}TPyP est le catalyseur le plus efficace et conduit à un rendement de 80 % en sulfoxyde, suivi par la Fe^{III}TMPyP (53 %), alors que Fe^{III}TDCPP et $Mn^{III}TPF_5P$ conduisent à des rendements respectifs en sulfoxyde de 25 et 20 %. Ces trois complexes constituent donc de bons candidats pour la catalyse de réactions d'oxydation dans l'eau. Il faut noter que dans les mêmes conditions, en présence de PEIFg 0.20/0.30 (24 équivalents), la catalyse est un peu plus efficace aussi bien avec Fe^{III}TDCPP qu'avec $Mn^{III}TPF_5P$, qui conduisent à des rendements en sulfoxyde respectivement de 30 % et 27 %.

III) Conclusion

Pour conclure, l'incorporation des métalloporphyrines dans le polymère a été caractérisée par des études d'extinction de fluorescence, et nous avons montré qu'en présence de 300 équivalents en monomère de PEIFg ou PEIFac, la fluorescence des métalloporphyrines Mn^{III}TPyP, Mn^{III}TMPyP et Fe^{III}TDCPP est éteinte. En parallèle une expérience a prouvé que sans polymère, la Fe^{III}TDCPP, très hydrophobe, précipite dans l'eau après 24 heures, alors qu'en présence de PEIFg 0.20/0.30, cette métalloporphyrine est complétement soluble. Une dernière étude montrant la diminution de l'absorbance d'une solution de complexe de cuivre en présence de PEIFac 0.6/0.6 montre l'incorporation de complexe mononucléaire de cuivre guanidilé $[Cu^{II}(HGPBP)Cl]ClO_4$ dans le polymère fonctionnalisé par des groupes carboxylate. Cette étude nous laisse supposer que le complexe de fer, portant un groupement guanidinium, pourrait lui aussi être incorporé dans le polymère.

Une fois l'incorporation dans le polymère modifié prouvée, des études comparant l'activité des complexes $Fe^{II}(BPMENG)(CH_3CN)_2](SbF_6)_3$ et $[Fe^{II}(BPMEN)(CH_3CN)_2](SbF_6)_2$, qui est le complexe mononucléaire le plus efficace en catalyse d'oxydation du cyclooctène, ont été réalisées. Les résultats obtenus montrent que le complexe $Fe^{II}(BPMENG)(CH_3CN)_2](SbF_6)_3$ possède une efficacité en catalyse d'oxydation identique au complexe dans MeCN, avec un rendement de 84 %. Par la suite, nous avons étudié l'influence de l'eau sur l'efficacité de ces deux complexes pour l'oxydation du cyclooctène et nous nous sommes aperçus, que l'ajout d'un faible volume d'eau entraine une diminution de prêt de 70 % de leur activité catalytique. Malgré une amélioration du rendement multiplié par 7 en présence de polymère modifié PEIFac 0.6/0.6, lorsque la réaction est réalisée dans l'eau, le rendement de la réaction reste très faible et nous oblige donc à changer de substrat. Cependant, l'utilisation du thioanisole en tant que substrat n'a pas permis d'obtenir des rendements en catalyse d'oxydation assez importants pour réaliser des études plus approfondies. Face à une activité trop faible des complexes mononucléaires de fer, nous nous sommes tournés vers l'utilisation d'un complexe binucléaire de fer(III) : $[Fe^{III}_2$ HTPDP] en solution dans un mélange MeCN/eau (1:9). Ce complexe catalyse l'oxydation du thioanisole avec un rendement de 36 % en présence de H_2O_2, en revanche l'utilisation de polymère modifié diminue le rendement de la catalyse d'oxydation. En parallèle, différentes métalloporphyrines ont été testées pour la même réactivité dans l'eau en présence de H_2O_2 avec des rendements allant de 0 à 80 %. En résumé, ces expériences de catalyse nous ont permis de sélectionner un complexe binucléaire ainsi que quatre métalloporphyrines : Fe^{III}TMPyP, Mn^{III}TPyP, Fe^{III}TDCPP et $Mn^{III}TPF_5P$, qui ont montré une activité catalytique intéressante dans l'eau avec une augmentation du rendement de la réaction d'oxydation du thioanisole en présence de polymère modifié (PEIFac ou PEIFg suivant les cas). Ces catalyseurs sont donc des candidats intéressants pour mener nos études d'activation du dioxygène, qui seront menées dans l'eau.

Références

(1) Chen, K.; Costas, M.; Kim, J.; Tipton, A. K.; Que, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (12), 3026.
(2) Meunier, B. *Chem. Rev.* **1992**, *92* (6), 1411.
(3) Hyun, M. Y.; Jo, Y. D.; Lee, J. H.; Lee, H. G.; Park, H. M.; Hwang, I. H.; Kim, K. B.; Lee, S. J.; Kim, C. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19* (5), 1810.
(4) Yang, S. J.; Nam, W. *Inorg. Chem.* **1998**, *37* (4), 606.
(5) Schenning, A. P. H. J.; Spelberg, J. H. L.; Hubert, D. H. W.; Feiters, M. C.; Nolte, R. J. M. *Chem. - Eur. J.* **1998**, *4* (5), 871.
(6) Kubota, R.; Asayama, S.; Kawakami, H. *Chem Commun* **2014**, *50* (100), 15909.
(7) Kubota, R.; Imamura, S.; Shimizu, T.; Asayama, S.; Kawakami, H. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (6), 639.

CHAPITRE VI

Chapitre VI : Réalisation de la partie réductase

I) Choix du cofacteur redox

I-A) Complexes de ruthénium photoactivables

Le ruthénium(II) est photoactivable et peut, suite à une irradiation à 450 nm, passer à un état excité Ru(II)*, qui est un intermédiaire bénéficiant d'une durée de vie relativement longue. En fonction des conditions dans lesquelles il est utilisé, ce Ru(II)* peut avoir plusieurs types de réactivité qui sont présentés dans le **Schéma VI.1**. Le Ru(II) * peut conduire ainsi soit à un transfert d'énergie, soit à un transfert d'électrons appelé désactivation non-radiative. Il peut aussi retourner à l'état fondamental par désactivation radiative et émission d'un photon. Une fois excité, en présence d'un accepteur d'énergie (chemin en noir), il peut donc transférer de l'énergie sous forme de photons et redonner le Ru(II). En présence d'un accepteur d'électrons (chemin orange), il peut s'oxyder en Ru(III) qui est une espèce très oxydante pouvant, par exemple, réaliser des catalyses d'oxydation avec l'eau comme source d'atome d'oxygène.[1] Pour finir, en présence d'un donneur d'électrons (chemin vert), il peut se réduire en Ru(I) et ainsi permettre la réduction d'un complexe de fer.

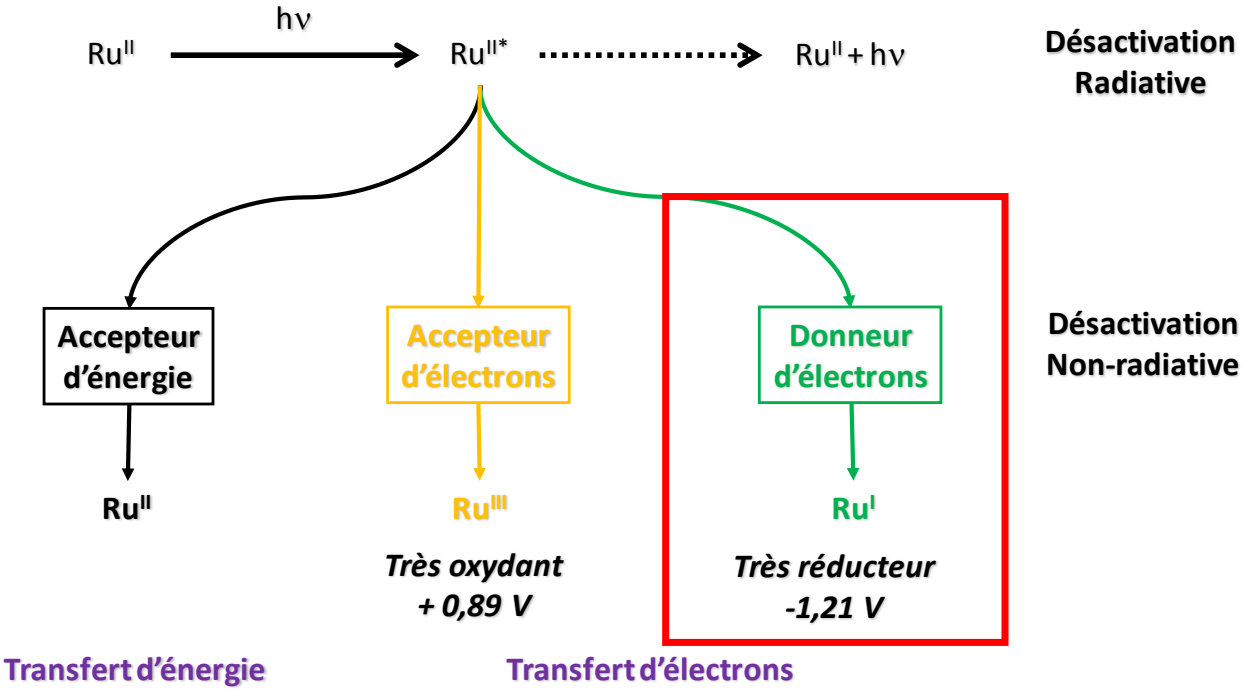


Schéma VI.1: Propriétés électroniques des complexes de type $Ru^{II}(bpy)_3^{2+}$.

La viabilité de cette dernière voie avait déjà été testée par notre équipe, où il avait été montré que l'utilisation d'un complexe de ruthénium photoactivable couplé à un donneur d'électrons sacrificiel, la triéthylamine, permettait de réduire un complexe binucléaire de fer(III) en

fer(II) puis, en présence de dioxygène comme oxydant, permettait d'oxyder PPh_3 en oxyde de phosphine correspondant dans MeCN. Le mécanisme proposé est décrit dans le **Schéma VI.2**.[2]

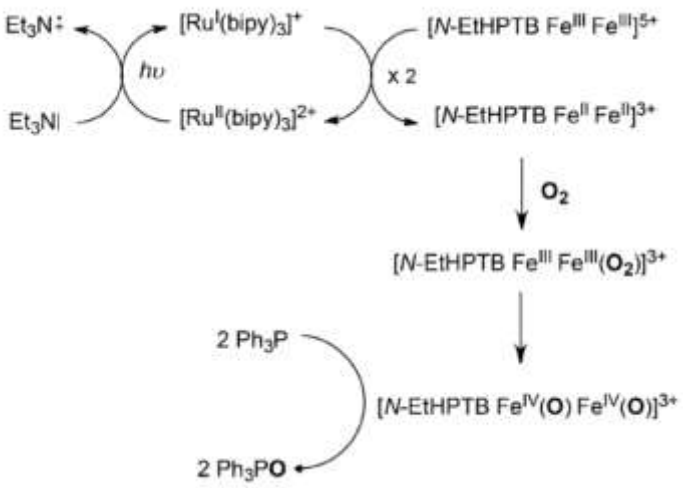


Schéma VI.2 : Mécanisme proposé pour la réduction photo-assistée d'un complexe binucléaire de fer(III), l'activation du dioxygène et le transfert d'oxygène en résultant.

Nous avons donc décidé dans un premier temps d'exploiter les propriétés des complexes de ruthénium en tant que pourvoyeurs d'électrons dans nos systèmes mettant en jeu les complexes présentés au chapitre V, pour réaliser l'activation réductrice du dioxygène. Pour cette étude, deux complexes de ruthénium sont à notre disposition, le complexe commercial $[Ru^{II}(bpy)_3]Cl_2$ et le complexe synthétisé suivant la littérature $[Ru^{II}(bpy)_2phen](PF_6)_2$, phen étant le ligand 2-[4'-carboxyphenyl)]imidazo[4,5-f]-[1,10]phénanthroline, disponible grâce à une collaboration avec le groupe du Pr Aukauloo (**Schéma VI.3**).[3]

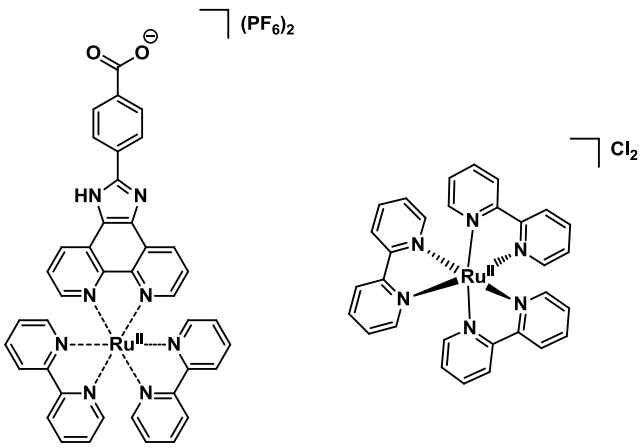


Schéma VI.3 : Structure des complexes de ruthénium envisagés pour notre étude, $[Ru^{II}(bpy)_2phen](PF_6)_2$ (à gauche) et $[Ru^{II}(bpy)_3]Cl_2$ (à droite).

Nous avons tout d'abord utilisé le complexe de ruthénium commercial, connu pour fournir un meilleur rendement d'absorption de photons. Les tests en catalyse seront exposés dans le chapitre VIII.

Cependant, dans le contexte actuel de développement durable, l'utilisation de métaux nobles comme le ruthénium est peu compatible avec le développement d'une chimie respectueuse de l'environnement. Nous avons donc également envisagé une autre voie qui privilégie l'utilisation additionnelle d'un cofacteur redox naturel tel que la Flavine MonoNucléotide (FMN) pour acheminer les électrons vers le centre métallique de nos complexes dans les systèmes visant à l'activation du dioxygène.

I-B) La FMN, une molécule naturelle

La flavine mononucléotide permet en effet le transfert d'électrons vers le cofacteur métallique servant de centre catalytique à de nombreuses enzymes comme la sMMO et les cytP450 en présence de NADH ou NADPH (**Schéma VI.4**). La disponibilité commerciale aussi bien de la FMN que du NADH constitue en outre un avantage certain pour leur utilisation dans nos systèmes.

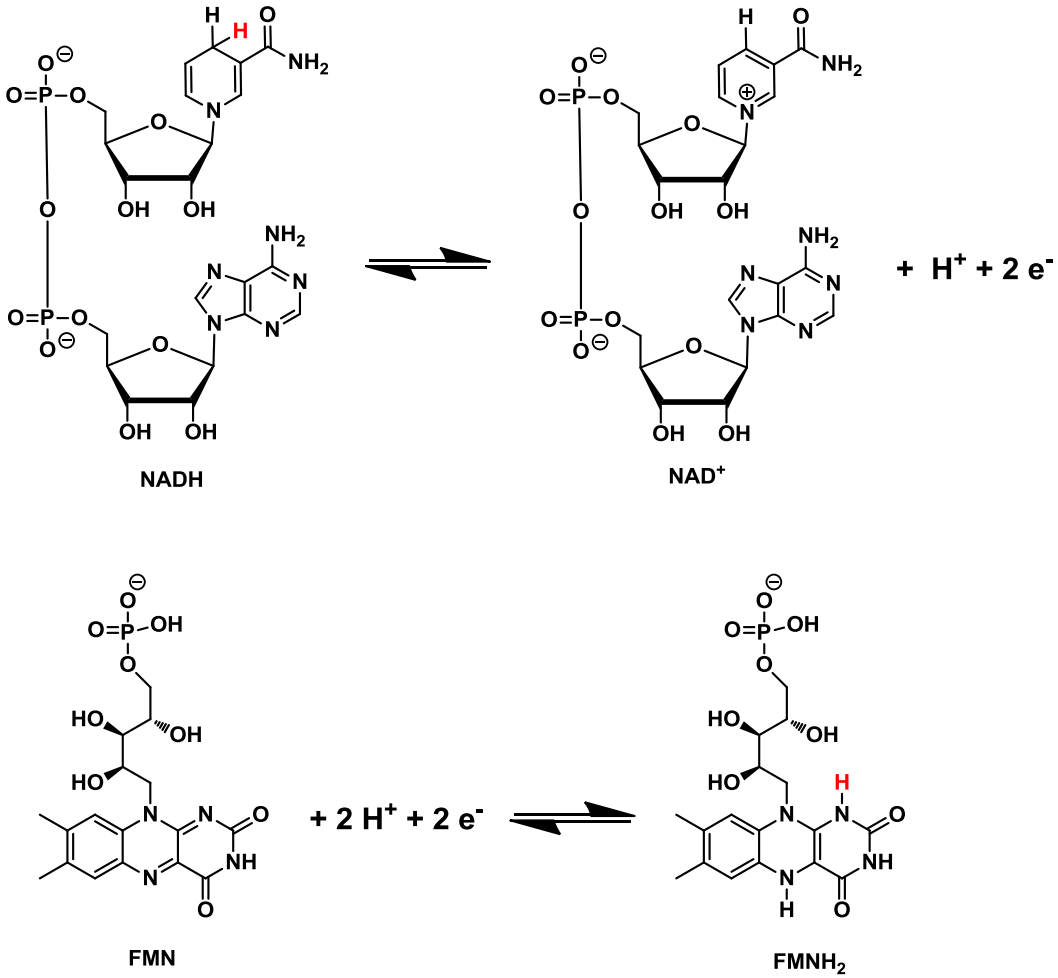


Schéma VI.4 : Structure des cofacteurs redox NAD(H) et FMN(H_2) et couples redox NAD^+/NADH et FMN/$FMNH_2$ associés.

Le mécanisme du transfert d'électrons dans les enzymes est présenté **Schéma VI.5**. NADH transfère tout d'abord un ion hydrure ($H^- = H^+ + 2e^-$) à la FMN qui, par un mécanisme de transfert de protons couplé à un transfert d'électrons (PCET), est réduite en $FMNH_2$. Les potentiels redox des deux couples mis en jeu sont rendus favorables dans les conditions biologiques, le potentiel redox du couple $FMN/FMNH_2$ étant notamment ajusté grâce à l'insertion de la FMN dans la protéine. En milieu tamponné, le couple $FMN/FMNH_2$ a un potentiel redox de l'ordre de -290 mV *vs* NHE à pH 7,[4] plus élevé que celui du couple $NAD^+/NADH$, -315 mV *vs* NHE à pH 7,[5] et la réduction de FAD par NADH devrait être favorisée, toutefois, aucune étude ne rapporte à notre connaissance la réduction directe de FMN par le NADH dans l'eau. $FMNH_2$ est non seulement capable de transférer ses électrons à un partenaire biologique (métalloenzyme) mais peut également réagir avec O_2, pour former un intermédiaire hydroperoxo qui, au sein de certaines enzymes (flavines monooxygénases), peut catalyser certaines réactions d'oxydation (**Schéma VI.5**). Il est donc envisageable, suivant la réactivité désirée, soit d'associer la FMN à un catalyseur de type complexe métallique ou métalloenzyme qui, une fois réduit, pourra catalyser l'oxydation d'un substrat donné, soit utiliser directement la FMN pour catalyser des réactions d'oxydation via la formation de l'intermédiaire hydroperoxo.

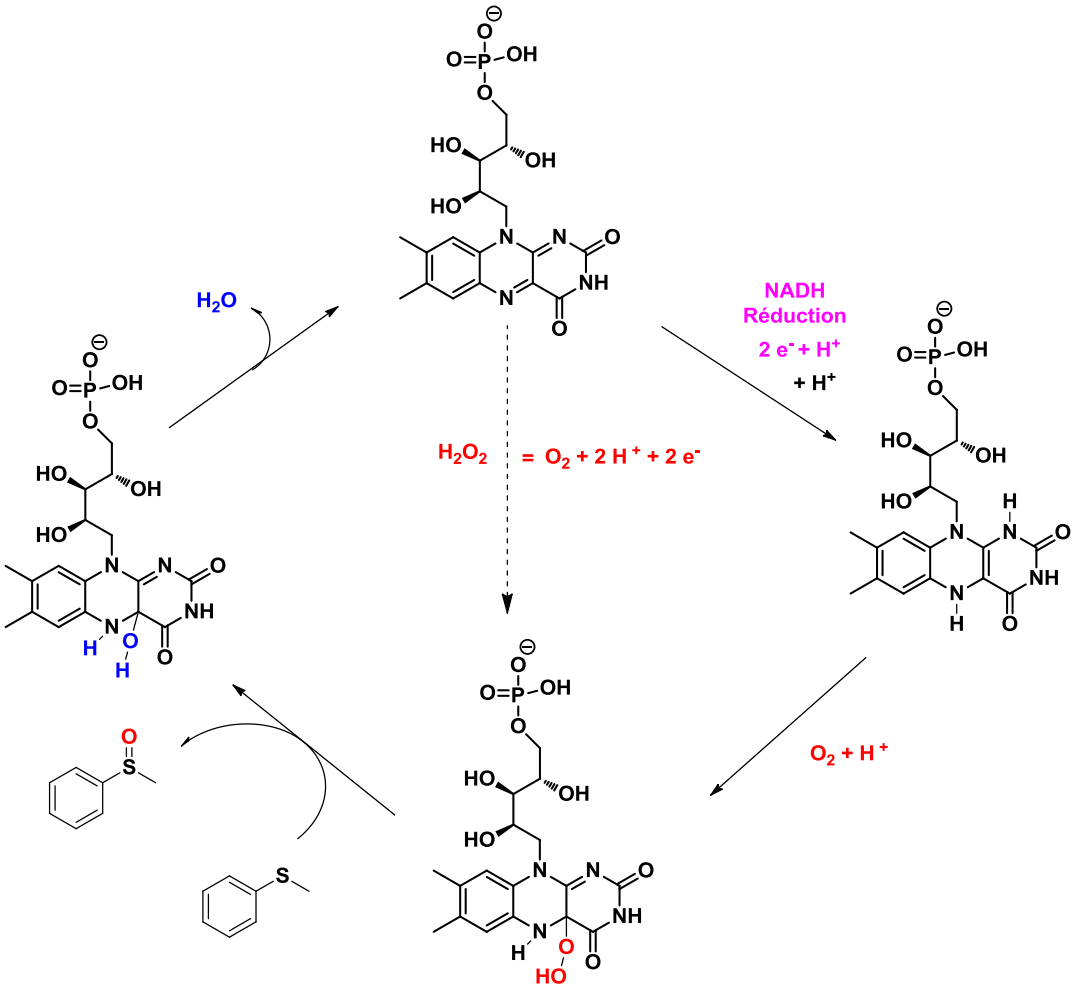


Schéma VI.5 : Exemple du cycle catalytique décrit pour la famille des flavines monooxygénases.

Ainsi, suivant le cycle catalytique décrit dans le **Schéma VI.5,** l'intermédiaire hydroperoxo formé après réduction de FMN par le NADH et activation d'O_2, peut oxyder un substrat comme le thioanisole ou, en absence de substrat, se dégrader en libérant deux molécules d'eau après consommation de 3 protons.

La FMN est produite en grandes quantités (1475 tonnes/an en 2008), de façon industrielle, à partir de levures dont la production a été améliorée par mutagénèse dirigée et ingénierie métabolique et est donc peu couteuse (32 dollars/kg en 2008),[6] et son utilisation en tant que cofacteur redox est donc particulièrement avantageuse.

Dans la suite de ce chapitre, la partie réductase utilisant le NADH et la FMN sera décrite et caractérisée.

II) Construction d'une réductase artificielle par incorporation de la FMN dans un PEI fonctionnalisé (PEIF)

La FMN étant la plupart du temps liée aux protéines par de simples liaisons électrostatiques,[7] nous avons choisi d'élaborer une réductase artificielle suivant le même concept. Pour cela, nous avons utilisé la FMN, qui possède un groupement phosphate et le polymère fonctionnalisé par des groupements guanidinium et octyle de référence. Le ratio correspondant, quantifié par RMN, est de 0.2 guanidinium/0.3 octyle par rapport à la concentration en monomères de PEI. Dans la suite de ce manuscrit, le polymère sera appelé PEIFg 0.20/0.30. Dans ce système, les groupements guanidinium ont été choisis pour leur affinité spécifique envers les groupements phosphate, qu'ils sont capables de lier grâce à la formation conjuguée de liaisons électrostatiques et de liaisons hydrogène ainsi que pour leur stabilité dans une large gamme de pH.[8,9] Les groupements octyle ont quant à eux été ajoutés pour la création d'un microenvironnement localement hydrophobe. La première étape consiste donc à prouver que la FMN est correctement incorporée dans le polymère.

II-A) Incorporation de la FMN dans le polymère fonctionnalisé PEIFg 0.20/0.30

Les cofacteurs flaviniques, tels que la riboflavine et la FMN, absorbent la lumière avec deux bandes caractéristiques à 370 et 470 nm en solution aqueuse. La bande à 370 nm est connue pour être sensible à son environnement, avec un déplacement hypsochrome d'environ 10 nm lorsque la FMN est dissoute dans un environnement hydrophobe (**Figure VI.1**).[10,11]

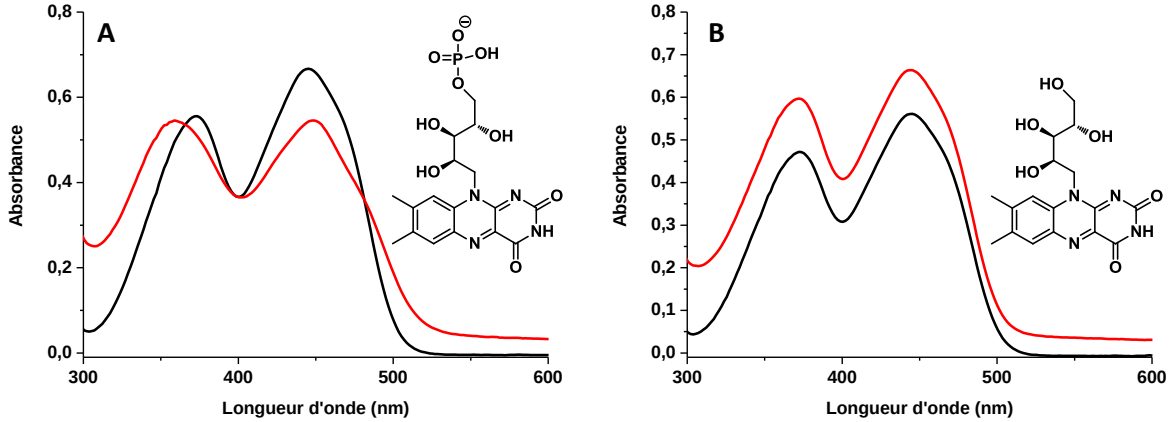


Figure VI.1: Spectres UV-Visible des solutions (A) de FMN ou (B) de riboflavine (à droite) dans l'eau à 50 µM (——) et en présence de PEIFg 0.20/0.30 (4mM en monomère) (——).

Comme on peut le constater **Figure VI.1 A**, l'ajout du PEI modifié à la solution aqueuse de FMN induit un décalage de 12 nm de la bande à 370 nm. Lorsque la même expérience est réalisée avec la riboflavine, qui ne porte pas de groupement phosphate dans sa structure, aucun changement n'est observé (**Figure VI.1 B**). De plus, lorsqu'un polymère commercial (PEIcom) a été ajouté à la solution aqueuse de FMN, un déplacement plus faible de 4 nm de la bande à 370 nm a été observé (**Figure VI.2**).

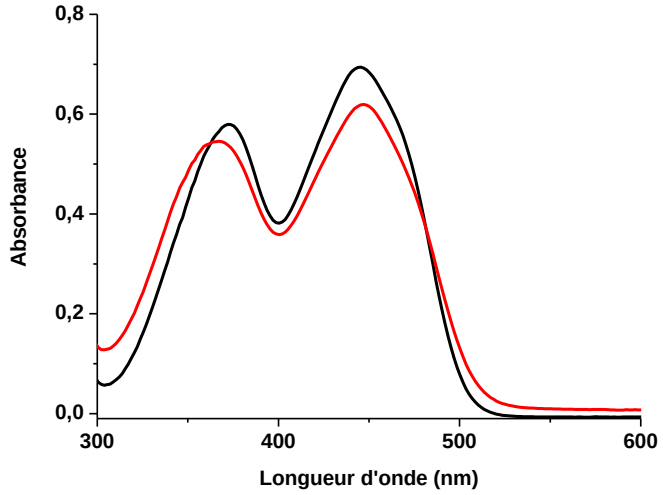


Figure VI.2 : Spectres UV-Visible d'une solution de FMN 50 µM dans l'eau (——) et en présence de PEIcom (4mM en monomère) (——).

Ce changement provient vraisemblablement d'une protonation des amines du polymère commercial dans les conditions de l'expérience, entraînant une faible interaction entre le groupement phosphate de la FMN et les groupements ammonium du polymère. Pour confirmer cette hypothèse, une base a été rajoutée dans la solution (Et_3N), ce qui provoque la disparition du décalage de la bande à 370 nm observé en présence du polymère commercial (**Figure VI.3 B**). La même réaction, en présence du polymère PEIFg 0.20/0.30, provoque une diminution du déplacement de la bande à 370 nm de 12 à 8 nm, qui correspond exactement à la valeur du décalage dû à la protonation des amines du polymère (**Figure VI.3 A**). Ce résultat confirme donc que l'insertion de la FMN dans un polymère de type PEI peut être liée d'une part à une interaction du phosphate avec les ammoniums issus de la protonation des amines aussi bien dans PEIcom que dans PEIFg 0.20/0.30, et, d'autre part, dans le cas de PEIFg 0.20/0.30, à une interaction spécifique entre les fonctions guanidinium du polymère et le phosphate du cofacteur redox.

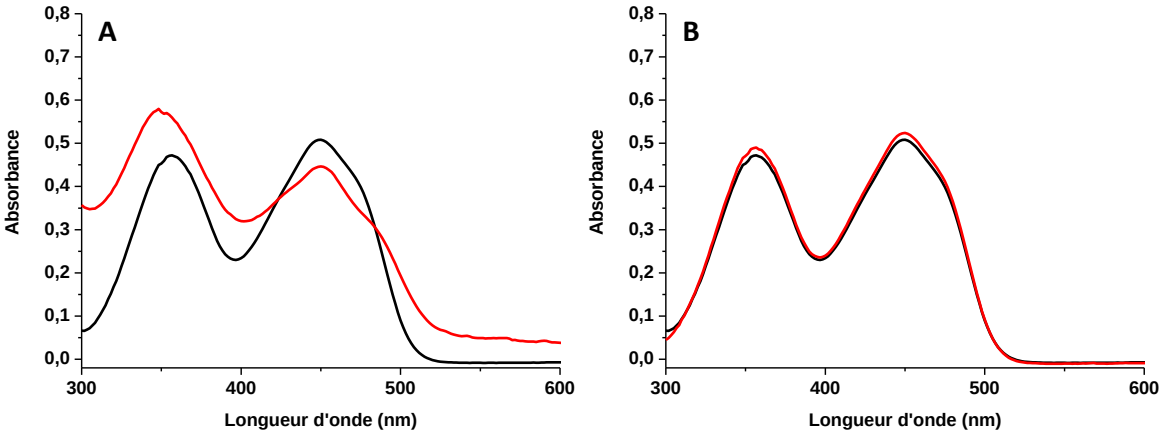


Figure VI.3 : Spectres UV-Visible de solutions de FMN dans l'eau à 50 µM en présence de $N(Et)_3$ (A) en absence de polymère (——) et en présence de PEIFg 0.20/0.30 (——) et (B) en absence de polymère (——) et en présence de PEIcom (——).

Afin de confirmer cette incorporation, des spectres de fluorescence, à la fois de la FMN et de la riboflavine, ont été mesurés lors de l'addition d'une quantité croissante de PEIFg 0.20/0.30 (**Figure VI.4**).[12]

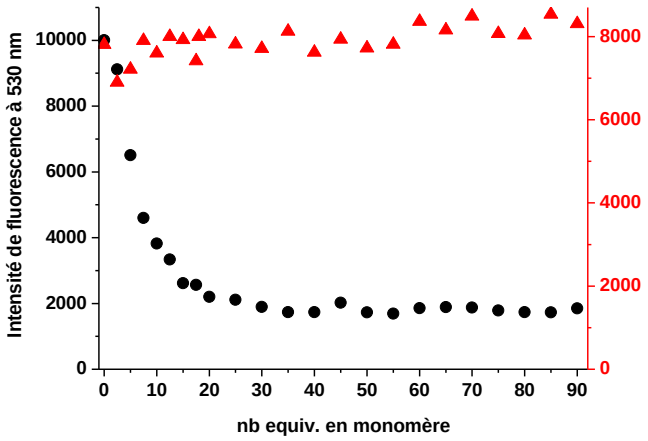


Figure VI.4 : Intensité de fluorescence à 530 nm de solutions à 1 µM de FMN (●) ou de riboflavine (▲) après excitation à 450 nm en présence d'une quantité croissante de PEIFg 0.20/0.30 dans l'eau.

La **Figure 4** montre que seule la fluorescence de la FMN est éteinte par la présence du polymère, ce qui confirme que la FMN est présente dans un environnement hydrophobe au sein du polymère fonctionnalisé et voit sa fluorescence absorbée par son environnement direct, tandis que la riboflavine reste en solution et voit sa fluorescence inchangée. De plus, l'extinction de la fluorescence de la FMN est totale à partir d'une quantité de polymère équivalente à 25 équivalents de monomère, ce qui correspond à environ 5 équivalents de guanidinium par FMN.

II-B) Etude de la réduction de la FMN par NADH dans l'eau

Une fois la FMN enfouie dans le microenvironnement localement hydrophobe du PEI modifié, sa réactivité avec NADH a été étudiée dans l'eau. Comme on pouvait s'y attendre, lorsqu'une solution 200 µM ou 500 µM de NADH dans l'eau est ajoutée à une solution aqueuse de FMN (50 µM), le transfert d'ions hydrure entre les deux molécules n'a pas lieu, et aucune réduction de la FMN n'est observée (**Figures VI.5 A et VI.6**). Inversement, lorsque la FMN (50 µM) est incorporée dans le PEI modifié, l'addition de NADH (200 µM) à la solution induit une diminution de l'absorbance à 470 nm, ce qui indique une réduction de la FMN. Cette réduction en $FMNH_2$ est totale au bout de 2 heures (**Figure VI.5 B et VI.6**).[13] De plus, il apparait que la réduction semble se faire en deux temps, une première phase très rapide dans les 5 minutes, suivie d'une phase plus lente pour obtenir une réduction complète au bout de deux heures (**Figure VI.6**).

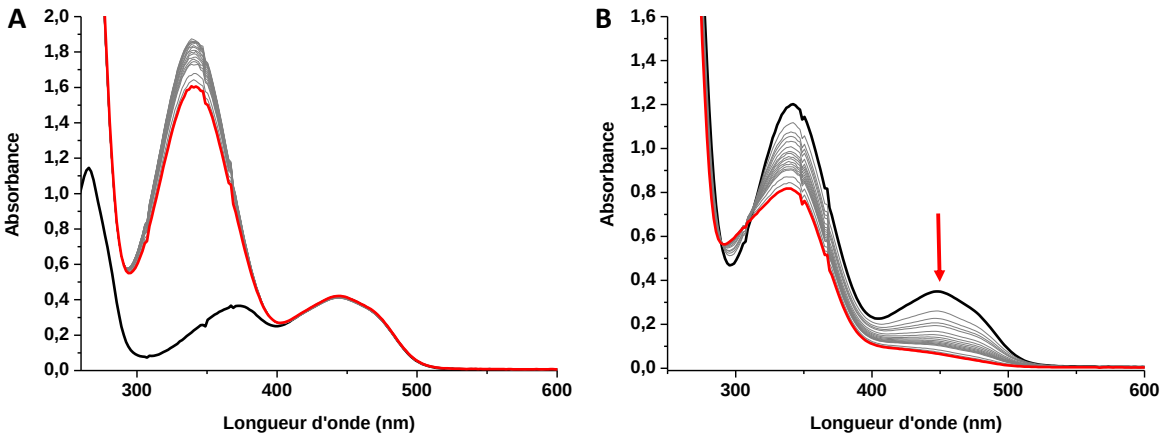


Figure VI.5 : (A) Evolution du spectre UV-Visible d'une solution de FMN 50 µM dans l'eau désoxygénée en présence de NADH (500 µM) : (——) t=0, (——) t_{final} = 2 h. (B) Evolution du Spectre UV-Visible d'une solution désoxygénée de FMN 50 µM dans l'eau en présence de contenant PEIFg 0.20/0.30 (1,25 mM en monomère) et de NADH (200 µM) ; (——) t=0, (——) t_{final} = 2 h.

La **Figure VI.6** montre également que la réduction ne se fait pas lorsque la FMN est mise en présence du polymère modifié PEIFg 0.20/0.30 mais en absence de NADH. La réduction de FMN par NADH n'est donc effective que lorsque les trois composants FMN, NADH et PEIFg 0.20/0.30 sont réunis en solution. L'absence d'un seul des trois composants suffit à empêcher la réduction.

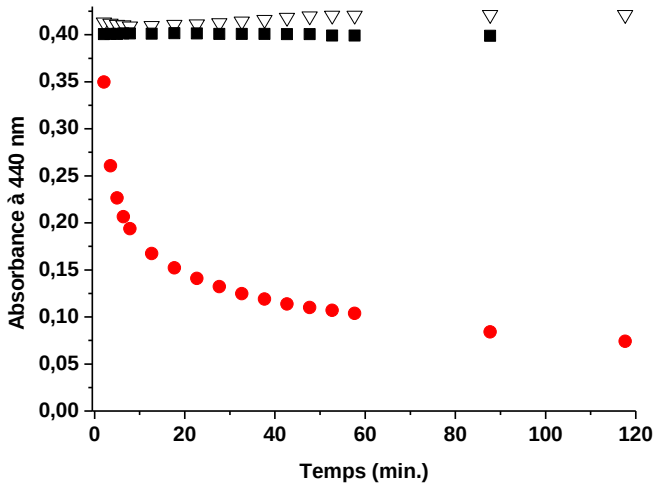


Figure VI.6 : Suivi de la réduction de la FMN (50 µM) en fonction du temps à 440 nm, après ajout de NADH (500 µM) dans l'eau désoxygénée seulement (▽), après ajout de NADH (200 µM) en présence du PEIFg 0.20/0.30 (1,25 mM en monomère) (●), en présence du polymère modifié (1,25 mM) seul, sans NADH (■).

L'utilisation du polymère commercial dans les mêmes conditions permet également la réduction totale de la FMN dans des gammes de temps semblables. Au contraire, l'utilisation d'un polymère modifié par des groupements carboxylate chargés négativement (PEIFac 0.6/0.6) ne permet pas cette réduction. Ceci confirme le fait que la protonation des amines du polymère en ammonium permet l'incorporation de la FMN dans le PEIcom et facilite sa réduction alors que les charges négatives portées par les groupements carboxylate du PEIFac 0.6/0.6 empêchent l'incorporation de la FMN en son sein, vraisemblablement par répulsion électrostatique, et donc sa réduction (**Figure VI.7**).

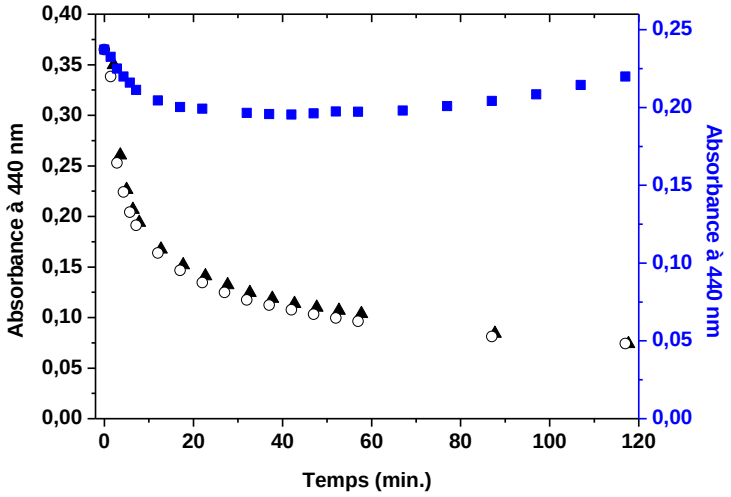


Figure VI.7 : Réduction de la FMN par NADH : évolution de l'absorbance à 440 nm de la FMN 50µM dans l'eau, en fonction du temps, en présence : de PEIFg 0.20/0.30 (1.25mM) (○), de polymère commercial (1,25 mM) (▲) et de polymère carboxylate PEIFac (0.6/0.6) (1,25 mM) (■).

L'information principale mise en avant par cette expérience est que l'incorporation de la FMN au sein de poches hydrophobes de la structure tridimensionnelle du polymère grâce à des interactions électrostatiques spécifiques est nécessaire à la réduction de la FMN, puisque le PEIFac 0.6/0.6 ne permet pas cette réduction. Pour vérifier l'importance de la structuration tridimensionnelle du polymère, Il était nécessaire de vérifier que la réduction de la FMN par NADH n'était pas catalysée en présence des monomères correspondants en solution. Ceci a pu être montré clairement**,** puisqu'en en présence d'éthylènediamine en solution (**Figure VI.8, triangles bleus)**, aucune réduction de la FMN par NADH n'a pu être observée.

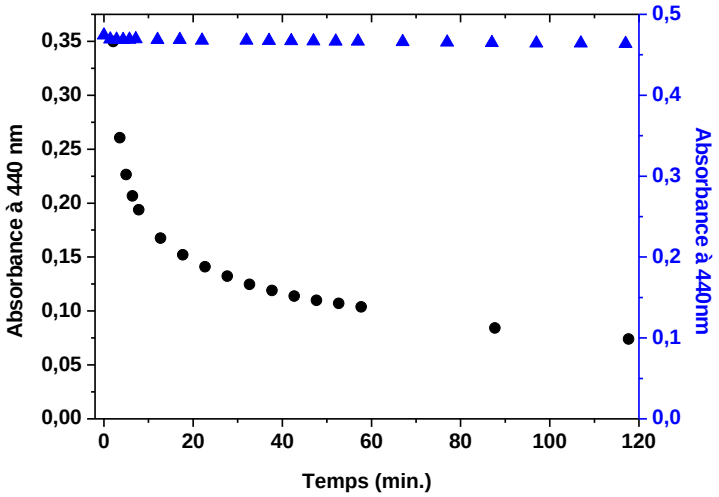


Figure VI.8 : Réduction de la FMN par NADH : évolution de l'absorbance à 440 nm de la FMN 50µM dans l'eau, en fonction du temps, en présence d'éthylène diamine (1.25mM) (▲) ou de PEIFg 0.20/0.30 (1,25 mM) (●).

Ces résultats montrent non seulement que les monomères seuls ne favorisent pas la réduction, mais aussi que la structure supramoléculaire formée par interaction entre la FMN et le polymère est indispensable au bon fonctionnement du système. Les résultats obtenus avec le polymère carboxylate et l'éthylène diamine démontrent incontestablement la nécessité de l'incorporation de la FMN dans le polymère pour que sa réduction soit complète.

Dans les **Figures VI.7** et **VI.8**, la différence d'intensité de l'absorbance pour des concentrations identiques en FMN est due à la différence d'hydrophobicité des différents polymères modifiés utilisés. En effet ce comportement a déjà été rapporté pour l'utilisation du Nile Red par exemple.[14,15]

Les premières expériences de réduction de FMN par NADH ayant été menées dans l'eau, il semblait important d'étudier l'effet du pH sur notre système. La **Figure VI.9** montre le suivi de la réduction de la FMN incorporée dans le polymère PEIFg 0.20/0.30 pour des pH compris entre 6,5 et 8,0. D'une façon générale, on peut observer sur la **Figure VI.9 (A)** que la réduction est d'autant plus efficace que le pH est acide. Par ailleurs, on remarque qu'au-dessus d'un pH égal à 7,5 la réduction de la FMN n'est pas totale. Si l'on considère maintenant la vitesse initiale d'oxydation du NADH à 340 nm (qui est plus facile à mesurer que la réduction de la FMN), on observe que la vitesse est optimale dans l'eau distillée contenant du PEIFg 0.20/0.30 (pH 5,5) puis décroit pour des valeurs de pH comprises entre 6,5 et 8 (**Figure VI.9 B**). D'autre part, l'ajout de NEt_3 ou NaOH dans l'eau distillée inhibe totalement la réduction de la FMN.

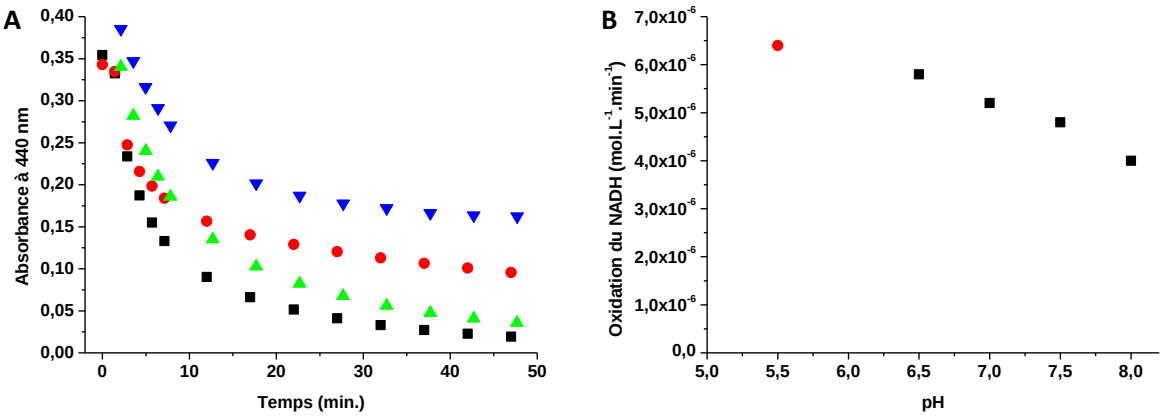


Figure VI.9 : Influence du pH sur la Réduction de la FMN par NADH : (A) Evolution de l'absorbance à 440 nm de la FMN 50µM dans l'eau, en fonction du temps, après ajout de NADH (4 equiv.) en présence de PEIFg 0.20/0.30 (1.25mM), dans des tampons MES pH 6.5 (■) et HEPES pH 7 (●), pH 7.5 (▲) et pH 8 (▼) (B) Vitesse initiale d'oxydation du NADH mesurée à 340 nm pour les mêmes réactions.

Nous pouvons donc conclure que l'utilisation d'une solution tamponnée n'influence que faiblement la vitesse de réduction de la FMN par NADH. De plus, lorsqu'on augmente le pH, l'efficacité de la réaction diminue, il faut donc travailler à pH acide car les amines du polymère ainsi que les groupements guanidinium sont protonés, favorisant l'interaction entre le plymère modifié et la FMN. Nous avons donc décidé de poursuivre nos études dans l'eau distillée à un pH égal à 5.

Grâce aux expériences d'extinction de fluorescence, il a été possible de déterminer que l'incorporation de la FMN était totale lorsque 24 équivalents en monomère de PEIFg 0.20/0.30 étaient additionnés. Il fallait donc ensuite étudier l'influence de la concentration de NADH sur la réduction de la FMN. La **Figure VI.10** montre les vitesses initiales d'oxydation de NADH, à des concentrations croissant jusqu'à 50 µM, avec une concentration en FMN de 5µM. En l'absence de polymère, la vitesse d'oxydation de NADH par la FMN en solution est pratiquement nulle et n'augmente quasiment pas dans la gamme de concentrations étudiée. En présence de polymère PEIFg 0.20/0.30 (125 µM en monomère), on forme alors la réductase artificielle, on observe que la vitesse d'oxydation reste très faible pour une concentration de NADH inférieure à 10 µM. Elle augmente ensuite rapidement pour atteindre un plateau à partir d'une concentration de 20 µM en NADH. Ainsi, la saturation de l'enzyme artificielle par son « substrat » NADH est atteinte pour des concentrations supérieures à 20 µM, mais la courbe de saturation observée, en forme de sigmoïde, n'est pas caractéristique d'une cinétique de type Michaelis-Menten. Il est difficile d'interpréter ce comportement, mais l'on peut proposer qu'à faible concentration, le NADH interagisse avec l'ensemble des groupements guanidinium du polymère, qui ne sont pas forcément à proximité d'une FMN. Le positionnement du NADH par rapport à la FMN étant primordial pour le transfert d'hydrure,[16,17,18,19] la réactivité n'apparait qu'au moment où le polymère commence à être saturé en NADH et donc le NADH idéalement placé à proximité de la FMN. Ce profil cinétique ressemble à celui observé pour une enzyme de type allostérique. Cependant, il s'agirait plus d'un effet provenant d'un délai de réactivité généré par la nécessité de saturer l'ensemble des groupements guanidinium.

L'interaction entre les groupements phosphate du NADH et les groupements guanidinium du polymère étant relativement fortes,[9,8] on peut concevoir que cette saturation persiste au sein du polymère s'il n'y a pas de FMN directement à proximité. Cependant, après transfert d'hydrures, le NADH évolue vers sa forme oxydée cationique NAD^+, et va donc perdre, en partie, son affinité pour l'environnement cationique du polymère, ce qui va favoriser son échange avec une nouvelle molécule de NADH. On obtient alors un système qui se comporte comme une enzyme possédant des sites actifs avec une certaine spécificité pour NADH, et qui présente donc un effet de saturation à concentration croissante.

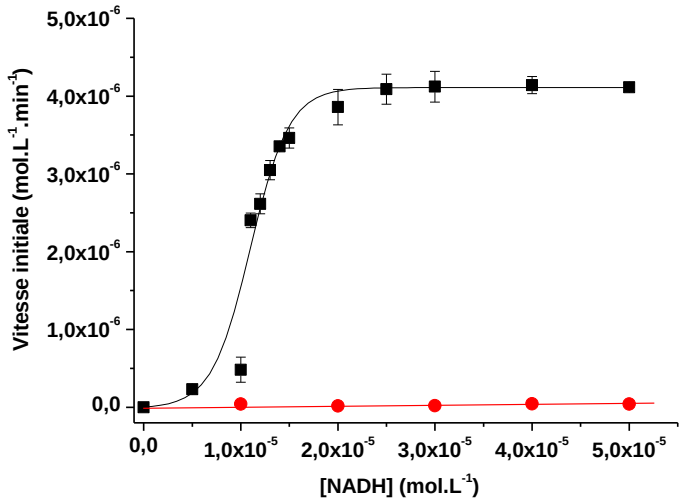


Figure VI.10: Vitesses initiales d'oxydation du NADH en fonction de sa concentration dans une solution mesurées à 340 nm, dans une solution contenant de la FMN (5µM) et du PEIFg 0.20/0.30 (125 µM monomère) (■) ou de la FMN (5µM) seule (●).

Les vitesses initiales optimales obtenues sur le palier pour l'oxydation du NADH par la FMN en présence, et en absence de polymère modifié, sont respectivement de 4,00 (± 0,10) × 10^{-6} mol.L^{-1}.min^{-1} and 2,00 (± 0,20) × 10^{-8} mol.L^{-1}.min^{-1}. L'insertion de la FMN dans le polymère induit donc une accélération d'un facteur 200 de la réduction de NADH par FMN. Afin de comparer ce système polymérique à d'autres oxydo-réductases utilisant le couple NADH/FMN, nous avons également calculé la constante de vitesse de second ordre de la réaction k = 500 M^{-1} s^{-1}, qui est plus lente de seulement trois ou quatre ordres de grandeur comparée aux oxydoréductases naturelles spécifiques à FMN que sont respectivement celles de B. Harveyi[20] et P. Putida,[21] mais 7 fois plus rapide que l'enzyme semi-synthétique Flavo-papaïne développée par le groupe de Kaiser.[22,23] Par la suite, des tests utilisant jusqu'à 40 équivalents de NADH/FMN ont été réalisés sans que l'on constate de variation significative de la vitesse initiale de la réaction, les valeurs restant proches de celle observée au plateau, 4,00 (± 0,10) × 10^{-6} mol.L^{-1}.min^{-1}. La réaction est donc optimale pour l'addition de 4 équivalents de NADH (20 µM) pour 1 équivalent de FMN (5 µM), et n'est pas améliorée par ajout de concentrations plus élevées de NADH. Lors des expériences suivantes, nous utiliserons donc

4 équivalents de NADH par rapport à la FMN. Nous éviterons ainsi une surconsommation de NADH, tout en atteignant l'activité maximale correspondant au plateau.

La FMN n'étant pas réduite par le NADH seul en solution, nous pouvons suggérer deux effets possibles du PEI modifié pour favoriser cette réaction. En première hypothèse, le polymère peut favoriser l'interaction des deux molécules dans son microenvironnement localement hydrophobe, par interaction des groupements guanidinium avec les groupements phosphate de la FMN et du NADH. Une autre hypothèse est que l'incorporation de la FMN dans le microenvironnement du polymère pourrait agir sur son potentiel d'oxydo-réduction, et permettre sa réduction par le NADH de manière thermodynamique. Afin d'éclaircir ce point, nous avons effectué une analyse électrochimique de la FMN seule en solution, et en présence de polymère. En parallèle, la même expérience a été réalisée avec la riboflavine (**Figure VI.11**).

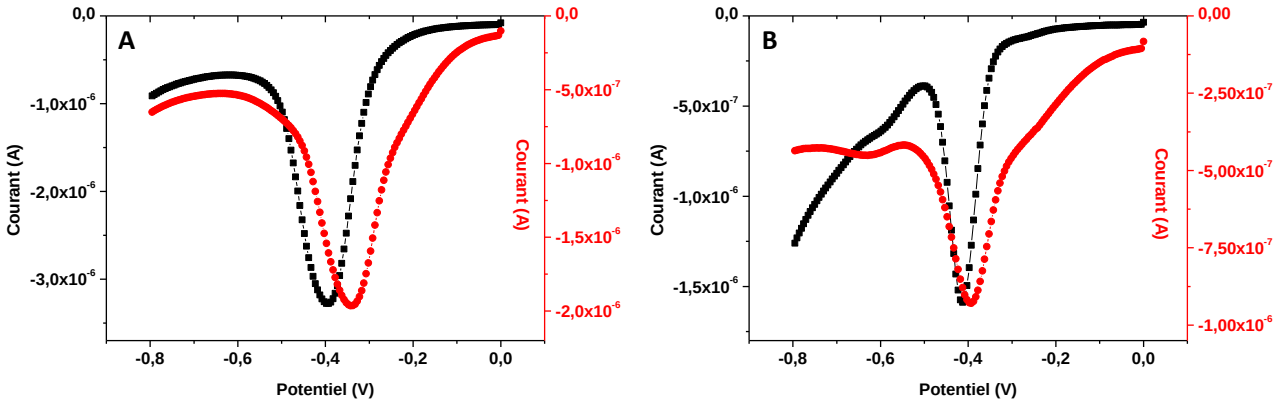


Figure VI.11 : Voltamétrie à signaux carrés de la FMN (A) et de la riboflavine (B), 0.1 mM dans un tampon HEPES (10mM, pH 7) et KCl (10mM) (■) et en présence de polymère PEIFg 0.20/0.30 (2.5mM en monomère) sans KCl (●). Conditions : Saut de potentiel 0.005V, amplitude -0.020V, fréquence 25 Hz.

En solution aqueuse, le potentiel de réduction mesuré par des expériences de voltamétrie à signaux carrés de la FMN dans un tampon HEPES pH 7est de -395 mV par rapport à Ag/AgCl (-203 mV par rapport à NHE). En présence de polymère, ce potentiel est décalé à -330 mV par rapport à Ag/AgCl (-138 mV par rapport à NHE). Ce déplacement de 65 mV indique clairement que le milieu hydrophobe, créé par le PEI modifié, exerce une influence importante sur le potentiel de réduction de la FMN. A titre de comparaison, la même expérience réalisée avec la riboflavine ne conduit qu'à un déplacement de 10 mV, ce qui corrèle bien avec sa mauvaise incorporation dans le polymère. Le potentiel redox thermodynamique pour le couple NAD^+/NADH a précédemment été estimé à -315 mV vs NHE, sur la base de mesures de constantes d'équilibre pour certaines réactions catalysées par des enzymes.[5] Ce potentiel thermodynamique est donc suffisamment bas pour réduire aussi bien la FMN en solution que la FMN incorporée dans le polymère, ce qui implique que la génération de l'activité réductase dans le polymère n'est pas induite par le décalage de 65 mV observé pour son potentiel de réduction. On peut alors penser que le rôle principal du polymère soit plutôt de réunir les deux protagonistes de la réaction dans le même microenvironnement localement hydrophobe, pour ainsi faciliter le transfert d'ions hydrure dU NADH sur la FMN, en abaissant l'énergie de l'état

de transition dans cette réaction. Cette hypothèse est soutenue par les résultats obtenus avec les modèles supramoléculaires de type Flavine/NADH, qui démontrent clairement l'importance d'une disposition relative optimale des deux partenaires redox pour que le transfert d'ions hydrure soit le plus efficace possible.[16]

Finalement, une fois réduite par NADH, la FMN est facilement ré-oxydée par exposition au dioxygène de l'air. La FMN peut alors être de nouveau réduite par l'ajout de NADH, puis à nouveau ré-oxydée par O_2. Le système peut ainsi réaliser de multiples cycles de catalyse de la réduction de la FMN par NADH en présence d'O_2.

Par ailleurs, si la FMN est d'abord réduite sous argon, puis que la solution est exposée à l'air libre en présence d'un excès de NADH (50 équivalents), ce dernier est entièrement consommé en 5 heures (**Figure VI.12,(▼)**). Nous pouvons alors affirmer que la réduction catalytique de la FMN est possible à l'air libre et ceci de façon efficace.

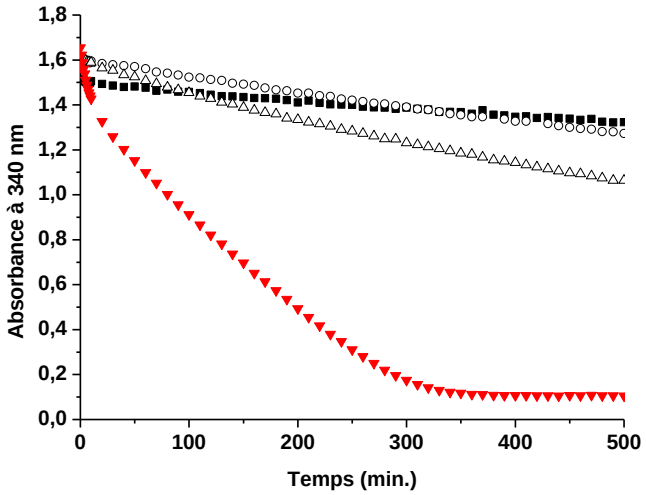


Figure VI.12 : Oxydation de NADH par FMN : Absorbance de NADH à 340 nm en fonction du temps : 2,5 mM dans l'eau (■), en présence de PEIFg 0.20/0.30 (1.25 mM) et de FMN (50 µM) (▼), de FMN seule (50µM) (△), de PEIFg 0.20/0.30 seul (1.25mM) (○).

Plusieurs contrôles ont été réalisés. Ainsi, NADH seul en solution (2.5 mM) s'oxyde lentement (**Figure VI.12** (■)). Lorsque PEIFg 0.20/0.30 (1.25mM) seul est ajouté, une consommation de NADH légèrement moindre est observée (**Figure VI.12** (○)) de même que lorsque FMN seule (50 µM) est ajoutée (**Figure VI.12** (△)). Dans ces deux cas, une oxydation non négligeable de NADH est donc observée, mais la vitesse de réduction reste beaucoup plus faible que celle observée en présence simultanément de PEIFg 0.20/0.30 et de FMN. En effet, la consommation complète de NADH s'effectue en 5 heures en présence de la réductase artificielle (PEIFg/FMN), alors qu'en présence de FMN seule, seulement 30 % de NADH est consommé au bout de 8 heures de réaction.

Ayant décidé de travailler dans l'eau distillée sans tamponner la solution, l'évolution du pH a été déterminée après ajout de chacun des composants du système (**Figure VI.13**).

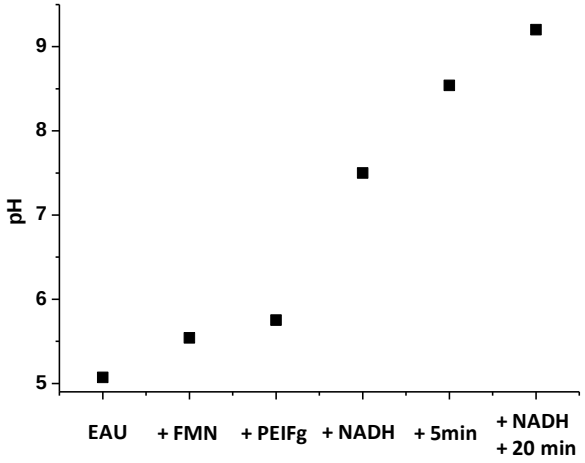


Figure VI.13 : Mesure du pH d'une solution d'eau distillée seule, puis après addition de FMN (50µM), suivie de l'addition de PEIFg 0.20/0.30 (1.25mM), puis de NADH (200µM).

L'eau distillée ayant un pH initial égal à 5, l'addition de la FMN (50 µM) et du PEIFg 0.20/0.30 (1.25 mM), conduit à une faible évolution du pH qui atteint une valeur de 5,75. En revanche, après ajout de NADH, le pH augmente instantanément jusqu'à un pH égal à 7.52, puis continue de croitre pour atteindre une valeur de 8.54 en moins de 5 minutes. Cette expérience montre ainsi que le changement de pH, lié au transfert de protons couplé au transfert d'électrons, est très rapide. Lorsqu'ensuite 4 équivalents de NADH sont rajoutés, le pH de la solution atteint 9.2, en 20 minutes.

Comme montré dans le **Schéma VI.5**, le cycle catalytique impliquant la réduction de FMN par NADH puis sa ré-oxydation par O_2 consomme trois protons. Le premier sert à protonner $FMNH^-$ formé après le transfert de l'hydrure provenant du NADH pour conduire à la FMN réduite, le deuxième protonne l'hydroperoxyde de flavine formé par activation réductrice du dioxygène de l'air pour conduire au départ d'une première molécule d'eau et, enfin le troisième proton est nécessaire pour protonner l'atome d'oxygène restant sur la FMN qui, après prototropie, est libéré sous la forme d'une seconde molécule d'eau pour redonner la FMN oxydée. Lors de cette expérience, la concentration du NADH ajouté est de 200 µM, on s'attend donc à consommer 3 fois plus de protons (soit une diminution de leur concentration de 600 µM) et donc à former 600 µM de OH^-. Si l'on forme 600 µM de OH^-, le pH de la solution devrait être de 10,8 ($pH = 14 + \log [OH^-] = 14 – 3,2 = 10,8$), hors ce n'est pas le cas. En effet, nous observons une stagnation du pH à 8,50. Nous n'avons donc consommé que 3,16 µM de protons ($\Delta pH = 14 - 8,50 = 5,5$; $pH = - \log [H_3O^+] = 10^{-pH}$ d'où $[H_3O^+] = 10^{-5,5} = 3,16$ µM). Il apparaît donc que seulement une faible quantité des protons consommés (3,16 µM) provient de l'eau. La plus grande partie des protons provient donc vraisemblablement des ions ammonium du polymère modifié, qui joue ainsi le rôle d'un tampon local. De plus, la faible variation du pH observée lors du deuxième ajout de quatre équivalents de NADH laisse supposer qu'il y a un déficit en protons dans la solution ainsi que sur le polymère, qui empêchant la réalisation d'un grand nombre de cycles catalytiques. Par ailleurs, il nous a paru intéressant de savoir si le transfert de protons constituait l'étape cinétiquement déterminante du mécanisme de réduction de la FMN par

NADH. Nous avons donc mesuré l'effet isotopique sur la cinétique de la réduction de la FMN en réalisant les réactions dans H_2O et dans D_2O. La **Figure VI.14** montre que la cinétique de réduction n'est que très peu modifiée dans D_2O avec un effet isotopique sur la vitesse initiale de réduction KIE calculé par le rapport k_H/k_D égal à 1,8.

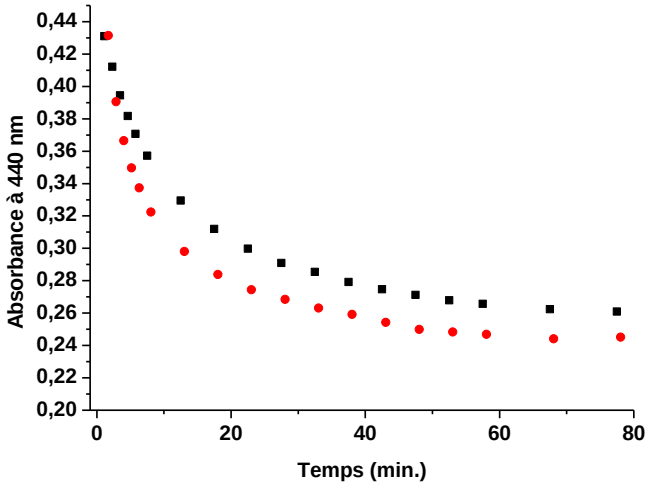


Figure VI.14 : Suivi de la réduction d'une solution de FMN (50µM) par NADH (200µM) en présence de PEIFg 0.20/0.30 (1.25mM) en solution dans D_2O (■) et dans H_2O (●).

Une valeur de KIE proche de 1 concorde avec l'idée que le transfert de protons n'est pas l'étape cinétiquement déterminante, bien qu'il joue un rôle important dans cette réaction comme constaté lors de l'expérience de mesure du pH de la solution après ajout de chacun des composants de l'enzyme artificielle. Il est donc vraisemblable que le transfert d'hydrures constitue l'étape cinétiquement déterminante de la réaction, mais cet hydrure étant porté par un atome de carbone il n'est pas échangeable avec le deutérium de D_2O, il n'est donc pas possible de calculer un KIE pour le transfert d'hydrures. Le **Schéma VI.6** présente le mécanisme proposé pour la réduction de la FMN, qui met en jeu un transfert d'hydrures couplé à une protonation, cette dernière n'étant pas l'étape limitante de la réaction.

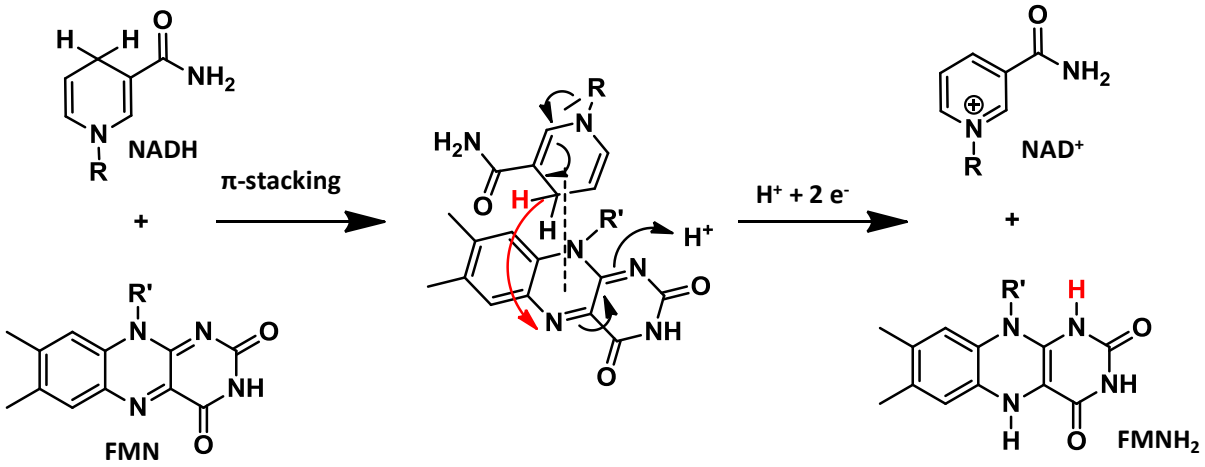


Schéma VI.6 : Mécanisme supposé pour le transfert d'hydrures entre FMN et NADH.

III) Conclusion

Pour conclure, nous avons montré que l'incorporation de la FMN dans un PEI modifié avec des groupements guanidinium et octyle permettait d'obtenir une réductase artificielle très efficace présentant un effet de saturation avec une concentration en substrat croissante. Nous avons également démontré que l'architecture supramoléculaire de ce système était indispensable à son bon fonctionnement et que des conditions légèrement acides semblaient être favorables à cette activité. Au vu de la capacité de cette enzyme artificielle (PEI modifié + FMN) à collecter efficacement les électrons provenant du NADH, nous avons également tenu à examiner le transfert éventuel de ces électrons vers un partenaire redox. Cette partie est développée dans le chapitre suivant.

Références

(1) Hamelin, O.; Guillo, P.; Loiseau, F.; Boissonnet, M.-F.; Ménage, S. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (17), 7952.
(2) Avenier, F.; Herrero, C.; Leibl, W.; Desbois, A.; Guillot, R.; Mahy, J.-P.; Aukauloo, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (13), 3634.
(3) Simaan, A. J.; Mekmouche, Y.; Herrero, C.; Moreno, P.; Aukauloo, A.; Delaire, J. A.; Réglier, M.; Tron, T. *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17* (42), 11743.
(4) Tan, S. L. J.; Kan, J. M.; Webster, R. D. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (44), 13755.
(5) Saleh, F. S.; Rahman, M. R.; Okajima, T.; Mao, L.; Ohsaka, T. *Bioelectrochemistry* **2011**, *80* (2), 121.
(6) Abbas, C. A.; Sibirny, A. A. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2011**, *75* (2), 321.
(7) Sevrioukova, I. F.; Li, H.; Zhang, H.; Peterson, J. A.; Poulos, T. L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (5), 1863.
(8) Schug, K. A.; Lindner, W. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (1), 67.
(9) Perreault, D. M.; Cabell, L. A.; Anslyn, E. V. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5* (6), 1209.
(10) Greaves, M.; Galow, T.; Rotello, V.; others. *Chem. Commun.* **1999**, 785.
(11) Jordan, B. J.; Cooke, G.; Garety, J. F.; Pollier, M. A.; Kryvokhyzha, N.; Bayir, A.; Rabani, G.; Rotello, V. M. *Chem. Commun.* **2007**, 1248.
(12) Agasti, S. S.; Caldwell, S. T.; Cooke, G.; Jordan, B. J.; Kennedy, A.; Kryvokhyzha, N.; Rabani, G.; Rana, S.; Sanyal, A.; Rotello, V. M. *Chem. Commun.* **2008**, 4123.
(13) Simtchouk, S.; Eng, J. L.; Meints, C. E.; Makins, C.; Wolthers, K. R. *FEBS J.* **2013**, *280* (24), 6627.
(14) Okamoto, A.; Tainaka, K.; Fujiwara, Y. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (9), 3592.
(15) Meinershagen, J. L.; Bein, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (2), 448.
(16) Reichenbach-Klinke, R.; Kruppa, M.; König, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (44), 12999.
(17) Gassner, G.; Wang, L.; Batie, C.; Ballou, D. P. *Biochemistry* **1994**, *33* (40), 12184.
(18) Powell, M. F.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105* (4), 1014.
(19) Mestres, J.; Duran, M.; Bertran, J. *Bioorganic Chem.* **1996**, *24* (1), 69.
(20) Jablonski, E.; DeLuca, M. *Biochemistry* **1977**, *16* (13), 2932.
(21) Kuznetsov, V. Y.; Blair, E.; Farmer, P. J.; Poulos, T. L.; Pifferitti, A.; Sevrioukova, I. F. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (16), 16135.
(22) Levine, H. L.; Kaiser, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100* (24), 7670.
(23) Kaiser, E. T.; Lawrence, D. S. *Science* **1984**, *226* (4674), 505.

CHAPITRE VII

Chapitre VII : Assemblage de l'enzyme artificielle

I) Utilisation de complexes de ruthénium photosensibles

L'utilisation de complexes de ruthénium s'étant déjà montrée efficace pour la réduction de complexes binucléaires de fer sous irradiation, en solvant organique,[1] nous avons décidé d'étudier la réactivité en phase aqueuse de ce même complexe de ruthénium $[Ru^{II}(bpy)_3]Cl_2$ associé au même complexe de fer $[Fe^{III}_2(N\text{-}EtHPTB)(CH_3O)(CH_3OH)(H_2O)_2]$ $(ClO_4)_4$. La première étape était donc de vérifier si le complexe binucléaire de fer en solution dans l'eau pouvait réagir avec H2O2 pour générer un intermédiaire bis-Fe(III)-peroxo, comme il le fait en solvant organique. Cette réaction a été suivie par spectroscopie UV-Visible. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure VII.1**. Ils montrent clairement l'apparition d'une bande de transfert de charge à 560 nm lors de l'ajout de 10 équivalents d'H_2O_2 à la solution de complexe binucléaire de fer dans l'eau. Cette bande est caractéristique d'un intermédiaire réactionnel de type bis-Fe(III)-peroxo, dont la formation est donc possible par réaction d'un complexe binucléaire de Fe(III) avec H_2O_2 dans l'eau.

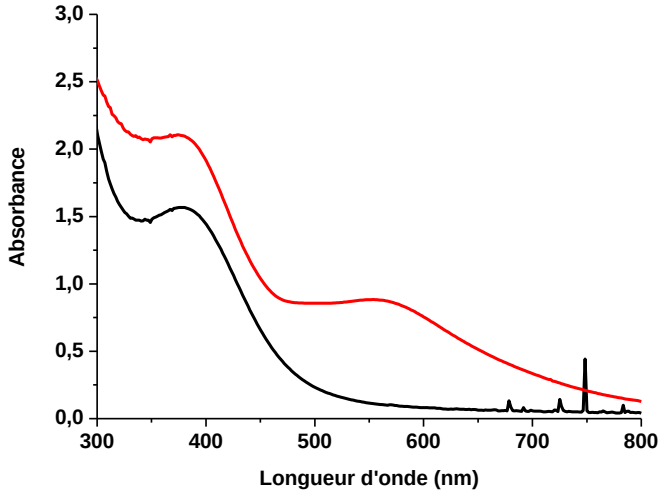


Figure VII.1 : Spectres UV-Visible d'une solution de complexe $[Fe^{III}_2(N\text{-}EtHPTB)(CH_3O)(CH_3OH)(H_2O)_2](ClO_4)_4$ dans l'eau (0,5mM) avant (——) et 5 minutes après ajout de 10 équivalents de H_2O_2 (——).

L'étape suivante consistait à démontrer que la formation de cet intermédiaire était possible par réaction du complexe $[Fe^{III}_2(N\text{-}EtHPTB)(CH_3O)(CH_3OH)(H_2O)_2](ClO_4)_4$ réduit avec O_2. Pour cela, une solution à 0,5 mM du complexe de fer(III) dans l'eau, en présence d'un équivalent de complexe de ruthénium et de 100 équivalents de triéthylamine, a été dégazée par cinq cycles vide/argon de la solution gelée puis irradiée pendant 10 minutes à 450 nm. Le spectre UV-Visible de la solution résultante a ensuite été enregistré avant et après exposition au dioxygène de l'air. Dans ces

conditions, aucune évolution du spectre du complexe de départ n'a pu être observée. Cela signifie donc que le complexe type bis-Fe(III)-peroxo ne se forme pas, soit parce que la réduction du complexe bis-Fe(III) par le complexe de ruthénium photoactivé n'a pas lieu, soit parce que le complexe réduit bis-fe(II) ne réagit pas avec O_2 dans ces conditions. Nous avons donc décidé de nous tourner vers le système mis au point au chapitre précédent, qui implique l'utilisation du NADH comme réducteur en présence d'une réductase artificielle composée de la FMN incorporée dans un polymère fonctionnalisé par des groupements guanidinium et octyle, PEIFg.

II) Utilisation de la FMN incorporée au sein des polymères

II-A) Réduction de porphyrines de manganèse(III)

Après avoir démontré l'oxydation de NADH par la FMN incorporée dans le polymère, nous nous proposons d'examiner le transfert éventuel des électrons vers un partenaire redox, comme la *méso*-5,10,15,20-tétrapyridiniumylporphyrine de manganèse (III) (Mn(III)TPyP) soluble dans l'eau**.** Le choix de porphyrines de manganèse comme premier cofacteur métallique étudié a été essentiellement guidé par les propriétés spectroscopiques de ces complexes qui présentent des bandes d'absorption, appelées bandes de Soret, à 470 nm et 440 nm, dont les coefficients d'absorption molaire sont extrêmement élevés (ε de l'ordre de 10^5 $mol.L^{-1}.cm^{-1}$) et observables, même en présence de FMN.

Dans une expérience type, une quantité stœchiométrique de Mn(III)TPyP a été ajoutée à une solution aqueuse de FMN (10 µM), puis 4 équivalents de NADH ont été ajoutés. La réaction est alors suivie en enregistrant le spectre UV-Visible de la solution résultante en fonction du temps (**Figure VII.2**).

II-A-1) Utilisation du polymère modifié PEIFg 0.20/0.30

En l'absence du polymère modifié, le spectre d'absorbance caractéristique de la porphyrine de Mn(III), Mn(III)TPyP, ne change pas lors de l'addition de NADH, et reste stable durant les 60 minutes suivantes (**Figure VII.2 A**). Inversement, lorsque la même expérience est réalisée en présence du polymère modifié PEIFg 0.20/0.30, la bande d'absorption à 470 nm est progressivement remplacée par une nouvelle bande à 440 nm, caractéristique de la porphyrine de manganèse réduite Mn(II)TPyP (**Figure VII.2 B**).[2] Au bout de 2 minutes, la réduction est complète. L'apparition de points isobestiques à 405 nm, 460 nm et 570 nm au cours de ce processus démontre également la réduction mono-électronique directe de la porphyrine de manganèse (III), sans observation de tout autre intermédiaire (**Figure VII.2 B**).

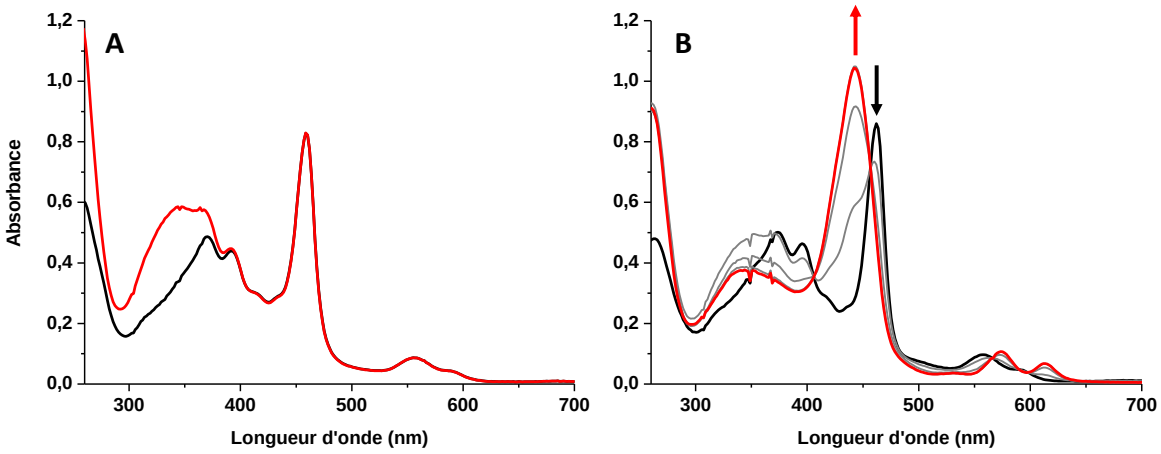


Figure VII.2 : (A) Spectres UV-Visible d'une solution aqueuse désoxygénée de Mn(III)TPyP (10µM) et FMN (10µM) (——) et son évolution pendant une heure après l'addition de NADH (4 équivalents) à 20°C (——), (B) Spectres UV-Visible d'une solution aqueuse désoxygénée de Mn(III)TPyP (10µM) et FMN (10µM) en présence PEIFg 0.20/0.30 (250 µM en monomère) (——) et son évolution pendant deux minutes après l'addition de NADH (4 équivalents) à 20°C (——).

De manière remarquable, lorsque la solution de Mn(II)TPyP obtenue est exposée au dioxygène de l'air, elle est rapidement ré-oxydée en Mn(III)TPyP avec les mêmes points isobestiques que ceux précédemment observés lors du processus de réduction (**Figure VII.3**).

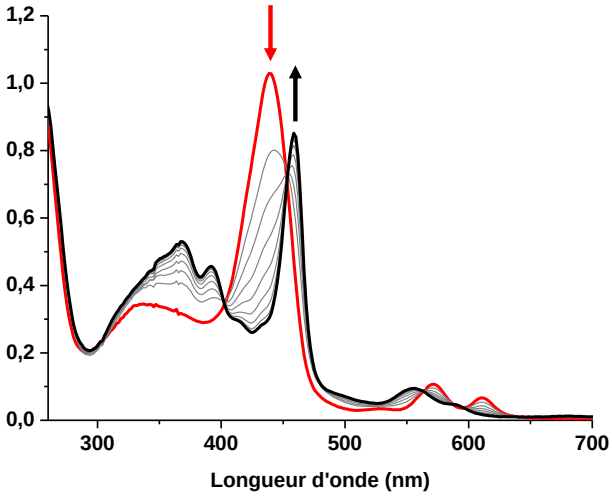


Figure VII.3 : Spectres UV-Visible d'une solution aqueuse désoxygénée de Mn(II)TPyP réduite (10µM) et de FMN (10µM) (——) et son évolution pendant 6 minutes après exposition à O_2 à 20°C (——).

Le passage d'un degré d'oxydation à un autre est également facilement observable à l'œil nu par le passage d'une couleur orange caractéristique de la porphyrine de manganèse(III) à une couleur verte caractéristique de la porphyrine de manganèse(II) (**Figure VII.4**).

Mn(III)TPyP + FMN +PEIFG | Mn(II)TPyP + FMN +PEIFG + NADH

Figure VII.4 : Solution de MnTPyP + FMN + PEIFg 0.20/0.30 avant (gauche) et après réduction (à doite).

Comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, le polymère commercial permet la réduction de la FMN par NADH avec des cinétiques comparables à celles observées avec le polymère modifié PEIFg 0.20/0.30. L'aptitude de ce polymère commercial à faciliter la réduction de la Mn(III)TPyP a donc également été étudiée et comparée à celle du polymère PEIFg 0.20/0.30 (**Figure VII.5**).

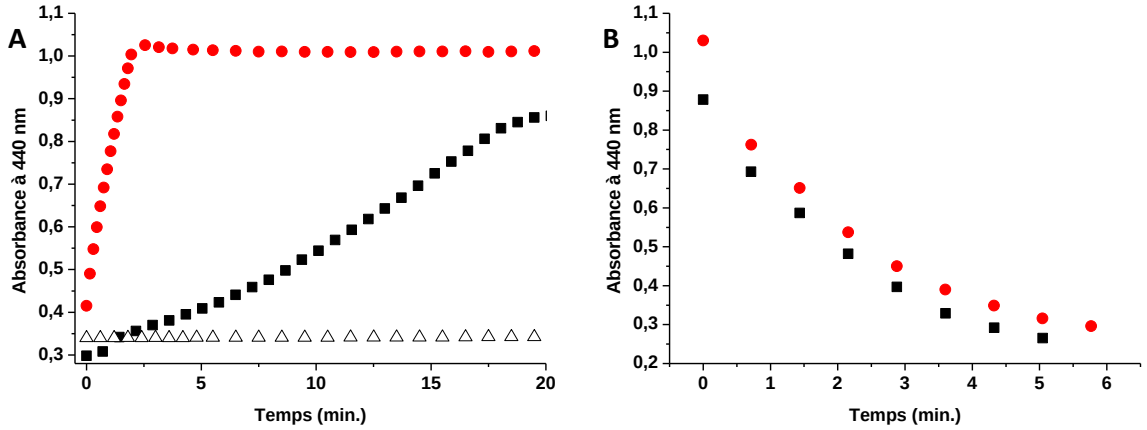


Figure VII.5 : Réduction de Mn(III)TPyP (10 µM) par NADH (4 équiv .) sous atmosphère inerte en fonction du temps : Evolution de l'absorbance à 440 nm caractéristique de Mn(II)TPyP réduite (A) en présence de PEIFg 0.20/0.30 (250 µM) et FMN (10 µM) (●) , en présence de PEI commercial (250 µM de) et FMN (10 µM) (■), en présence de FMN (10 µM) seul (△) . (B) Ré-oxydation de Mn(II)TPyP (10 µM) après exposition au dioxygène de l'air : diminution de l'absorbance à 440 nm en fonction du temps en présence : de PEI modifié (250 µM) (●) de PEI commercial (250 µM) (■).

La **Figure VII.5 A** montre que la réduction de la Mn(III)TPyP, en présence de polymère modifié, est complète dans les deux minutes qui suivent l'addition de NADH (4 équivalents), tandis que pratiquement aucune réduction n'est observée dans l'eau pure. De plus, un contrôle réalisé en utilisant la riboflavine à la place de la FMN en présence de polymère modifié montre que seulement

20 % de la porphyrine a pu être réduite en une heure. Ces deux expériences montrent donc que l'incorporation de la FMN dans le polymère est cruciale pour observer une réduction efficace de la porphyrine de manganèse. Les vitesses initiales de réaction ont été mesurées et sont respectivement de 3,9 (± 0.60) × 10^{-6} $M.min^{-1}$ en présence du polymère modifié, et de 9,65 (± 0.57) x 10^{-10} $M.min^{-1}$ dans l'eau uniquement. Dans ces conditions, les constantes de deuxième ordre correspondantes ont pu être calculées à partir de l'équation v = k [MnTPyP] x [NADH]. Les valeurs obtenues, en présence de PEIFg 0.20/0.30 k_2 = 163 $M^{-1}.s^{-1}$ et dans l'eau seule k_2 = 0,04 $M^{-1}.s^{-1}$, montrent donc que la présence du polymère fonctionnalisé induit une accélération de la réaction par un facteur 4 × 10^3. Si le polymère commercial est utilisé à la place de PEIFg 0.20/0.30, la réaction se produit, mais beaucoup plus lentement qu'en présence du polymère modifié avec une accélération d'un facteur 3 x 10^2 (**Figure VII.5 A**). Ces résultats confirment de nouveau que le polymère commercial, chargé positivement dans l'eau, permet lui aussi l'interaction de la FMN avec NADH, en favorisant le transfert d'ions hydrure. Cependant, le manque de spécificité de l'interaction, combiné à l'absence d'un microenvironnement localement hydrophobe, ralentit considérablement le processus de réduction.

En ce qui concerne la ré-oxydation de la porphyrine de Mn(II), lors de son exposition au dioxygène, celle-ci a lieu à la même vitesse lorsque l'expérience est réalisée avec le polymère commercial ou avec le polymère modifié (**Figure VII.5 B**). Ceci suggère que l'oxydation repose principalement sur la diffusion du dioxygène dans l'eau, et que la porphyrine de manganèse n'est pas incorporée dans le polymère, mais uniformément dispersée dans la solution dans les deux cas.

Les expériences précédentes montrant la réduction monoélectronique de la porphyrine de manganèse(III) suggéraient que cette réaction pouvait impliquer la séparation de la paire d'électrons initialement collectée à partir du NADH sous la forme d'un ion hydrure. Afin de vérifier si notre réductase artificielle (FMN-PEIFg) était réellement capable d'assurer la transformation d'un transfert initial bi-électronique en deux transferts mono-électroniques, nous avons donc décidé de quantifier les électrons transférés au cours du processus, en titrant la quantité de NADH nécessaire pour réduire Mn(III)TPyP par la FMN en présence du polymère modifié (**Figure VII.6**).

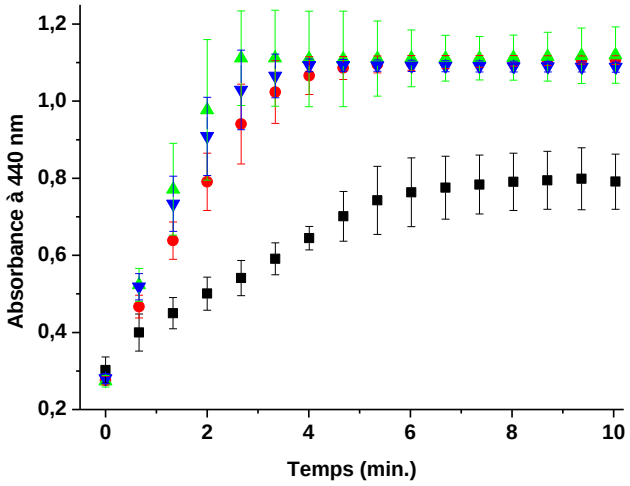


Figure VII.6 : Réduction de Mn(III)TPyP (10 µM) au cours du temps en présence de FMN (10 µM) et de PEIFg 0.20/0.30 (250 µM en monomère) : absorbance de Mn(II)TPyP à 440 nm en fonction du temps lors de l'addition de 0, 25 équiv. (■), 0,5 équiv. (●), 1 équiv. (▲), et 2 équiv . (▼) de NADH dans l'eau désoxygénée à 25°C (toutes les expériences ont été tripliquées).

Les résultats montrent que l'addition d'un minimum de 0,5 équivalent de NADH est nécessaire et suffisant pour réduire complètement la Mn(III)TPyP ; l'ajout de plus grandes quantités de l'agent réducteur permet seulement d'accélérer la cinétique de la réduction. Cette titration montre qu'une paire d'électrons provenant d'une molécule de NADH est suffisante pour réduire deux molécules de porphyrine de manganèse(III) *via* le cofacteur FMN, ce qui implique la séparation de la paire d'électrons au cours du processus. Une telle transformation d'un transfert initialement bi-électronique en deux transferts mono-électroniques, grâce à l'intervention de cofacteurs flaviniques, a souvent été observée dans des processus biologiques et constitue notamment l'une des étapes clés impliquée dans l'activation du dioxygène dans le cycle catalytique des monooxygénases telles que P450 et MMO. L'association de la FMN avec le polymère fonctionnalisé PEIFg 0.20/0.30 est donc d'un grand intérêt dans la perspective de la mise au point de nouvelles réductases artificielles, qui puissent être associées avec divers complexes métalliques, pour élaborer des systèmes bio-inspirés de métalloenzymes de type monooxygénases, et qui conduisent au développement de nouveaux catalyseurs d'oxydation respectueux de l'environnement.

II-A-2) Etudes de l'influence du pH sur la réduction de $Mn^{III}TPyP$

Les résultats présentés dans la première partie de ce chapitre ont tous été obtenus dans l'eau distillée et il serait évidemment intéressant de mieux comprendre l'influence du pH sur l'activité du système. L'utilisation des tampons MES (pH 6) et HEPES (pH 7 à 8), déjà utilisés pour l'étude de la réduction de la FMN par NADH dans le chapitre précédent, induit malheureusement la photo-réduction de la porphyrine à la lumière du jour lors du dégazage de la solution. Cette photo-réduction se produit en l'absence de FMN et de PEIFg 0.20/0.30, mais pas en présence d'oxygène. Elle serait due aux amines tertiaires des tampons MES et HEPES *via* un mécanisme radicalaire qui est encore peu connu.[3,4] En revanche, il semble que les amines tertiaires du polymère n'engendrent pas le même phénomène. Ces observations nous ont conduits à utiliser des tampons ne possédant pas de fonction amine tertiaire, comme les tampons glycine (pH 8.6 et 9) et imidazole (pH 6.2, 7 et 7.8) (**Figure VII.7**).

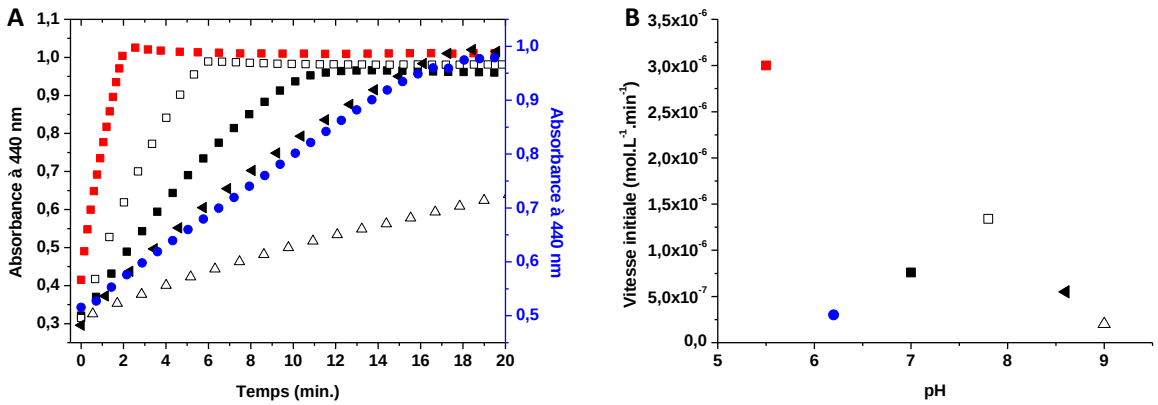


Figure VII.7 : Influence du pH sur la réduction de Mn(III)TPyP: variation de l'absorbance de Mn(II)TPyP à 440 nm en fonction du temps (A) dans un tampon imidazole 50 mM, pH 6.2 (●) ; 7(■) et 7.8 (❑), dans un tampon glycine 50 mM, pH 8.6(▲) et 9(△), et dans l'eau distillée à pH 5.5 (■) ; (B) vitesses initiales des réductions en fonction du pH.

Les résultats, obtenus à différents pH, montrent que la réduction de la porphyrine de Mn(III) est d'autant plus efficace que l'on passe d'un pH égal à 6.2 vers un pH légèrement plus élevé égal à 7,8. Cette efficacité décroit ensuite lorsque la valeur du pH augmente (pH 8.6 et 9). De plus, il apparait que la réduction est bien meilleure dans l'eau distillée, avec une vitesse de réduction multipliée par 2 par rapport à l'activité observée au pH optimum. Nous pouvons alors supposer que les tampons sont capables de perturber les interactions ioniques des différentes molécules au sein de l'enzyme artificielle, ou encore supposer qu'ils interfèrent sur les transferts des ions hydrure ou des électrons entre les différents partenaires. Pour essayer de mieux comprendre comment les transferts de protons, et donc le pH, pourraient être impliqués dans ces processus, nous avons réalisé des cinétiques dans H_2O et dans D_2O.

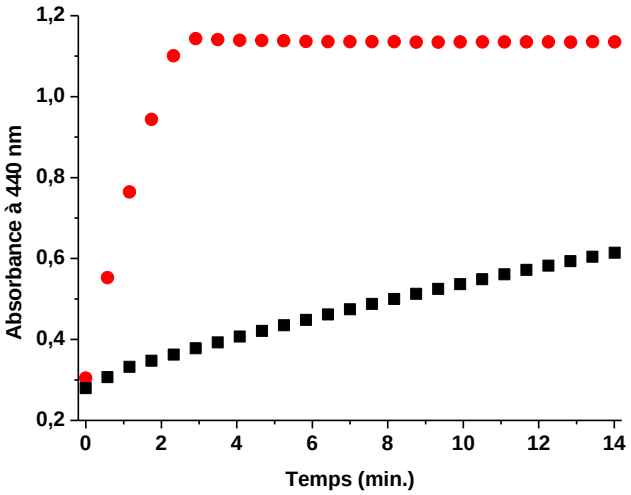


Figure VII.8 : Suivi de la réduction de Mn(III)TPyP en Mn(II)TPyP en fonction du temps à 440 nm dans D_2O (■) et dans H_2O (●).

La **Figure VII.8** montre ainsi que lorsque la réaction se déroule dans D_2O, la vitesse initiale de la réduction est très différente et beaucoup plus faible que dans l'eau distillée, donnant une valeur de KIE égale à 11. Nous pouvons donc en déduire que, dans le cas présent, le transfert d'un proton participe à l'étape cinétiquement déterminante lors de la réduction de Mn(III)TPyP, contrairement à ce qui était observé pour la réduction de la FMN par NADH. Ce résultat est en accord avec les études de réduction de la porphyrine Mn(III)TPyP réalisées à différents pH. En effet, à pH égal à 9 (**Figure VII.7**) la réduction de Mn(III)TPyP est non seulement plus lente, mais aussi incomplète. Ce comportement pourrait donc être associé à un déficit de protons en solution. En résumé, une valeur de KIE égal à 11 suggère que le mécanisme de cette réduction met en jeu un transfert d'électrons couplé à un transfert de protons. L'étape de transfert de protons n'est pas l'étape cinétiquement déterminante pour la réduction de la FMN par NADH. Cela nous laisse supposer que ce transfert de protons cinétiquement déterminant intervient lors de la réduction de la porphyrine, entre le moment où la FMN se ré-oxyde et le moment où la porphyrine est réduite.

Nous avons montré que le manque de spécificité de l'interaction, combiné à l'absence d'un microenvironnement localement hydrophobe, ralentit considérablement le processus de réduction. Par conséquent, la synthèse de polymères modifiés avec différentes quantités de groupements de type octyle pourrait s'avérer être un outil précieux pour mieux comprendre l'effet d'un microenvironnement localement hydrophobe sur la cinétique de transfert d'électrons dans l'eau.

II-A-3) Influence de la nature des polymères sur la réduction des porphyrines de manganèse (III)

Une trentaine de polymères (PEIFg), portant des proportions différentes de groupements guanidinium et octyle, ont été synthétisés et caractérisés par RMN. Nous nous proposons

maintenant d'étudier leur influence sur la réduction de la porphyrine de manganèse Mn(III)TPyP. L'étude a débuté par la série 1 que sont les polymères numérotés de 1 à 6, possédant théoriquement 0.1 équivalent de groupements guanidinium par rapport à la concentration en monomère et différentes proportions de groupements octyle (**Figure VII.9**) et (**Tableau VII.1**).

Tableau VII.1 : Numéros et structures des PEI quantifiés par RMN ainsi que leur vitesse initiale de réduction de la porphyrine de manganèse Mn(III)TPyP

Numéro polymère	Rapport expérimental quantifié par RMN guanidinium/octyl vs [mono]	Vitesse initiale ($\mu M.min^{-1}$)
1	0,04/0,00	0,7
2	0,10/0,20	2,32
3	0,10/0,40	1,72
4	0,10/0,30	1,45
5	turbide	0,04
6	turbide	0,02

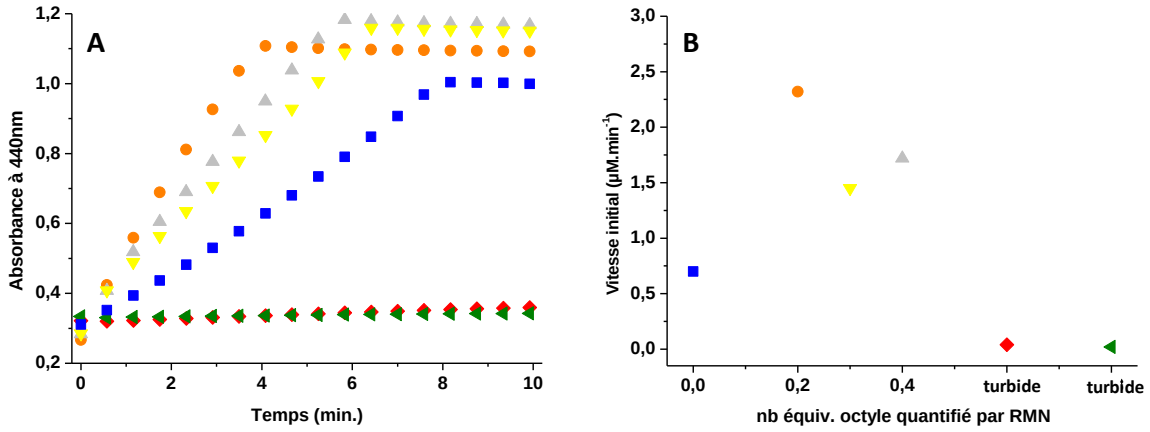


Figure VII.9 : (A) Suivi de la réduction de Mn(III)TPyP (10 µM) en Mn(II)TPyP à 440 nm après addition de NADH (4 équivalents) sous atmosphère inerte, en présence de FMN (10 µM) et des PEIFg (250 µM) ; 1 : (■), 2 : (●), 3 : (▲), 4 : (▼), 5 : (◆), 6 : (◀), (B) Vitesse initiale de ces réductions.

Dans le **Tableau VII.1** sont décrites les caractérisations des différents polymères utilisés. Les polymères 5 et 6 sont turbides, c'est-à-dire qu'ils sont sous forme colloïdale en suspension dans l'eau, mais qu'ils n'ont pas précipité. Ces deux polymères ne permettent pas la réduction de la porphyrine de manganèse. Le PEIFg 1 (0.04/0.00) ne possède pas de groupement octyle dans sa structure et c'est le polymère le moins efficace de cette série. Les polymères PEIFg 2 (0.10/0.20), PEIFg 3 (0.10/0.40) et PEIFg 4 (0.10/0.30) possèdent quant à eux des groupements octyle en différentes proportions. Ces groupements octyle influent directement sur l'efficacité de la réduction de la porphyrine. L'efficacité maximale est obtenue pour le PEIFg 2, puis elle diminue légèrement

pour les PEIFg 3 et 4 ayant des proportions en octyle plus importantes. Il semble donc qu'une trop grande hydrophobicité, associée à une faible proportion de guanidinium, ne soit pas favorable à la réaction. Il est aussi important de noter que toutes les solutions de polymères concentrés utilisées sont au même pH de 7 avant leur utilisation diluée dans l'eau distillée à un pH égal à 5,5.

La même expérience a ensuite été réalisée avec les polymères modifiés, avec 0.2 équivalent de guanidinium (série 2), portant les numéros de 7 à 14 et modifiés avec différentes quantités d'octyle (**Figure 10**) et (**Tableau VII.2**).

Tableau VII.2 : Numéros et structures des PEI quantifiés par RMN ainsi que leur vitesse initiale de réduction de la porphyrine de manganèse Mn(III)TPyP.

Numéro polymère	Rapport quantifié par RMN guanidinium/octyl vs [mono]	Vitesse initiale ($\mu M.min^{-1}$)
7	0,06/0,00	0,018
8	0,07/0,14	1,34
9	0,13/0,35	1,87
10	0,13/0,30	6,64
11	0,10/0,40	3,62
12	0,11/0,40	2,38
13	0,20/1,00	0,9
14	0,20/2,00	2,38

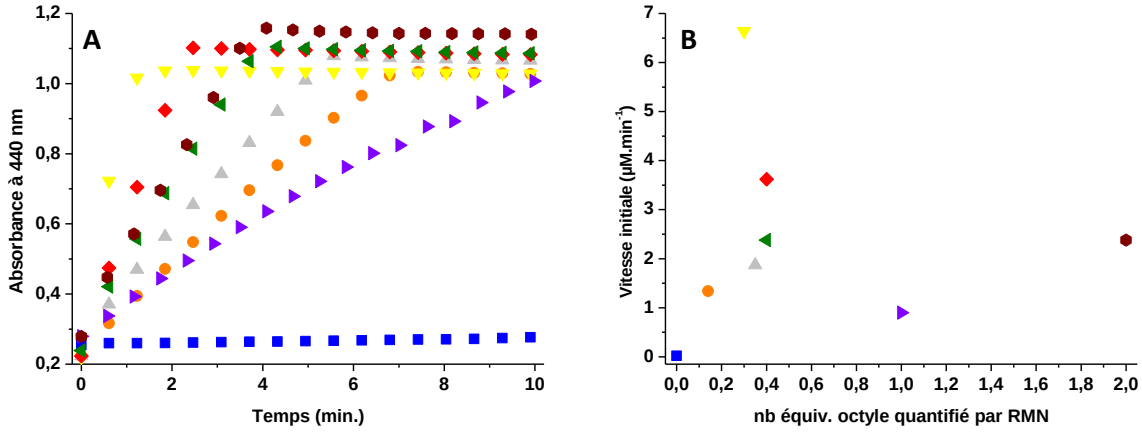


Figure VII.10 : (A) Suivi de la réduction de Mn(III)TPyP (10 µM) en Mn(II)TPyP à 440 nm après addition de NADH (4 équivalents) sous atmosphère inertes, en présence de FMN (10 µM) et des PEIFg (250 µM) ; 7 : (■), 8 : (●), 9 : (▲), 10 : (▼), 11 : (◆), 12 : (◀) ; 13 : (▲) ; 14 : (●), (B) Vitesse initiale de ces réductions.

Dans le **Tableau VII.2** sont décrites les caractérisations des différents polymères utilisés. Comme précédemment, le polymère sans octyle ne catalyse pas la réaction de réduction. L'efficacité de la réaction de réduction est meilleure lorsque la quantité d'octyle augmente. Le maximum est

atteint pour le PEIFg 10 (0.20/0.60 idéal ; 0.13/0.30 RMN), avec une vitesse initiale de réduction de Mn(III)TPyP de 6.64 µM.min^{-1}. C'est le polymère qui conduit à la cinétique de réduction la meilleure, toutes séries confondues. Si l'on rajoute ensuite davantage de groupements octyle, l'efficacité chute, jusqu'à 1 µM.min^{-1} pour le PEIFg 13 (0.20/1.50 idéal ; 0.20/1.00 RMN), avec 1 équivalent d'octyle. Nous pouvons supposer que dans ce cas le polymère est devenu trop hydrophobe, ce qui diminue son efficacité. Toutefois, pour le PEIFg 14 (0.20/2.00 idéal ; 0.20/2.00 RMN), avec 2 équivalents d'octyle, la vitesse initiale augmente à nouveau. Ce comportement peut s'expliquer par une possible saturation en groupements octyle des amines du polymère, formant ainsi des ions ammonium. Ces ions ammonium peuvent influer à leur tour sur la réactivité en contrebalançant l'hydrophobicité amené par les groupements octyle, afin d'atteindre un équilibre entre hydrophobicité et quantité de charges qui semblent être les deux paramètres importants pour une bonne réactivité.

Les cinétiques ont également été réalisées sur des polymères fonctionnalisés avec 0.4 équivalent de guanidinium (série 3), et différentes quantités d'octyle, portant les numéros de 15 à 22 (**Figure VII.11**) et (**Tableau VII.3**).

Tableau VII.3 : Numéros et structures des PEI quantifiés par RMN ainsi que leur vitesse initiale de réduction de la porphyrine de manganèse Mn(III)TPyP.

Numéro polymère	Rapport quantifié par RMN guanidinium/octyl vs [mono]	Vitesse initiale (µM.min^{-1})
15	0,08/0,00	1
16	0,30/0,04	1,12
17	0,30/0,08	1,3
18	0,31/0,15	2,34
19	0,30/0,14	2,01
20	0,33/0,17	2,79
21	0,30/0,20	1,65
22	0,31/0,20	1,51

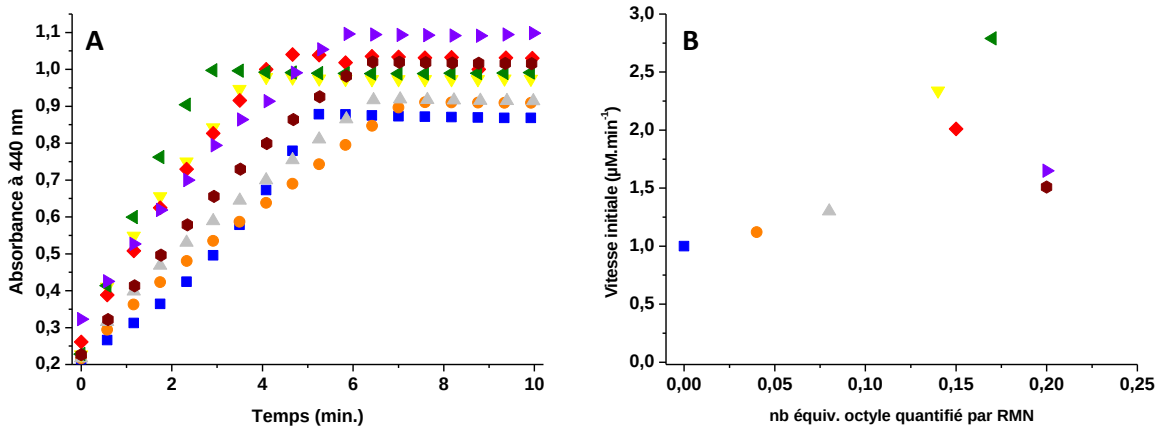


Figure VII.11 : (A) Suivi de la réduction de Mn(III)TPyP (10 µM) en Mn(II)TPyP à 440 nm après addition de NADH (4 équivalents) sous atmosphère inerte, en présence de FMN (10 µM) et des PEIFg (250 µM) ; 15 : (■), 16 : (●), 17 : (▲), 18 : (▼), 19 : (◆), 20 : (◀) ; 21 : (▲) ; 22 : (●), (B) Vitesse initiale de ces réductions.

Dans le **Tableau VII.3** sont décrites les caractérisations des différents polymères utilisés. La première information que l'on peut extraire est que l'ajout d'une plus grande quantité de guanidinium diminue la quantité d'octyle qui peut être ajouté au polymère. Comme pour les deux séries précédentes, sans octyle, la réaction est la plus lente (PEIFg 15 (0.40/0.00 idéal ; 0.08/0.00 RMN). Ensuite, l'efficacité de ces différents polymères suit les mêmes tendances que précédemment. Ainsi, la réduction est d'autant plus efficace qu'il y a de groupements octyle sur le polymère, jusqu'à une certaine limite. Ici, le maximum est atteint pour le PEIFg 20 (0.40/1.00 idéal ; 0.33/0.17 RMN) avec 2.5 µM.min^{-1}, ce qui reste malgré tout beaucoup plus faible que le meilleur polymère de la série précédente. Avec une plus grande proportion d'octyle, la performance des polymères diminue.

Enfin, les derniers polymères utilisés, fonctionnalisés avec 0.6 équivalent de guanidinium (série 4), portent les numéros de 23 à 30 et différentes quantités d'octyle (**Figure VII.12**) et (**Tableau VII.4**).

Tableau VII.4 : Numéros et structures des PEI quantifiés par RMN ainsi que leur vitesse initiale de réduction de la porphyrine de manganèse Mn(III)TPyP.

Numéro polymère	Rapport quantifié par RMN guanidinium/octyl vs [mono]	Vitesse initiale ($\mu M.min^{-1}$)
23	0,44/0,00	0,62
24	0,24/0,01	1
25	0,33/0,03	2,07
26	0,32/0,04	1,58
27	0,33/0,07	1,34
28	0,34/0,15	2,48
29	0,34/0,18	1,82
30	0,35/0,20	2,05

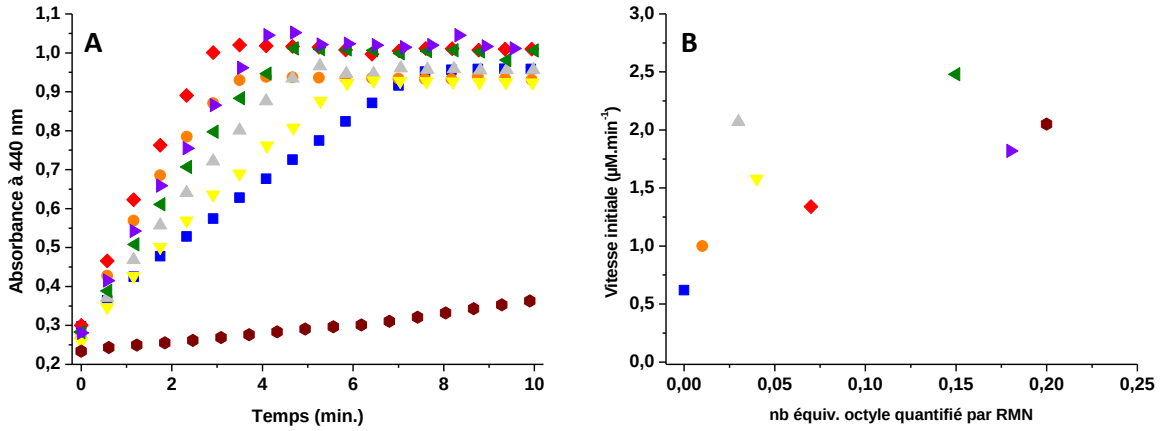


Figure VII.12 : (A) Suivi de la réduction de Mn(III)TPyP (10 µM) en Mn(II)TPyP à 440 nm après addition de NADH (4 équivalents) sous atmosphère inerte, en présence de FMN (10 µM) et des PEIFg (250 µM) ; 23 : (■), 24 : (●), 25 : (▲), 26 : (▼), 27 : (◆), 28 : (◀) ; 29 : (▲) ; 30 : (●) et (B) Vitesse initiale de ces réductions.

Dans le **Tableau VII.4** sont décrites les caractérisations des différents polymères utilisés. Malgré l'utilisation de proportions de guanidinium plus importantes, les proportions de substituants observées par RMN ne diffèrent que très peu de la série précédente. Cela démontre une certaine limite concernant les quantités de substituants que l'on peut greffer sur le polymère, et donc aussi une certaine limite dans la diversité des polymères qui peuvent effectivement être synthétisés. Ainsi, assez logiquement, les performances des polymères de cette dernière série sont relativement similaires à la série précédente.

Pour conclure, la caractérisation par RMN des polymères modifiés a montré que ceux-ci sont effectivement différents tant que l'on ne dépasse pas un taux de greffage cumulé (guanidinium + octyle) supérieur à 0,6 équivalent en monomères. Au-delà, la fonctionnalisation est sensiblement la même, avec un nombre de groupements guanidinium et octyle (série 3 et 4) greffés très proches,

et les polymères considérés ont une efficacité assez similaire pour la réduction de la métalloporphyrine Mn(III)TPyP. Toutefois, on peut mettre en avant que l'efficacité de la réduction est maximale pour la série 1 lorsque 0,2 équivalent d'octyle sont fixés sur le polymère, et que par la suite, pour les séries 2, 3 et 4, l'efficacité maximale est obtenue pour des quantités croissantes d'octyle. Au final, il semble que le rapport des groupements guanidinium et octyle joue un rôle majeur sur l'efficacité de la réduction. Par exemple, pour la série 2, le PEIFg 10 (0.20/0.60 idéal ; 0.13/0.30 RMN) est le meilleur, alors que le PEIFg 11 (0.20/0.80 idéal ; 0.10/0.40 RMN) est deux fois moins efficace, avec seulement 10 % d'octyle en plus. De plus, il faut noter que la faible activité des polymères sans octyle met en avant l'importance de ces groupements. Sans eux, la réduction ne se produit pas, ou beaucoup moins vite.

II-B) Etude de la réduction des métalloporphyrines Mn(III)TMPyP, Mn(III)TPPS et Fe(III)TDCPP

En complément de la porphyrine de manganèse Mn(III)TPyP, nous avons étudié la réduction d'autres porphyrines de manganèse telles que Mn(III)TMPyP, Mn(III)TPPS ainsi que de fer telle que Fe(III)TDCPP, précédemment décrites dans le chapitre IV (**Schéma IV.8**).

Pour commencer, Mn(III)TMPyP a été réduite dans les mêmes conditions que Mn(III)TPyP, avec un comportement sensiblement identique, que nous ne décrirons donc pas de nouveau (**Figure VII.13 A**). En parallèle, le complexe Mn(III)TPPS montre une réactivité en réduction intéressante en comparaison avec Mn(III)TPyP (**Figure VII.13 B**). Les différences d'absorbance observées entre les deux porphyrines proviennent probablement de leurs différences de comportement en présence du PEIFg 0.20/0.30.[5,6] En effet, les coefficients d'absorption molaire de Mn(III)TPPS et de Mn(III)TPyP sont presque identiques, respectivement de 97 500 et de 96 500 $mol^{-1}.L^{-1}.cm^{-1}$, les réactions ont été dupliquées et le même comportement a été observé les deux fois.

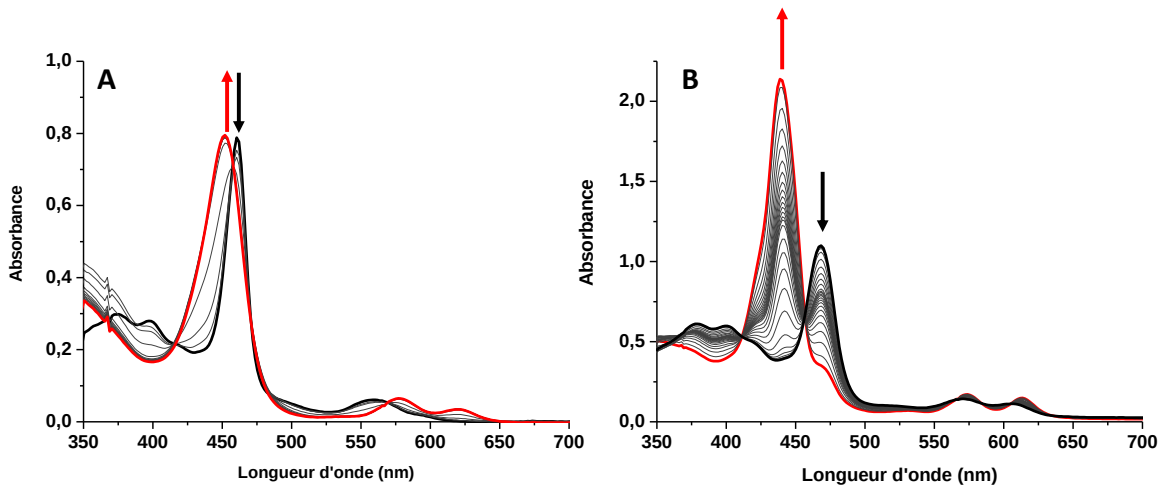


Figure VII.13 : Réduction des porphyrines de manganèse par la réductase artificielle : évolution du spectre UV-Visible en fonction du temps de (A) Mn^{III}TMPyP et (B) Mn^{III}TPPS, 10µM dans l'eau en présence de FMN (10µM) et de PEIFg 0.20/0.30 (1.25mM) avant (——) et après ajout de NADH (4 équiv.) (——).

Lorsque l'on réduit les deux métalloporphyrines Mn(III)TPyP et Mn(III)TPPS à l'aide de l'enzyme artificielle, leurs comportements sont similaires, malgré une vitesse de réduction différente : Mn(III)TPPS nécessite deux fois plus de temps (4 minutes au lieu de 2 minutes pour Mn(III)TPyP) pour être complètement réduite (**Figure VII.14 A**). Cette différence s'accroît lorsque l'on expose les deux métalloporphyrines réduites à l'air. Mn(II)TPyP s'oxyde alors 10 fois plus vite que Mn(II)TPPS (en 6 minutes au lieu de 60 minutes) (**Figure VII.14 B**). Notre hypothèse est que le comportement de Mn(II)TPPS peut s'expliquer par le fait qu'elle porte des charges négatives, l'enfouissant dans le polymère, alors que Mn(II)TPyP est, quant à elle, répartie plutôt uniformément en solution. Cet enfouissement est caractérisé par une réduction totale un peu plus lente, mais surtout par une vitesse de ré-oxydation beaucoup plus lente, laissant penser que le dioxygène met plus de temps à atteindre le complexe Mn(II)TPPS au sein du polymère.

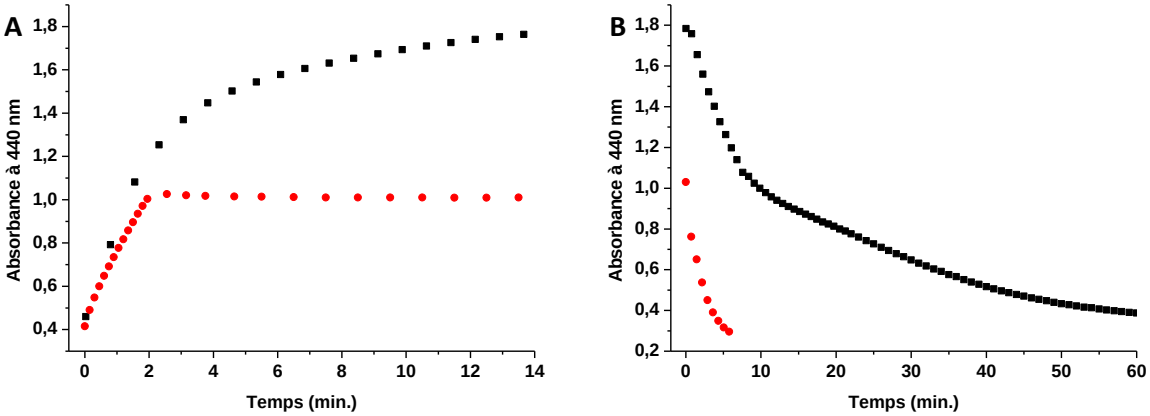


Figure VII.14 : (A) Comparaison de la cinétique de réduction de MnTPyP (■) à 440 nm et de MnTPPS (■) (10µM) dans l'eau en présence de FMN (10µM), de PEIFg 0.20/0.30 (1.25mM) et de NADH (40 µM), (B) Suivi de la cinétique d'oxydation MnTPyP (■) à 440 nm et de MnTPPS (■) (10µM) dans l'eau en présence de FMN (10µM), de PEIFg 0.20/0.30 (1.25mM) après exposition à l'air.

La réduction du complexe Fe^{III}TDCPP par la réductase artificielle a elle aussi été étudiée car nous voulions savoir si notre système était capable de réduire des métalloporphyrines de fer qui sont des complexes bio-inspirés de l'hème. De plus, les porphyrines de fer sont aussi efficaces en catalyse et le fer(III) une fois réduit en fer(II) peut réagir avec O_2. Toutefois, cette caractérisation est moins évidente à observer et les études sur différents polymères n'ont pas pu être réalisées (**Figure VII.15**).

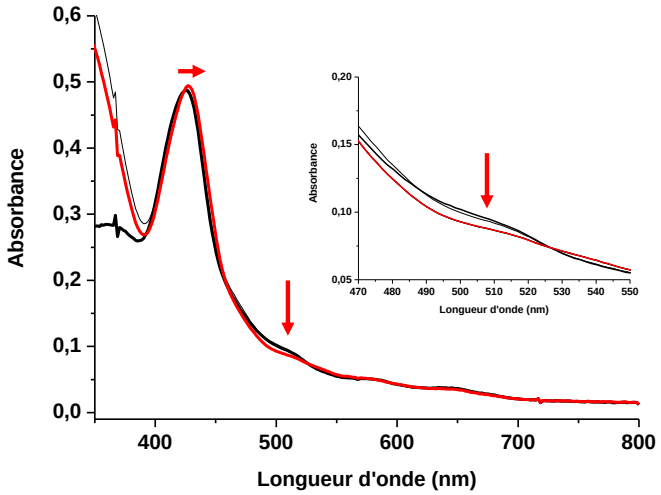


Figure VII.15 : Caractérisation par UV-Visible de la réduction de la FeTDCPP en solution dans l'eau (10µM) en présence de FMN (10µM) et de PEIFg 0.20/0.30 (1.25mM) avant (——) et après ajout NADH (4 équivalents) (——).

La réduction de la porphyrine Fe(III)TDCPP se caractérise par le déplacement du maximum d'absorbance de la bande de Soret de 420 à 425nm, couplé avec une disparition de la bande à 510 nm, caractéristique d'une porphyrine de fer(III).[7] La présence de FMN en solution, avec une bande d'absorption à 440 nm, doit empêcher l'observation de points isobestiques lors du passage de l'espèce fer(III) à l'espèce fer(II). Ce faible déplacement de la bande de Soret n'est pas favorable à des études cinétiques plus fines, c'est pourquoi nous n'avons pas procédé à des études plus poussées concernant la réduction de Fe(III)TDCPP avec notre système.

Les exemples de flavoréductases artificielles, capables de réduire les complexes métalliques, sont très rares. Seulement deux systèmes ont jusqu'ici été décrits avec des informations cinétiques sur le processus de réduction. Un système redox impliquant à la fois une porphyrine de manganèse et une flavine amphiphile, insérées dans une bicouche phospholipidique, en présence de pyruvate oxydase chargée de délivrer les électrons a ainsi été décrit.[2] Dans ce cas, l'apparition du spectre de la porphyrine de manganèse(II) a été suivie à 440 nm. Il a été montré que la réduction prenait plus de 3 heures pour être achevée. De même, un système de type flavocyclodextrine s'est avéré capable de réduire une porphyrine de manganèse(III), en utilisant un mime synthétique de NADH. Les constantes de vitesse de second ordre calculées sont 6 fois plus élevées que celles observées en présence de FMN en solution.[8] Comme les molécules mimant le NADH utilisées dans ces études ne sont pas toujours les mêmes, la meilleure façon de comparer l'activité de notre polymère avec la littérature est de comparer les valeurs de l'accélération de la vitesse de réduction des différents systèmes par rapport à la vitesse observée en présence de FMN seule en solution. Dans ce cas, notre « synzyme » est trois ordres de grandeur plus rapide que la flavocyclodextrine. Cette enzyme artificielle semblant très prometteuse, nous avons décidé d'étudier son activité réductase avec d'autres cofacteurs redox (ou catalyseurs potentiels) non métalloporphyriques.

III) Réduction de complexes métalliques non-héminiques

III-A) Réduction du complexe de cuivre $[Cu^{II}(TPA)H_2O](OTf)_2$

III-A-1) Suivi de la réduction par UV-Visible

Comme pour la porphyrine de manganèse, nous avons essayé de caractériser par UV-Visible la réduction d'un complexe mononucléaire de cuivre grâce à notre « synzyme ». Pour cela, une solution de FMN (100 µM), de PEIFg 0.20/0.30 (2.5 mM en monomère) et de complexe de cuivre (1 mM) a été dégazée, puis l'évolution de son absorbance au cours du temps a été suivie après ajout de NADH (4 équiv.), ainsi que sa ré-oxydation à l'air libre (**Figure VII.16**). La concentration en complexe de cuivre utilisée dans ces expériences est différente de celle en porphyrine utilisée précédemment à cause des valeurs de coefficients d'extinction molaires qui sont très différents entre les deux complexes, celui du complexe de cuivre étant beaucoup plus faible : ε = 140 $mol^{-1}.L^{-1}.cm^{-1}$pour la bande à 640 nm pour dans l'eau. Il est ainsi nécessaire de travailler à une concentration en cuivre minimale de 1 mM pour observer sa réduction par la FMN en spectroscopie UV-Visible.

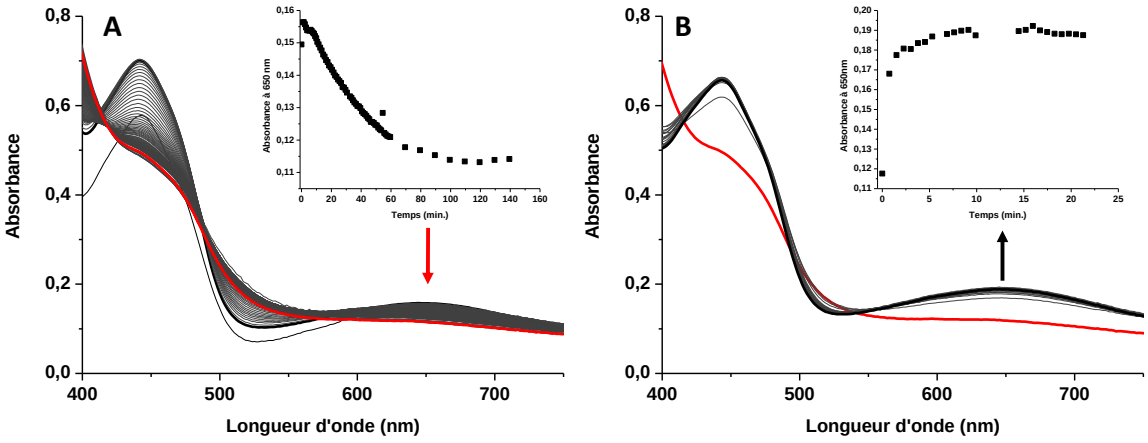


Figure VII.16 : (A) Evolution de la réduction du complexe de cuivre(II) 1mM dans l'eau, en présence de FMN (50µM) et de PEIFg 0.20/0.30 (2.5mM) avant (——) et après ajout de NADH (600 µM) (——) ; (B) Evolution de la ré-oxydation du complexe de cuivre(I) (——) en cuivre(II) (——) après exposition à l'air.

Comme le montrent les spectres UV-Visible de la **Figure VII.16**, après ajout de 1,2 équivalent de NADH au complexe de cuivre(II) 1mM dans l'eau, en présence de FMN (50 µM) et de PEIFg 0.20/0.30 (2.5 mM), la bande caractéristique du cuivre(II) à 640 nm disparait progressivement et la disparition est totale en environ 2 heures. Lorsque la solution est exposée à l'air, la ré-oxydation du complexe est très rapide et prend environ 3 minutes. Ces résultats montrent d'une part que notre « synzyme » est capable de réduire le cuivre, et d'autre part que la réactivité du complexe de cuivre(I) avec O_2 est rapide. Nous pouvons ainsi envisager de réaliser des réactions d'oxydation avec ce complexe dans l'eau.

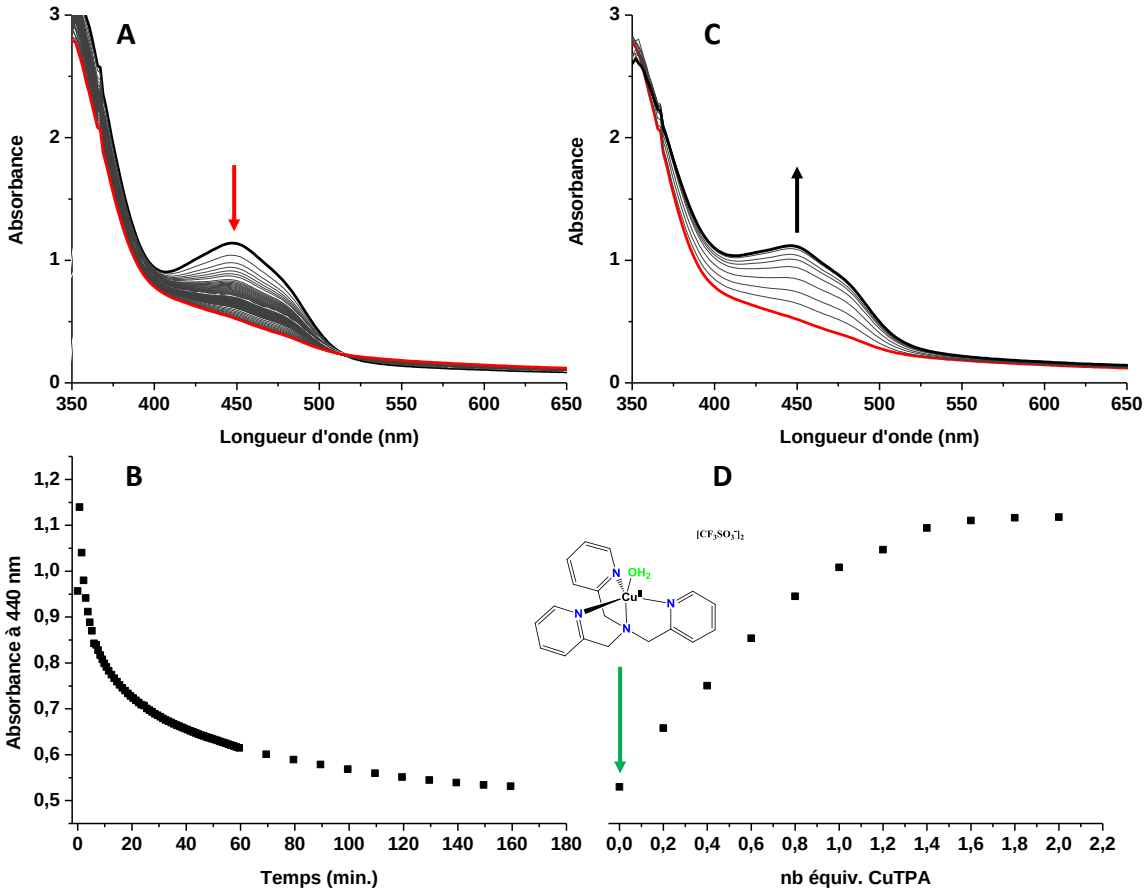


Figure VII.17 : Suivi par UV-Visible de (A) réduction de la FMN (100µM) (——) en $FMNH_2$ (——) dans l'eau, en présence de PEIFg 0.20/0.30 (2.5mM) et de NADH (400 µM), (B) cinétique de réduction de la FMN à 440 nm, (C) ré-oxydation de la $FMNH_2$ (——) par différents équivalents de complexe de cuivre(II) $[Cu^{II}(TPA)H_2O](OTf)_2$ et (D) cinétique de la ré-oxydation de $FMNH_2$ à 440 nm.

En parallèle, nous avons mené une seconde expérience, en réduisant d'abord la FMN, puis en ajoutant progressivement le complexe de cuivre, sous atmosphère inerte afin d'examiner si cet ajout permettait de ré-oxyder la FMN (**Figure VII.17**). Ainsi, la FMN est tout d'abord réduite en présence de PEIFg 0.20/0.30 et de NADH (**Figure VII.17 A** et **B**). Ensuite, le complexe de cuivre(II) est ajouté, par portion de 0.2 équivalent, à la solution de FMN réduite, avec un temps d'attente de 5 minutes entre chaque ajout. Nous avons pu constater que le complexe de cuivre permettait la ré-oxydation de la FMN, corrélant ainsi avec l'expérience de la réduction du complexe de cuivre(II) par la FMN (**Figure VII.17 C**). Théoriquement, l'oxydation d'une molécule de FMN se fait parallèlement à la réduction de deux atomes de cuivre(II). Or, dans la **Figure VII.17 D**, le plateau est atteint lorsque 1,6 équivalent de cuivre sont ajoutés. Il nous est donc difficile de conclure sur la stœchiométrie de cette réduction, mais nous pouvons affirmer qu'elle est relativement efficace. Afin de prouver que l'oxydation de la FMN est bien due à l'ajout de complexe de cuivre, et non à une entrée de dioxygène lors de l'injection, un contrôle est réalisé en ajoutant de l'eau distillée. Dans ce cas, aucune oxydation de la FMN n'est observée.

L'étude par spectroscopie UV-Visible nous a donc permis de prouver la réduction d'un complexe de cuivre ($[Cu^{II}(TPA)H_2O](OTf)_2$) par la réductase artificielle. Toutefois, dans un souci de rigueur, nous avons décidé d'étudier également cette réduction par RPE.

III-A-2) Suivi de la réduction par RPE

Le suivi, par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE), de la réduction du complexe de cuivre(II), $[Cu^{II}(TPA)H_2O](OTf)_2$, par la réductase artificielle a été envisagé en se fondant sur la différence de propriétés électroniques entre le Cu(II) et le Cu(I). En effet, le cuivre(II) est paramagnétique et présente généralement un signal caractéristique en solution, avec une valeur du facteur de Landé, de g perpendiculaire ($g_\perp$) d'environ 2.08 et de g parallèle ($g_{//}$) composé de 4 raies dues au couplage anisotropique hyperfin du spin électronique du cuivre avec son spin nucléaire (I =3/2) (nombre de raies = 2I + 1 = 4) d'une valeur supérieur. Les raies du couplage hyperfin sont en général mieux résolues le long de $g_{//}$ que le long de $g_\perp$ et ne sont donc habituellement pas visibles pour celui-ci.[9] En revanche le cuivre(I) lui, est diamagnétique et donc silencieux en RPE. Les expériences ont toutes été réalisées en boîte à gants. Une fois les solutions placées sous atmosphère inerte, les mesures RPE sont réalisées avant, puis 1 heure ou 2 heures après ajout de NADH (**Figure VII.18)**.

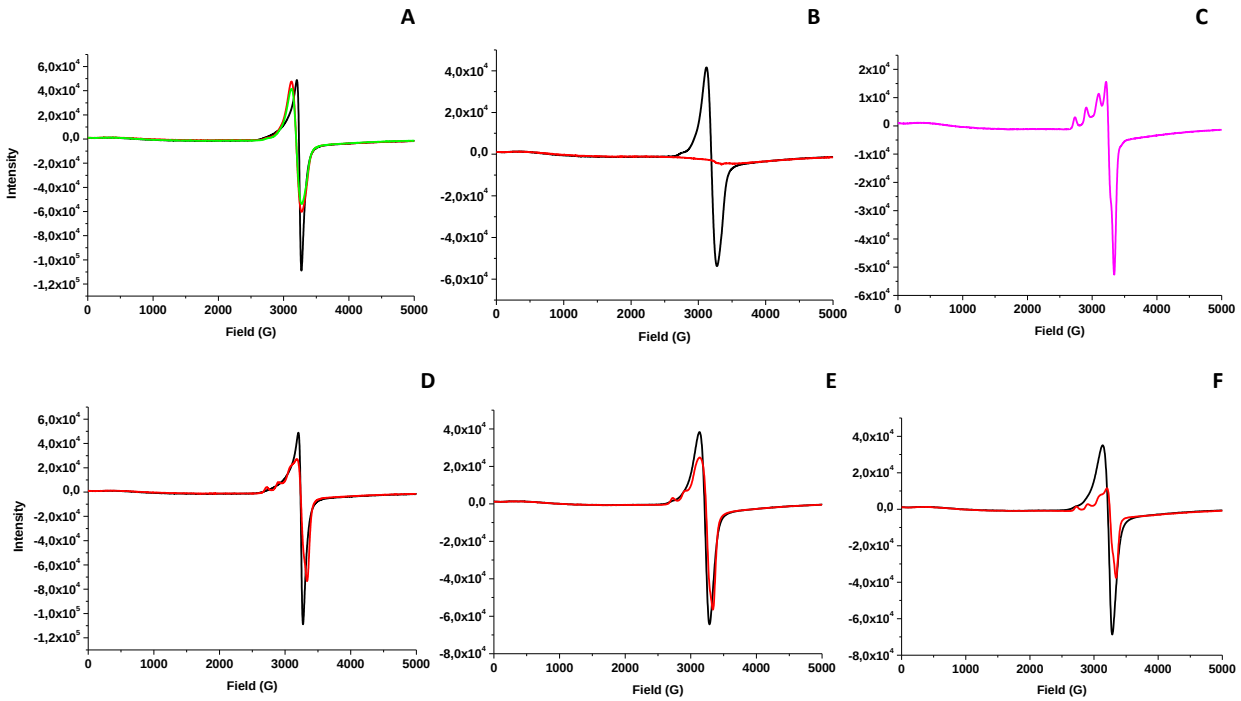


Figure VII.18: (A) Spectre RPE du complexe du complexe de cuivre(II) [Cu^{II}(TPA)H_2O](OTf)$_2$ seul dans l'eau (1mM) (——), après ajout de PEIFg 0.20/0.30 (10mM en monomère) (——), puis de FMN (100µM) (——) ; (B) Spectre RPE d'une solution de complexe de cuivre [Cu^{II}(TPA)H_2O](OTf)$_2$ (1mM), de FMN (50µM) et de PEIFg 0.20/0.30 (2,5mM) avant (——) et 1h après ajout de 1.5 équivalent de NADH (——) (C) Spectre RPE enregistré après exposition de la solution de cuivre, précédemment réduite, 5 minutes à l'air libre (——) ; (D) Spectre RPE du complexe de cuivre avant (——) et 2h après ajout de 1.5 équivalent de NADH (——) ; (E) Spectre RPE du complexe de cuivre avec le PEIFg 0.20/0.30 avant (——) et 2h après ajout de 1.5 équivalent de NADH (——) ; (F) Spectre RPE de la même solution que (A) sans PEIFg 0.20/0.30 avant (——) et 2h après ajout de 1.5 équivalent de NADH (——) .

L'ensemble des spectres RPE ont été enregistrés à 100 K avec les paramètres suivants : une fréquence de 9,374 GHz, une puissance 0,78 mW, une modulation de l'amplitude de 4 gauss et 4 scans. Tout d'abord, nous avons mis en lumière l'influence du polymère sur le spectre RPE du complexe de cuivre(II). Le signal RPE du complexe de cuivre seul [Cu^{II}(TPA)H_2O](OTf)$_2$, en solution dans l'eau, est asymétrique avec une valeur de $g_\perp$ égale à 2,06, et ne possède pas les quatre bandes correspondantes aux $g_{//}$ de la structure hyperfine de l'ion Cu^{2+} habituel (**Figure VII.18 A** noir).[10] Lorsque l'on ajoute le PEIFg 0.20/0.30 à la solution de complexe de cuivre (courbe rouge), le signal RPE devient complétement isotrope **(Figure VII.18 A** rouge**)**.[11,12] Ce résultat met en avant une influence du polymère sur la géométrie du complexe de cuivre. Nous pouvons ainsi supposer que le complexe est incorporé dans le polymère et coordiné par au moins une fonction amine du polymère.[13] Par ailleurs, l'ajout de FMN ne change pas le spectre RPE (**Figure VII.18 A** vert). En revanche, lorsque le spectre RPE est enregistré avec tous les composants de la réductase artificielle, une heure après l'ajout de 1,5 équivalent de NADH, nous observons la disparition complète du spectre RPE du cuivre(II). Cette disparition confirme la réduction du complexe de cuivre(II) en cuivre(I) (**Figure VII.18 B**). La solution est alors exposée à l'air pendant 5 minutes et le spectre RPE est à nouveau enregistré. L'apparition de trois bandes bien résolues et d'une quatrième moins bien définie, caractéristique de la structure hyperfine du cuivre à une valeur de $g_{//}$ de 2,30 est alors

observée. Une valeur de $g_{\perp}$ asymétrique à 2,05 est également retrouvée (**Figure 18 VII.C)**. Ce nouveau spectre reste stable au moins une heure. L'apparition des signaux dus au couplage hyperfin du cuivre(II) suggère la formation d'un nouveau complexe, qui n'est pas le même que celui de départ, et qui ne correspond pas non plus au spectre RPE d'un ion Cu^{2+} dans l'eau,[10] avec une nouvelle géométrie, suite à la réaction du complexe de Cu(I) avec le dioxygène. Il est ainsi possible que le complexe réduit en Cu(I), dont la géométrie préférentielle est tétraédrique, se décoordine du polymère pour interagir avec O_2, pour évoluer vers un complexe avec une géométrie différente du complexe de départ dans la **Figure VII.18 A** (spectre vert). En effet, ce nouveau complexe formé semble être isotrope, mais avec une axialité prononcé sur l'axe z par rapport aux axes Y et Z. (**Figure VII.18 C)**. En parallèle, différents contrôles ont été réalisés pour montrer l'importance des différents composants. Le complexe de cuivre(II) n'est pas réduit directement par NADH (**Figure VII.18 D**). Lorsque le PEIFg 0.20/0.30 est seul en solution avec le complexe de cuivre, l'ajout de NADH ne permet pas la réduction du cuivre (**Figure VII.18 E**). Enfin, en absence de polymère modifié mais en présence de la FMN, la réduction du cuivre se produit en partie (**Figure VII.18 F**).

Lors des expériences ne permettant pas la réduction du cuivre(II), la formation de deux des quatre bandes caractéristique de la structure hyperfine sont observées est ajout de NADH. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce fait : soit le NADH interagit avec le cuivre et influence sa géométrie,[14] soit une réduction partielle du cuivre se produit, entrainant un changement de sa géométrie (octaédrique à tétraédrique).[12]

III-B) Réduction d'un complexe binucléaire de fer $[Fe^{III}_2(N\text{-}EtHPTB)(CH_3O)(CH_3OH)(H_2O)_2](ClO_4)_4$

La réduction du complexe $[Fe^{III}_2(N\text{-}EtHPTB)(CH_3O)(CH_3OH)(H_2O)_2](ClO_4)_4$ ne peut être caractérisée par RPE puisque les deux ions fer sont couplés de manière antiferromagnétique. Nous avons donc suivi cette réaction par spectroscopie UV-Visible, utilisant le même protocole que pour le complexe de cuivre. La FMN a tout d'abord été réduite par NADH en présence de PEIFg 0.20/0.30, puis le complexe di-nucléaire de fer a été ajouté dans le milieu progressivement (**Figure VII.19**). Cette technique a été privilégiée car le spectre d'absorbance du fer n'est pas suffisamment intense pour être observé en présence de FMN.

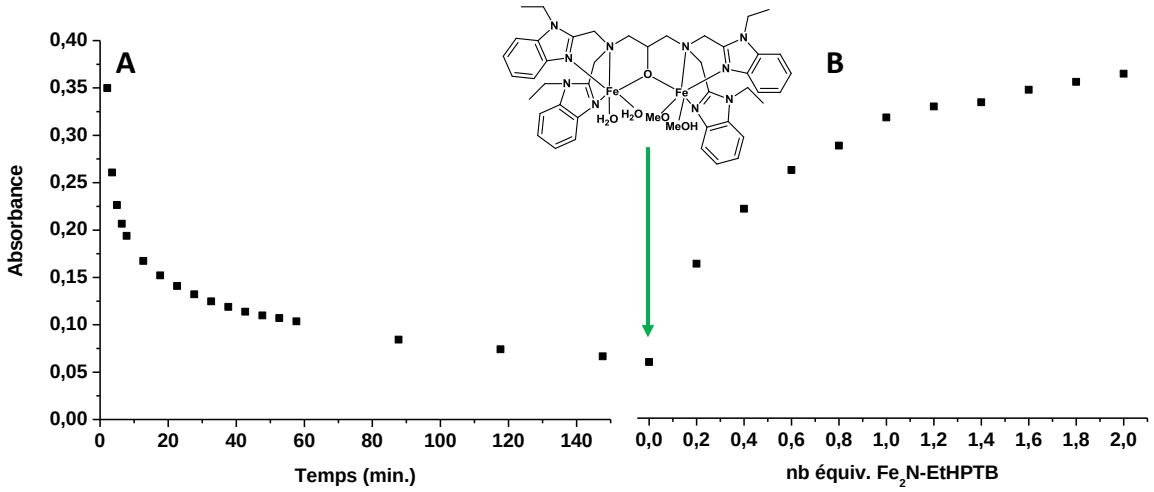


Figure VII.19 : (A) Suivi de la réduction de la FMN (100µM) (——) en $FMNH_2$ (——) dans l'eau en fonction du temps à 440 nm, en présence de PEIFg 0.20/0.30 (2.5mM) et de NADH (400 µM), et (B) suivi de la ré-oxydation de la $FMNH_2$ (——) par différents équivalents de complexe de fer(III) $[Fe^{III}_2(N\text{-}EtHPTB)(CH_3O)(CH_3OH)(H_2O)_2](ClO_4)_4$, au cours du temps à 440 nm.

La **Figure VII.19** montre ainsi l'évolution au cours du temps de l'absorbance à 440 nm due à la FMN, après addition de 4 équivalents de NADH **(A)**, puis en présence de quantités croissantes du complexe $[Fe^{III}_2(N\text{-}EtHPTB)(CH_3O)(CH_3OH)(H_2O)_2](ClO_4)_4$ **(B)**. Comme précédemment, il est nécessaire de rajouter un peu plus d'un équivalent de complexe pour ré-oxydé totalement $FMNH_2$ en FMN, puisque NADH est excédentaire en solution. Ainsi, après ajout d'un équivalent de complexe de fer, 85% de $FMNH_2$ est ré-oxydée. Ce résultat nous permet donc de montrer, de façon indirecte, que le complexe de fer est réduit par la réductase artificielle. Là encore, le contrôle réalisé par injection d'acétonitrile à la place de la solution de complexe, n'engendre pas d'oxydation de la FMN. Nous avons tenté de piéger un intermédiaire peroxo ou hydroperoxo après exposition du complexe réduit en présence d'O_2, à basse température, mais aucune espèce n'a pu être observée.

IV) Conclusion

Dans le paragraphe I de ce chapitre, nous n'avions pas pu mettre en évidence la réduction photo-assistée du complexe $[Fe^{III}_2(N\text{-}EtHPTB)(CH_3O)(CH_3OH)(H_2O)_2](ClO_4)_4$ dans l'eau en présence de complexe de ruthénium. En revanche, dans ce second paragraphe, nous avons pu montrer qu'en présence de FMN incorporée dans un polymère modifié PEIFg (réductase artificielle), la réduction de la métalloporphyrine $Mn^{III}TPyP$ par le NADH s'effectuait de façon efficace et était complète en 90 secondes. Nous avons également pu montrer que cette réduction s'effectuait également en présence de polymère commercial, mais avec une vitesse moins importante, alors que sans polymère aucune réduction ne se produisait. Cette réductase artificielle (PEIFg + FMN) est d'autant plus intéressante que seulement 0,5 équivalent de NADH est suffisant pour réduire 1 équivalent molaire du complexe $Mn^{III}TPyP$. Ce résultat met en avant une propriété extrêmement intéressante de notre système, qui est sa capacité à transformer un transfert initial bi-électronique, associé au

transfert d'un ion hydrure du NADH sur FMN, en deux transferts mono-électroniques de $FMNH_2$ vers le cofacteur métallique. Dans ce sens, il se positionne comme un excellent mime des réductases à NAD(P)H qui sont associées « *in vivo* » aux monooxygénases de type cytP450 et MMO.

En parallèle, nous avons prouvé que notre système était plus efficace dans l'eau distillée que dans les tampons, qui gênent la réduction, à cause d'une force ionique trop importante. La mesure d'un KIE égal à 11 suggère que l'étape cinétiquement déterminante est le transfert de protons couplé au transfert d'électrons qui se déroule lors de la ré-oxydation de la FMN donc lors de la réduction de la porphyrine. Pour finir, différents polymères modifiés ont été testés pour réaliser la réduction de la porphyrine. Ceci a permis de mettre en avant l'importance non seulement des groupements guanidinium, qui interagissent avec les phosphates des cofacteurs redox FMN et NADH, mais également des groupements octyle, qui fournissent un environnement local hydrophobe aux cofacteurs redox, une balance précise entre les groupements octyle et guanidinium étant requise pour une efficacité optimale de la réaction redox.

Finalement, de nombreux catalyseurs ont pu être réduits par NADH en présence de la réductase artificielle (PEIFg + FMN) de manière efficace comme diverses métalloporphyrines, Mn^{III}TPPS, Mn^{III}TMPyP et Fe^{III}TDCPP, des complexes non héminiques binucléaires de fer, $[Fe^{III}_2$(N-EtHPTB)$(CH_3O)(CH_3OH)(H_2O)_2](ClO_4)_4$ et des complexes mononucléaires à cuivre, $[Cu^{II}(TPA)H_2O](OTf)_2$). De plus, ces catalyseurs se ré-oxydent tous après exposition au dioxygène ce qui suggère qu'ils l'activent de manière réductrice, et ouvre donc la porte à leur utilisation pour la catalyse d'oxydation de divers substrats en milieu aqueux.

Dans le dernier chapitre de ce manuscrit, nous présenterons donc les résultats préliminaires obtenus pour l'oxydation du thioanisole par O_2 utilisant ces réductase artificielle (PEIFg + FMN) en présence de catalyseurs (Mn^{III}TPyP, $[Cu^{II}(TPA)H_2O](OTf)_2$ et $[Fe^{III}_2(HTPDP)(CH_3OH)_3(CH_3O)](ClO_4)_4$ (car $[Fe^{III}_2$(N-EtHPTB)$(CH_3O)(CH_3OH)(H_2O)_2](ClO_4)_4$ ne fonctionne pas dans l'eau) et de NADH comme réducteur.

Références :

(1) Avenier, F.; Herrero, C.; Leibl, W.; Desbois, A.; Guillot, R.; Mahy, J.-P.; Aukauloo, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (13), 3634.
(2) Groves, J. T.; Ungashe, S. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (21), 7796.
(3) Arel, Y.; Manassen, J.; Levanon, H. *Photochem. Photohiology* **1976**, *23*, 337.
(4) Mauzerall, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84* (12), 2462.
(5) Meinershagen, J. L.; Bein, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (2), 448.
(6) Okamoto, A.; Tainaka, K.; Fujiwara, Y. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (9), 3592.
(7) Maldotti, A.; Bartocci, C.; Varani, G.; Molinari, A.; Battioni, P.; Mansuy, D. *Inorg. Chem.* **1996**, *35* (5), 1126.
(8) Tabushi, I.; Kodera, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (15), 4734.
(9) Solomon, E. I.; Heppner, D. E.; Johnston, E. M.; Ginsbach, J. W.; Cirera, J.; Qayyum, M.; Kieber-Emmons, M. T.; Kjaergaard, C. H.; Hadt, R. G.; Tian, L. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (7), 3659.
(10) Flores, M.; Olson, T. L.; Wang, D.; Edwardraja, S.; Shinde, S.; Williams, J. C.; Ghirlanda, G.; Allen, J. P. *J. Phys. Chem. B* **2015**, DOI : 10.1021/acs.jpcb.5b04172
(11) Kozlevčar, B. *Croat. Chem. Acta* **2008**, *81* (2), 369.
(12) Rajagopal, G. *Polyhedron* **1996**, *15* (3), 527.
(13) Lakshmipraba, J.; Arunachalam, S.; Riyasdeen, A.; Dhivya, R.; Akbarsha, M. A. *J. Photochem. Photobiol. B* **2015**, *142*, 59.
(14) Hoffmann, S. K.; Goslar, J.; Lijewski, S.; Basiński, K.; Gąsowska, A.; Łomozik, L. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *111*, 18.

CHAPITRE VIII

Chapitre VIII : Catalyse d'oxydation utilisant O_2 dans l'eau

I) Association d'un complexe de ruthénium photosensible avec un complexe binucléaire de fer comme catalyseur

Comme nous l'avons rappelé dans le chapitre VI, il est possible de réduire un complexe binucléaire de fer, $[Fe^{III}_2(N\text{-}EtHPTB)(CH_3OH)_2(H_2O)_2](ClO_4)_4$, en utilisant un complexe de ruthénium photosensible en présence d'un donneur sacrificiel d'électrons, comme la triéthylamine, dans l'acétonitrile. Une fois réduit, le complexe de fer peut alors réagir avec le dioxygène pour former un intermédiaire peroxo capable de réaliser l'oxydation de substrats organiques. La trop grande instabilité d'une telle espèce a rendu l'observation de sa formation impossible dans l'eau, mais nous a poussé à envisager la catalyse de l'oxydation de divers substrats par O_2 catalysée par les complexes binucléaires de fer. Pour ce faire, les différents réactifs, le catalyseur complexe binucléaire de fer et le complexe de ruthénium photoactivable Ru(TrisBiPy) en proportions stœchiométriques (0,5 mM), le donneur d'électrons sacrificiel triétylamine (100 équiv.) et le substrat (5 ou 50 équiv.) sont solubilisés dans l'eau. La solution est alors congelée dans l'azote liquide et dégazée grâce à cinq cycles vide/argon. Après retour à température ambiante, la solution est irradiée 10 minutes à 450 nm, avant d'être exposée au dioxygène pendant 2 minutes (**Schéma VIII.1**). Après 5 minutes d'agitation, les produits sont filtrés sur silice, en présence d'un étalon interne, puis analysés par chromatographie en phase gazeuse.

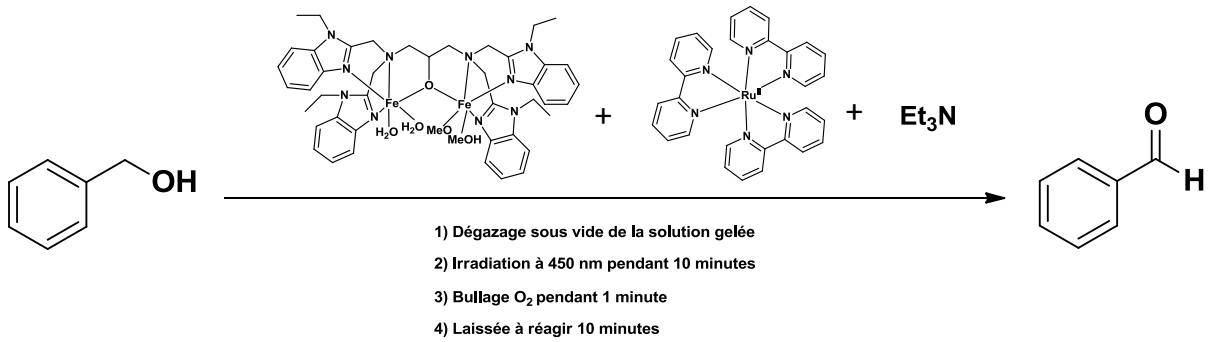


Schéma VIII.1 : Illustration de la réaction de photocatalyse d'oxydation dans l'eau de l'alcool benzylique dans les conditions de catalyse cat/Ru/N(Et)$_3$/Substrat 1 :1 :100 : (5 ou 50).

Différents substrats ont ainsi été testés tels que l'alcool benzylique, le thioanisole, le styrène et le dihydroantracène. Pour ces trois derniers, aucune activité catalytique n'a été observée. Quant à l'alcool benzylique, les résultats obtenus se sont révélés assez étonnants. (**Figure VIII.1**).

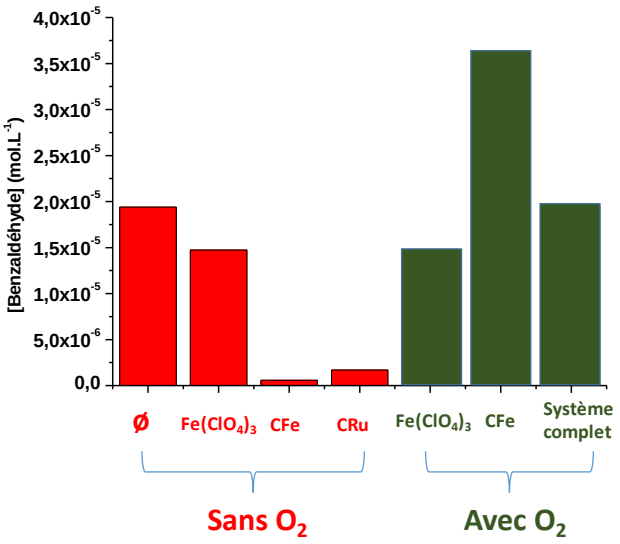


Figure VIII.1 : Concentration de benzaldéhyde formé lors de l'oxydation de l'alcool benzylique pour différents contrôles sous irradiation à 450 nm, d'abord sous atmosphère inerte (ø) : substrat seul en solution, ($Fe(ClO_4)_3$) : substrat en présence de fer perchlorate, (CFe) : substrat en présence du complexe $[Fe^{III}_2(N\text{-}EtHPTB)(CH_3OH)_2(H_2O)_2](ClO_4)_4$ et (CRu) : substrat en présence du complexe Ru(TrisBiPy), puis en présence de O_2. (Système complet) représente la réaction illustrée schéma VIII.1.

Dans un premier temps, des contrôles ont été réalisés en absence d'oxygène et de photosensibilisateur, et l'on peut immédiatement remarquer que le substrat seul est sensible à l'irradiation, avec une formation importante de produit oxydé (**Figure VIII.1, ø)**. Lorsque du perchlorate de fer est rajouté comme catalyseur, la transformation est presque aussi efficace, mais si l'on rajoute le complexe binucléaire de fer comme catalyseur, l'oxydation disparaît presque totalement. Le même effet est observé lorsque le complexe de ruthénium est ajouté à la solution de substrat. Ces résultats suggèrent que les complexes de fer et de ruthénium absorbent l'énergie lumineuse à la place du substrat, empêchant ainsi sa photo-oxydation. Si la catalyse est réalisée en présence d'oxygène et en absence de complexe de ruthénium, la quantité de produit oxydé formé en présence de perchlorate de fer ne varie pas par rapport au contrôle sans oxygène. En revanche, la présence du complexe binucléaire de fer comme catalyseur permet de doubler la quantité de benzaldéhyde formée après 10 minutes. Enfin, dans les conditions où tous les partenaires de la catalyse sont réunis (**Figure VIII.1, système complet**), la quantité de produit oxydé est identique à celle obtenue lors de la réaction sans aucun catalyseur.

En conclusion, même si le complexe de fer semble améliorer légèrement l'oxydation du substrat en présence d'oxygène, la catalyse bio-inspirée par réduction préalable du complexe de fer et l'exposition au dioxygène semble inefficace. Suite à ces résultats, nous avons décidé d'abandonner l'idée de travailler avec les complexes de ruthénium dans l'eau et nous nous sommes orientés plus spécifiquement sur la création de l'enzyme artificielle à base de FMN et de PEIFg.

II) Utilisation de la réductase artificielle associée avec les métalloporphyrines (« synzyme »)

II-A-1) Etude impliquant le polymère fonctionnalisé PEIFg (0.20/0.30)

Comme décrit dans le chapitre VI, Mn(III)TPyP est efficacement réduite par la réductase artificielle (PEI modifié + FMN) en présence de NADH, constituant ainsi le «synzyme » (PEI modifié + FMN+ Mn(III)TPyP). Elle est ensuite facilement ré-oxydée lors de son exposition au dioxygène. Il paraît donc possible de réaliser des réactions d'oxydation dans l'eau catalysées par le « synzyme » en utilisant simplement le dioxygène de l'air en tant qu'oxydant. Dans une expérience type, 1 000 équivalents de thioanisole (100 mM final) sont ajoutés à une solution contenant PEIFg (0.20/0.30) (2,5 mM), la FMN (0,1 mM) et Mn(III)TPyP (un équiv. par rapport à la FMN), dans l'eau. NADH (10 équiv. par rapport à la FMN) est alors ajouté et quelques minutes après addition de NADH, la solution rougeâtre devient verte. Le mélange est alors laissé sous atmosphère oxygénée (O_2 ; 1 bar) pendant 5 heures, à température ambiante et sous agitation. Une filtration sur une courte colonne de gel de silice permet alors d'éliminer le polymère, la FMN et la porphyrine de Mn, avant une analyse des produits formés par chromatographie en phase gazeuse. Dans ces conditions, l'oxydation du thioanisole conduit au sulfoxyde comme seul produit de la réaction, mais le rendement n'est pas significativement plus élevé que celui obtenu lors de l'expérience témoin réalisée sans polymère (10 % *vs* NADH, 1 TON). En revanche, d'autres expériences de contrôle effectuées sans la porphyrine de manganèse ou sans NADH n'ont généré aucun produit d'oxydation.

Puisque Mn(III)TPyP ne semble pas suffisamment active en catalyse, nous avons également testé une porphyrine de manganèse portant des substituants pentafluorophényle en position *méso*, (Mn(III)TF_5PP), qui est connue pour être l'une des porphyrines les plus efficaces en catalyse d'oxydation.[1] Une solution à 100 µM de cette porphyrine hydrophobe dans l'acétonitrile est tout d'abord préparée puis cette solution est diluée dans l'eau pour obtenir un mélange final eau/MeCN (9/1). En absence de polymère, la porphyrine de manganèse précipite quelques minutes après dilution dans l'eau, alors qu'à l'inverse, en présence du polymère modifié, la solution est stable pendant des heures. Ainsi, le microenvironnement localement hydrophobe du polymère permet la solubilisation de la porphyrine de manganèse dans un milieu aqueux.[2] Dans ce cas, lorsque la réaction d'oxydation du thioanisole par O_2 est effectuée dans les mêmes conditions qu'en présence de Mn(III)TPyP, la sélectivité de la réaction ne change pas, mais le rendement est amélioré de 28 % par rapport au blanc réalisé sans polymère (28 % *vs* NADH, 2,8 TON). Au contraire, si la réaction est effectuée en présence de polymère commercial, la catalyse reste inefficace.

En parallèle, nous avons tenté d'oxyder le thioanisole grâce à deux autres porphyrines, Fe(III)TDCPP et Mn(III)TPPS. Les rendements constatés sont cependant restés inférieurs à la précédente expérience utilisant Mn(III)TF_5PP (**Tableau VIII.1**). Par ailleurs, aussi bien l'ajout d'imidazole ou N-méthylimidazole, que d'anhydride benzoïque en tant que co-catalyseurs, n'augmentent pas le rendement de la réaction comme cela avait été observé dans d'autres études.[3,4,5,6]

Tableau VIII.1 : Rendements (*vs* NADH) obtenus pour la réaction d'oxydation du thioanisole par O_2 catalysée par le « synzyme » en présence de différentes métalloporphyrines ainsi que les rendements des contrôles sans PEIFg (0.20/0.30).

Catalyseur	Contrôle sans PEIFg (0.20/0.30) (%)	Rendement avec PEIFg (0.20/0.30) (%)	TON
Mn(III)TPyP	10	10	1
Mn(III)TF_5PP	0	28	2,8
Mn(III)TPPS	0	0	0
Fe(III)TDCPP	0	20	2

Dans toutes ces réactions, il est vraisemblable que la faible solubilité du substrat dans l'eau constitue un facteur limitant, et, même en préparant une solution aqueuse saturée avec du thioanisole, l'efficacité de la catalyse n'a pu être améliorée. Il nous a semblé judicieux d'étudier l'effet des différents polymères synthétisés sur l'activité catalytique avec la métalloporphyrine la plus efficace (Mn(III)TF_5PP). En particulier, nous pouvons espérer que l'utilisation de polymères plus hydrophobes, facilitant la solubilisation du substrat, favorisera l'activité catalytique.

II-A-2) Influence de la nature des polymères modifiés sur l'oxydation du thioanisole par O_2 catalysée par Mn(III)TF_5PP

Les conditions de catalyse choisies dans cette étude sont les même que celles décrites précédemment. Au préalable, avant de commencer l'étude exhaustive de l'influence de la nature des différents polymères utilisés sur la réaction, nous avons évalué l'influence des proportions de polymère PEIFg (0.20/0.30) par rapport au catalyseur sur l'activité catalytique du système. Pour mémoire, le rendement obtenu pour la formation de sulfoxyde en présence de 24 équivalents en monomère de PEIFg (0.20/0.30) par rapport à Mn(III)TF_5PP est de 28 % *vs* NADH (2,8 TON). Nous avons alors testé la même réaction en présence de différentes proportions de ce polymère, allant de 0 à 138 équivalents. Le rendement optimal a effectivement été obtenu pour 24 équivalents de PEIFg (0.20/0.30) par rapport au catalyseur.

Nous avons donc réalisé l'ensemble des études sur les différents PEIFg en utilisant tout d'abord 24 équivalents de monomère par rapport à la FMN et à la métalloporphyrine puis, afin d'étudier l'effet d'une forte concentration en polymère sur la catalyse, des réactions en présence d'une concentration en polymère correspondant à 138 équivalents de monomère ont été réalisées. Six polymères, préalablement caractérisés par RMN ^{1}H ont ainsi été utilisés en catalyse d'oxydation

du thioanisole par O_2, dans les conditions décrites précédemment, avec un ratio FMN/cat/PEIFg/NADH/ substrat de 1/1/24 (ou 138)/10/1000 (**Figure VIII.2**).

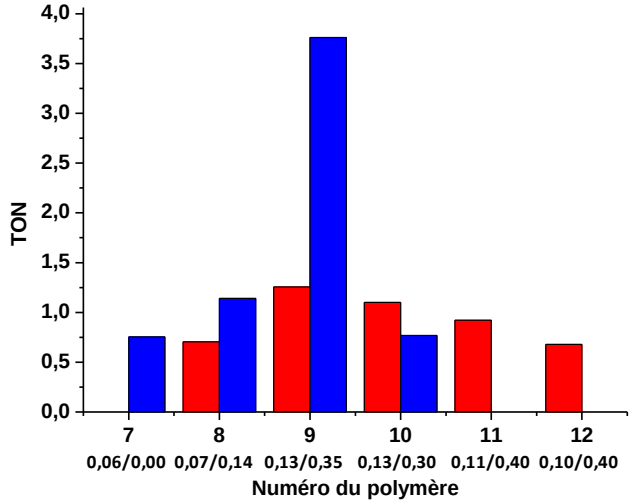


Figure VIII.2 : Nombre de cycles catalytiques (TON) effectués lors de l'oxydation du thioanisole par O_2 en présence de 24 équivalents (rouge) ou 138 équivalents (bleu) en monomère de PEIFg (7, 8, 9, 10, 11 ou 12). Les conditions de catalyse sont FMN/cat/PEIFg/NADH/ substrat de 1/1/24 (ou 138)/10/1000.

Les résultats obtenus montrent une influence déterminante de la proportion de groupements octyle incorporés dans le polymère par rapport aux groupements guanidinium sur l'efficacité de la catalyse, avec une activité optimale obtenue dans les deux cas (24 équivalents et 138 équivalents) en présence du polymère PEIFg 9 (0.13/0.35). Le rendement de la réaction de sulfoxydation est de 38 % *vs* NADH soit 3,8 TON pour le polymère PEIFg 9 (0.13/0.35) contre environ 10 % pour les autres (1 TON). Ainsi, il semble donc qu'une trop faible hydrophobicité ne soit pas propice à la catalyse, mais qu'une hydrophobicité trop importante devienne également néfaste. Le polymère PEIFg 9 (0.13/0.35) permet ainsi d'augmenter l'efficacité du « synzyme » de 10 %, par rapport à l'utilisation du PEIFg (0.20/0.30).

Quelques tests ont par ailleurs été réalisés en présence de 100 équivalents de NADH comme réducteur, au lieu de 10 équivalents précédemment utilisés, ce qui permet d'obtenir 8 TON maximum (8 % de rendement *vs* NADH). Néanmoins, ces conditions restent à optimiser et nous avons choisi de poursuivre nos études en ne modifiant pas la quantité de NADH initiale, fixée à 10 équivalents.

II-A-3) Oxydation d'autres substrats par O_2 catalysée par le « synzyme »

L'oxydation par O_2 de nombreux autres substrats, comme le styrène, le diphénylméthane (DPM), le cyclooctène, le cyclohexane, l'ethylbenzène, le cyclohexène et le méthoxythioanisole, a été testée dans les conditions optimales établies au paragraphe précédent. Les quatre premiers substrats n'ont pas été oxydés par le « synzyme » lorsque nous utilisions une métalloporphyrine (Mn(III)TF_5PP) comme catalyseur. Par ailleurs, l'activité catalytique observée avec le

méthoxythioanisole n'est pas meilleure que celle observée avec le thioanisole, puisque des rendements similaires sont observés allant de 20 à 30 % *vs* NADH. Dans le cas de l'éthylbenzène, un rendement de 25 % en alcool correspondant est obtenu, alors que l'expérience de contrôle sans polymère conduit à un rendement de 10 % seulement.

L'oxydation du cyclohexène conduit quant à elle à des résultats surprenants. En effet, lorsqu'on réalise la catalyse d'oxydation du cyclohexène avec l'enzyme artificielle, 70 TON sont effectués alors que, tenant compte du nombre d'équivalents de NADH ajoutés (10 équiv. par rapport à Mn(III)TF_5PP), le nombre maximal de turnovers attendu est de 10. L'oxydation du cyclohexène n'est donc pas due uniquement à la réaction avec O_2 catalysée par le « synzyme ». De plus, la réaction, réalisée en l'absence de FMN, puis de PEIFg, et enfin de NADH, conduit dans tous les cas à un rendement supérieur à 100 % *vs* NADH (700 %, 70 TON). Une photoréduction de la porphyrine qui permettrait d'activer directement le dioxygène a tout d'abord été envisagée, mais cette hypothèse a dû être écartée car le même nombre de TON est observé lorsque la réaction est réalisée à l'abri de la lumière. De plus, lorsque Mn(III)TF_5PP est utilisée seule comme catalyseur, le cyclohexène est oxydé avec et en absence de lumière avec des TON *vs* catalyseur proches de 100 en une heure, ce qui confirme que la porphyrine n'est pas photo-réduite. Par la suite, la réaction d'oxydation du cyclohexène a été menée sous argon et seulement 8 TON *vs* catalyseur ont été obtenus, ce qui correspond à la valeur observée lors du contrôle sans la porphyrine de manganèse. Le même comportement a pu être constaté en présence de la porphyrine de fer, Fe(III)TDCPP, comme catalyseur. Il est alors possible que O_2 soit nécessaire à l'oxydation du cyclohéxène par la métalloporphyrine, ce comportement avait déjà été observé dans la littérature.[7]

Pour conclure, les rendements obtenus pour la réaction d'oxydation du thioanisole catalysée par le « synzyme » (20 à 30 % *vs* NADH) restent modestes, ce qui peut facilement s'expliquer par la difficulté de forcer au sein d'un système unique, en solution aqueuse, trois verrous scientifiques majeurs : (1) La transformation du transfert initial de 2 électrons du NADH vers la FMN en deux tranferts monoélectroniques séquentiels et sélectifs de la FMN vers le centre métallique, (2) l'activation réductrice du dioxygène par ce même centre métallique et (3) l'oxydation sélective d'un substrat par l'entité catalytique formée en milieu aqueux. Néanmoins, ces résultats constituent une preuve de concept et démontrent qu'un cycle catalytique complet d'oxydation d'un substrat par O_2, peut être réalisé grâce à l'utilisation d'un système artificiel soluble dans l'eau « synzyme », associant un PEIFg, la FMN et une métalloporphyrine, qui est capable de reproduire l'activité des monooxygénases à fer de type cytP450 (**Schéma VIII.2**).

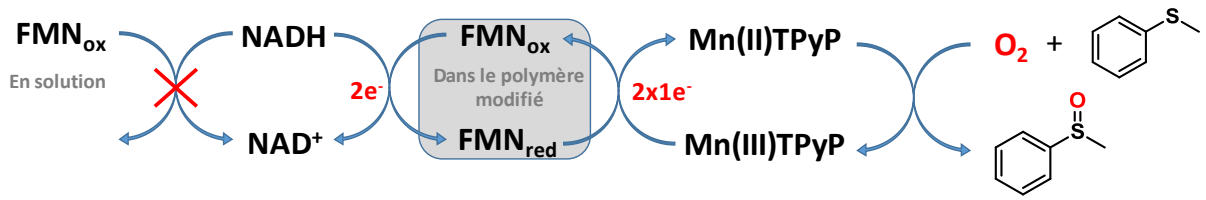


Schéma VIII.2 : Représentation schématique du système catalytique « synzyme » dans son ensemble.

L'extension de ce système, relativement simple, à différents processus catalytiques nécessitant une entrée régulière et précise d'électrons, et impliquant comme catalyseurs des cofacteurs métalliques comme les complexes mononucléaires de cuivre(II) ou binucléaires de fer(III) a été envisagée dans les paragraphes suivants.

III) Utilisation de la réductase artificielle associée à des complexes non-héminiques de cuivre et de fer

III-A) Oxydation du thioanisole par O_2 dans l'eau, catalysée par des complexes non-héminiques de cuivre et de fer, en présence de PEIFg (0.20/0.30)

Des tests préliminaires de catalyse ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles utilisées avec les métalloporphyrines (FMN/cat/PEIFg/NADH/substrat : 1/1/6(ou138)/10/1000), dans un mélange eau/MecN (9 /1), en présence du polymère modifié PEIFg (0.20/0.30). Nous avons alors pu observer une activité catalytique pour l'oxydation du thioanisole par O_2 de la part des deux complexes $[Cu^{II}(TPA)H_2O](OTf)_2$ et $[Fe^{III}_2(HTPDP)(CH_3OH)_3(CH_3O)](ClO_4)_4$ respectivement appelés complexes $Cu^{II}TPA$ et $Fe^{III}_2(HTPDP)$ dans la suite de ce manuscrit. Le rendement de cette réaction est similaire avec ces deux complexes allant de 20 et 30 % de rendement vs NADH (2 à 3 TON). Différents contrôles ont également été effectués, montrant l'absence d'oxydation en absence de polymère d'une part, et, d'autre part, lors du remplacement respectif des complexes par des sels de cuivres ($Cu(OTf)_2$) et de fers ($Fe(ClO_4)_3$ avec ou sans polymère. La réaction d'oxydation du thioanisole n'est pas non plus catalysée en absence de FMN, ce qui corrèle, les résultats obtenus lors de nos expériences de RPE précédentes, démontrant que le NADH seul n'est pas capable de réduire le cuivre. Par la suite, nous avons étudié l'influence des différents polymères sur le rendement de la réaction d'oxydation du thioanisole.

III-A-1) Influence des proportions de PEIFg (0.20/0.30) sur l'activité catalytique des complexes non-héminiques de cuivre et de fer

Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de la quantité du polymère PEIFg (0.20/0.30) ajouté en solution sur l'efficacité de la réaction d'oxydation du thioanisole catalysée par le « synzyme » associant le PEIFg, la FMN et le catalyseur (ici complexe de cuivre ou de fer). La **Figure VIII.3** montre que lorsque les proportions de polymère augmentent de 6 à 138 équivalents en PEIFg (0.20/0.30), le rendement en sulfoxyde diminue en présence du complexe de cuivre, passant de 18 % (1,8 TON) à 5 % (0.5 TON) *vs* NADH, alors qu'au contraire, en présence du complexe de fer il augmente pour atteindre 22 % *vs* NADH (2.2 TON) pour 138 équivalents de PEIFg (0.20/0.30). Ce comportement pourrait être dû aux différences de solubilité des deux complexes dans l'eau. En effet, le complexe de fer n'est que très peu soluble dans l'eau et Il faut préparer tout d'abord une solution mère à 1mM dans l'acétonitrile avant de l'ajouter à la phase aqueuse. On pourrait supposer

que les fortes concentrations en polymère pourraient alors faciliter sa solubilisation en l'incorporant dans un environnement localement hydrophobe et ainsi favoriser son activité catalytique. Inversement, le complexe de cuivre, très soluble dans l'eau, n'aurait pas la même accessibilité à l'environnement localement hydrophobe du polymère. Ces observations sont tout à fait en accord avec les variations du TON en sulfoxyde obtenus en fonction de la quantité de PEIFg (0.20/0.30) mis dans le milieu réactionnel pour les deux complexes (**Figure VIII.3**).

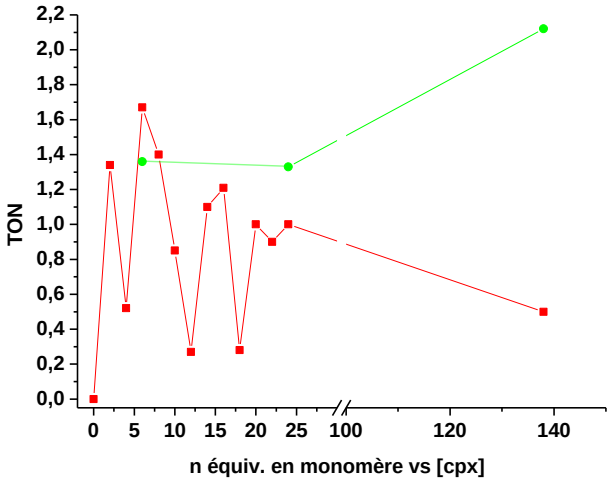


Figure VIII.3: Influence de la quantité de PEIFg (0.20/0.30) sur le rendement de la réaction d'oxydation du thioanisole pour le complexe $Cu^{II}TPA$ (en rouge) et le complexe $Fe^{III}_2(HTPDP)$ (en vert) : conditions (FMN/cat/ PEIFg (0.20/0.30) /NADH/substrat : 1/1/néq PEIFg (0.20/0.30) /10/1000). Les points sont reliés pour faciliter la lecture du graphique.

III-A-2) Influence du pH sur l'activité catalytique en présence de PEIFg (0.20/0.30) des complexes non-héminiques de cuivre et de fer

Comme dans le cas des métalloporphyrines, nous avons étudié l'influence du pH de la solution sur l'activité catalytique des complexes de cuivre et de fer. L'oxydation du thioanisole a donc été effectuée à différents pH dans les tampons MES et HEPES entre les pH 6 et 8. (**Fig.VIII.4**)

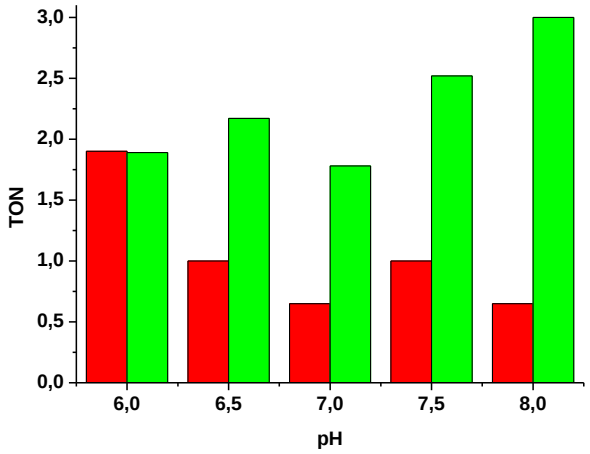


Figure VIII.4 : Nombre de cycles catalytiques (TON) achevés lors de l'oxydation du thioanisole en sulfoxyde, en fonction du pH pour Cu^{II}TPA (en rouge) et Fe^{III}_2(HTPDP) (en vert) dans les tampons MES (pH 6 ; 6,5) ou HEPES (pH 7 ; 7,5 ou 8). Conditions de catalyse (FMN/cat/ PEIFg (0.20/0.30)/NADH/substrat : 1/1/6 (ou 138)/10/1000)

La **Figure VIII.4** montre que Cu^{II}TPA fonctionne de manière plus efficace à des valeurs de pH inférieur à 7, conduisant à 17 % de rendement en sulfoxyde *vs* NADH (1,7 TON) à pH 6. Cependant, ce rendement reste inférieur à celui observé dans l'eau seule (20 %, 2 TON). Pour Fe^{III}_2(HTPDP), la réaction est plus efficace à des pH supérieurs à 7 avec 30 % de rendement *vs* NADH (3 TON) à pH 8. Toutefois le rendement reste sensiblement identique à celui observé dans l'eau.

Ces résultats nous ont conduits à continuer les études dans l'eau distillée, plutôt qu'en milieu tamponné, pour tester l'influence des 30 PEI modifiés obtenus sur la réaction d'oxydation du thioanisole par O_2 dans l'eau catalysée par le « synzyme » (**Tableau VIII.1**).

III-B) Influence de la nature des polymères sur l'oxydation du thioanisole par O_2

III-B-1) Réaction de catalyse d'oxydation se déroulant dans l'eau distillée

Dans le **Tableau VIII.1**, les différents polymères sont classés en séries, chaque série présentant une proportion de groupements guanidinium fixe et une proportion de groupements octyle pouvant varier de 0 jusqu'à 2 équivalents par monomère. Les conditions de catalyse utilisées précédemment ont tout d'abord été reproduites, seul le nombre d'équivalents de PEIFg a été modifié, de façon à se placer dans les conditions optimales pour la catalyse par le complexe de cuivre (6 équivalents de PEIFg), et par le complexe de fer (138 équivalents de PEIFg) (**Figure VIII.5**).

Tableau VIII.2: Tableau des 4 séries de polymères utilisées en catalyse qui diffèrent par la quantité de guanidinium. À l'intérieur de chacune des séries, la quantité d'octyles varie. Série 1 (0.1 guanid/n octyle) ; Série 2 (0.2 guanid/n octyle) ; Série 3 (0.4 guanid/n octyle) ; Série 4 (0.6 guanid/n octyle).

Numéro polymère	Rapport quantifié par RMN guanidinium/octyl vs [mono]	Numéro polymère	Rapport quantifié par RMN guanidinium/octyl vs [mono]
1	0,04/0,00	16	0,30/0,04
2	0,10/0,20	17	0,30/0,08
3	0,10/0,40	18	0,31/0,15
4	0,10/0,30	19	0,30/0,14
5	turbide	20	0,33/0,17
6	turbide	21	0,30/0,20
7	0,06/0,00	22	0,31/0,20
8	0,07/0,14	23	0,44/0,00
9	0,13/0,35	24	0,24/0,01
10	0,13/0,30	25	0,33/0,03
11	0,10/0,40	26	0,32/0,04
12	0,11/0,4	27	0,33/0,07
13	0,20/1,00	28	0,34/0,15
14	0,20/2,00	29	0,34/0,18
15	0,08/0,00	30	0,35/0,20

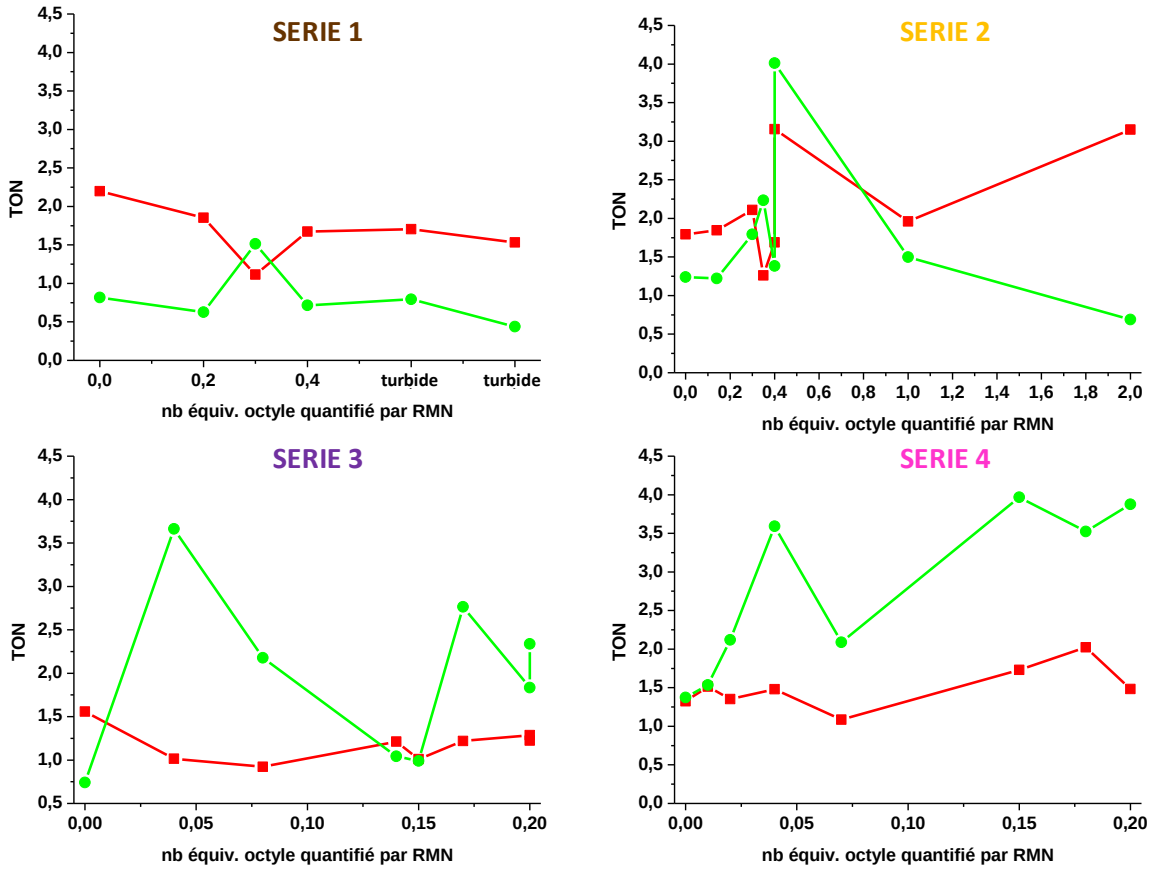


Figure VIII.5 : Nombre de cycles catalytiques pour l'oxydation du thioanisole en fonction du nombre d'équivalents de chaînes n-octyle, pour quatre séries de PEIFg Série 1 (0.1 guanid/n octyle) ; Série 2 (0.2 guanid/n octyle) ; Série 3 (0.4 guanid/n octyle) ; Série 4 (0.6 guanid/n octyle). Conditions de catalyse : FMN/Cat/PEIFg /NADH/ Substrat 1/1/ (6 ou 138)/10/1000 ; catalyseur = Fe^{III}_2(HTPDP) (en vert), Cu^{II}TPA (en rouge). Les points sont reliés pour faciliter la lecture du graphique.

Lors de cette étude, le comportement observé pour les deux catalyseurs est très différent, mais sélectif de la formation de sulfoxyde. Le complexe de cuivre $[Cu^{II}(TPA)H_2O](OTf)_2$, en rouge sur les graphiques, fonctionne mieux pour la **Série 1** lorsqu'il n'y a pas de groupement octyle sur le polymère. Le rendement observé est alors de 22 % *vs* NADH (2,2 TON). Au contraire, le complexe de fer $[Fe^{III}_2(HTPDP)(CH_3OH)_3(CH_3O)](ClO_4)_4$ est plus efficace dans cette **Série 1**, lorsque le polymère porte des octyles. Le rendement est alors maximal pour le PEIFg 4 (0.10/0.30), avec 16 % de rendement (1,6 TON), sans pour autant être supérieur au polymère PEIFg (0.20/0.30 (28 %, 2,8 TON). Lorsque l'on ajoute davantage de groupements octyle, l'activité catalytique chute alors drastiquement.

Pour la **Série 2**, qui présente plus de groupements guanidinium (0.2 équivalent *vs* [mono]), les deux catalyseurs observent pratiquement le même comportement, avec une efficacité maximale obtenue en utilisant le PEIFg 12 (0,11/0,4). Des rendements de 32.5 % (3,25 TON) et 42 % (4,2 TON) sont ainsi obtenus pour Cu^{II}TPA et Fe^{III}_2(HTPDP) respectivement. Ainsi, ce polymère permet une meilleure activité catalytique que le polymère de référence. Il faut cependant noter que pour deux équivalents d'octyle, le comportement des deux catalyseurs est totalement opposé, probablement

du fait d'un manque d'hydrophobicité, néfaste à l'activité de Fe^{III}_2(HTPDP) et favorisant celle de Cu^{II}TPA.

Si l'on compare les polymères des Séries **3** et **4**, leur fonctionnalisation semble comporter des similitudes. De plus, on remarque que le taux de greffage réel quantifié par RMN ^{1}H des groupements octyle est très faible et assez éloigné taux de greffage idéal. De ce fait, il est possible que l'influence sur la catalyse provienne essentiellement des groupements guanidinium

Pour les Séries **3** et **4**, le complexe Cu^{II}TPA n'est que peu influencé par les différents polymères, et paraît même plus efficace en l'absence d'octyle ce qui est surement lié à sa solubilité dans l'eau. Le rendement maximal observé est alors de 15 % *vs* NADH (1,5 TON). Au contraire, dans la **Série 3**, Fe^{III}_2(HTPDP) ne démontre aucune efficacité en l'absence de groupements octyle. Toutefois, avec un faible greffage de groupements octyle (PEIFg 16 (0.30/0.04)), l'activité du catalyseur est multipliée par 7 et le rendement en sulfoxyde passe de 5 % à 36 % (0.5 à 3.6 TON). Ensuite, cette activité chute et redevient bonne (rendement en sulfoxyde de 25 %, 2,5 TON) pour le PEIFg 20 (0.30/0.17). Pour finir, nous pouvons constater une augmentation de l'activité catalytique corrélée avec l'augmentation de la quantité de groupements octyle dans la **Série 4** avec Fe^{III}_2(HTPDP). En effet, globalement, l'activité catalytique est d'autant plus élevée qu'il y a de groupements octyle, pour plafonner à 40 % (4 TON) pour le PEIFg 28 (0.34/0.15). Il est intéressant de noter que les PEIFg 16 (0.30/0.04) et 26 (0.32/0.04 RMN) sont quasiment identiques et que l'on retrouve une activité catalytique très proche lorsqu'on les utilise avec soit Cu^{II}TPA, soit Fe^{III}_2(HTPDP).

Finalement, ces expériences de catalyse nous ont permis de sélectionner le meilleur polymère modifié pour le complexe de cuivre. Il s'agit ainsi du PEIFg 12 (0,11/0,40), conduisant à un rendement de 32.5 % en sulfoxyde. En ce qui concerne le complexe de fer, quatre polymères ont été sélectionnés, les PEIFg 12 (0,11/0,40) ; 16 (0.30/0.04 RMN) ; 26 (0.32/0.04 RMN) ; 28 (0.34/0.15), qui conduisent tous les quatre à des rendements proches de 40 % *vs* NADH.

Des expériences contrôle identiques à celles effectuées avec les métallo-porphyrines, ont été réalisées pour les deux complexes, sans PEIFg, sans FMN, sans aucun des deux, et enfin, sans catalyseur. Tous ces contrôles se sont révélés négatifs.

Dans le but d'explorer le potentiel catalytique de nos systèmes, nous avons par la suite réalisé les même expériences, mais en ajoutant 50 équivalents de NADH. Les résultats obtenus après 24 heures de réaction sont regroupés dans la **Figure VIII.6**.

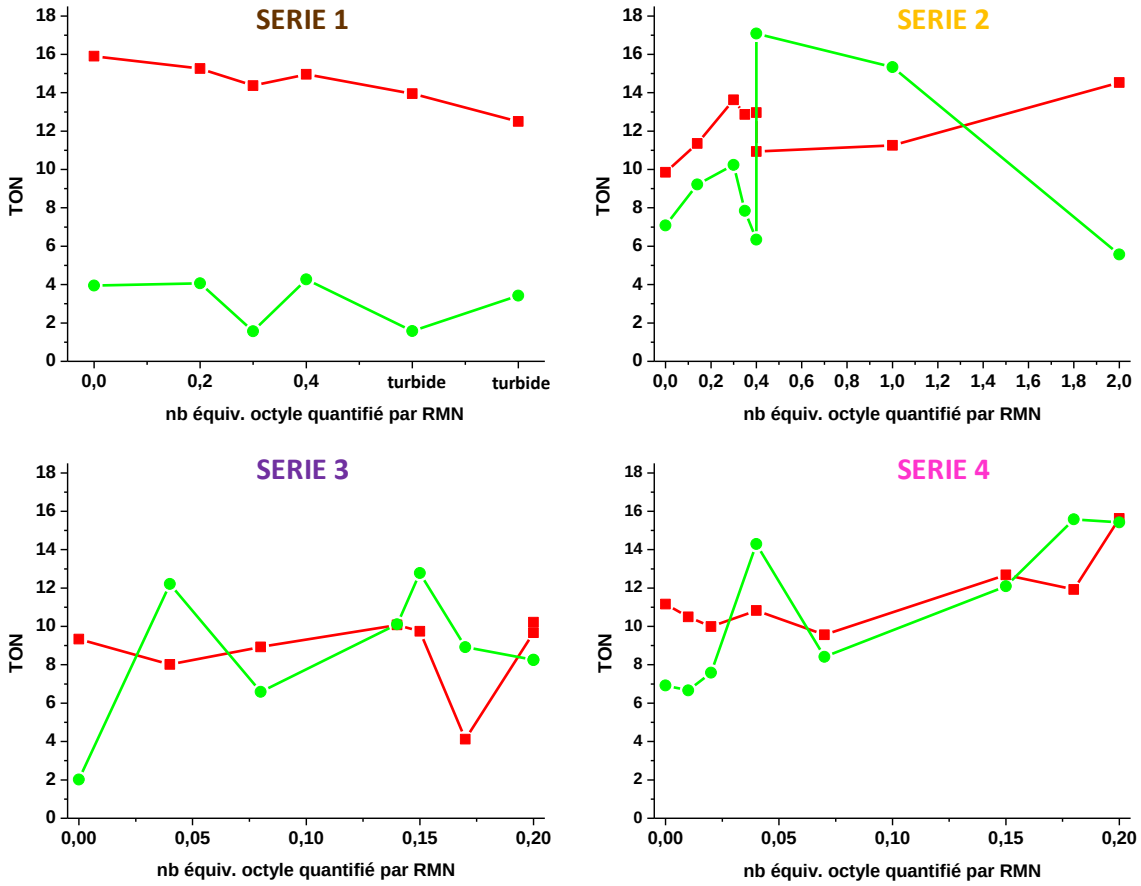


Figure VIII.6 : Nombre de cycles catalytiques pour l'oxydation du thioanisole en fonction du nombre d'équivalents de chaînes n-octyle, pour quatre séries de PEIFg Série 1 (0.1 guanid/n octyle) ; Série 2 (0.2 guanid/n octyle) ; Série 3 (0.4 guanid/n octyle) ; Série 4 (0.6 guanid/n octyle). Conditions de catalyse : FMN/Cat/PEIFg /NADH/ Substrat 1/1/ (6 ou 138)/50/1000 ; catalyseur = Fe^{III}_2(HTPDP) (en vert), Cu^{II}TPA (en rouge). Les points sont reliés pour faciliter la lecture du graphique.

La première information à noter est que les rendements de la réaction d'oxydation du thioanisole catalysée par le « synzyme », sont assez similaires à ceux observés avec 10 équivalents de NADH, c'est à dire entre 4 et 40 %, mais le nombre de TON effectués est plus important (2 à 18 TON). De plus la réaction d'oxydation est encore sélective de la formation du sulfoxyde.

Pour la **Série 1** de polymères, on observe une différence importante entre les deux complexes. Le catalyseur Cu^{II}TPA fonctionne très bien et les TON effectués vont de 14 à 18 avec des rendements en sulfoxyde compris entre 28 et 36 %. En revanche, le complexe Fe^{III}_2(HTPDP) est très peu efficace, avec un rendement en sulfoxyde inférieur à 10 % dans chacun des cas (TON < 5). Par ailleurs, aucun des deux ne semble sensible aux proportions en groupements octyle dans cette Série. En revanche, dans les autres Séries de polymères, les deux catalyseurs ont des comportements relativement similaires. Dans le cas de la **Série 2**, le comportement du cuivre est semblable lorsqu'on utilise 10 ou 50 équivalents de NADH. Cependant, son efficacité maximale (rendement 28 %, 14 TON) n'est pas atteinte avec le même PEIFg (ici PEIFg 14 (0.20/2.00), et, surtout, le complexe semble mieux supporter la présence des groupements octyle dans le polymère modifié. Le catalyseur Fe^{III}_2HPTB, quant à lui, permet d'obtenir un rendement d'oxydation maximal dans la **Série 2** avec le

polymère 12 (0,11/0,4), comme constaté précédemment, affichant un rendement de 34 % (17 TON). Concernant les Séries **3** et 4, nous pouvons observer que le comportement des deux catalyseurs est sensiblement le même, avec des rendements maximaux en sulfoxyde comparables, de l'ordre de 18 % (9 TON) pour la **Série 3** et de 36 % (18 TON) pour la **Série 4**. En revanche, ces efficacités ne sont pas atteintes en présence des mêmes PEIFg. Globalement, il est intéressant de remarquer que le comportement de Cu^{II}TPA est très affecté par la quantité de NADH en solution. Ce n'est pas le cas de Fe^{III}_2(HTPDP), capable d'atteindre son meilleur rendement catalytique quelle que soit la quantité de NADH.

Pour conclure, l'activité du complexe de cuivre Cu^{II}TPA est moins influencée par la diversité des polymères modifiés que le complexe de fer Fe^{III}_2(HTPDP). La solubilité de ces complexes n'étant pas la même, nous pouvons alors supposer que Cu^{II}TPA est solubilisé de façon homogène en solution, à l'image de la porphyrine, alors que Fe^{III}_2(HTPDP) est encagé dans les poches hydrophobes des polymères.

En outre, un test d'oxydation a été effectué avec le PEIcom dans les mêmes conditions, afin de bien mettre en évidence l'influence des groupements fonctionnels sur le PEIFg. Le catalyseur de cuivre réalise alors jusqu'à 12 TON (24 % de rendement *vs* NADH), concurrençant le maximum observé de 18 TON (36 % de rendement) obtenu avec le PEIFg 30 (0.35/0.20), tout en sachant que sans PEIFg, seuls 2.6 TON (5 % de rendement) de produit d'oxydation sont observables. Pour le complexe de fer au contraire, l'utilisation du PEI commercial est moins favorable, avec seulement 3.3 TON (6,6 % de rendement) obtenu ; quantité similaire au contrôle sans polymère. Ces résultats sont en accord avec les expériences précédentes démontrant la nécessité de la présence d'un environnement localement hydrophobe pour que le complexe de fer soit efficace. En revanche, le cuivre étant soluble dans l'eau, il peut fonctionner en absence de groupements octyle. Cependant, la présence du polymère pour que le complexe de cuivre soit efficace pour catalyser la réaction d'oxydation du thioanisole est obligatoire.

III-B-2) Influence du pH sur la catalyse en milieu tamponné

Les conditions de catalyse choisies sont ici FMN/Cat/PEIFg/NADH/Substrat 1/1/6 (ou 138)/50/1000. Pour ces études, qui sont réalisés par un souci de rigueur, nous utiliserons le PEIFg 30 (0.35/0.20), qui conduit à une activité maximale des deux catalyseurs, ainsi que le PEIFg 4 (0.10/0.30), pour lequel la différence d'efficacité entre les deux catalyseurs est optimale en faveur du complexe de cuivre. Enfin, le PEIFg 12 (0,11/0,4) a été choisi pour les raisons inverses au PEIFg 4.

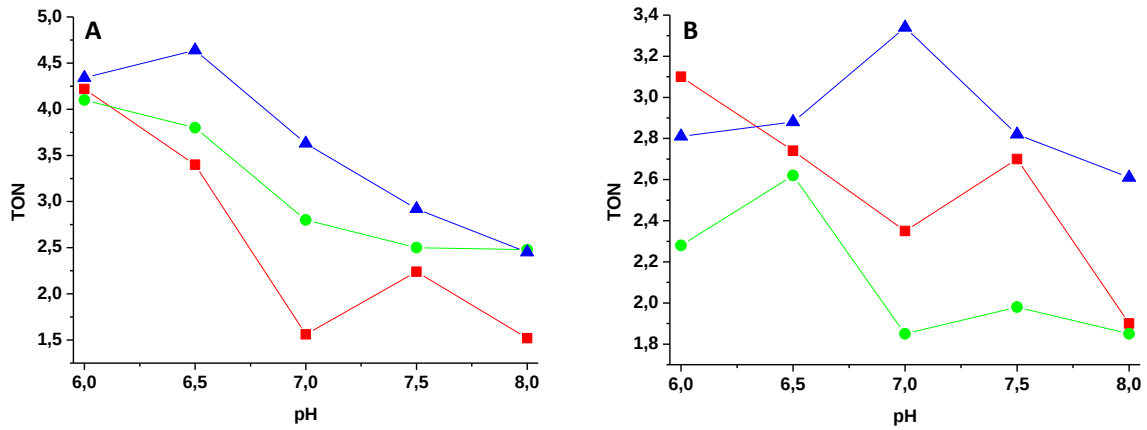


Figure VIII.7 : Influence du pH sur la catalyse des complexes (A) de cuivre et (B) de fer, en utilisant les trois polymères les plus pertinents 12 (■) ; 4 (●) et 30 (▲). Conditions de catalyse : (FMN/cat/PEIFg/NADH/substrat : 1/1/6 (ou 138)/50/1000) dans des tampons MES (pH 6 ; 6,5) ou HEPES (pH 7 ; 7,5 ou 8). Les points sont reliés pour faciliter la lecture du graphique.

Les résultats obtenus, regroupés dans la **Figure VIII.7,** montrent que, d'une façon générale, l'activité catalytique est divisée par quatre en solution tamponnée : les rendements en sulfoxyde chutant de 32-36 % (16-18 TON) à 3-10 % (1,5-5 TON) *vs* NADH. Par ailleurs, le complexe de cuivre est plus efficace en milieu plutôt acide alors que le complexe de fer est plus efficace aux pH proches de la neutralité. La **Figure VIII.7 A** permet d'établir une corrélation entre la valeur du pH et l'activité catalytique du complexe Cu^{II}TPA : plus le pH de la solution est élevé, moins cette dernière est importante. Ce résultat corrobore bien l'hypothèse d'un transfert d'électron couplé à un transfert de protons lors des réactions catalysées par Cu^{II}TPA, un transfert de protons moins efficace en milieu basique, conduisant à un rendement beaucoup plus faible, passant de 10 % à 4 %. L'interprétation de la **Figure VIII.7 B** concernant les réactions catalysées par Fe^{III}_2(HTPDP), est plus délicate. On peut malgré tout remarquer une diminution de l'activité lorsque le pH est au-dessus de la neutralité. Par ailleurs, le constat intéressant ici est que les trois polymères atteignent une activité maximale à 3 valeurs de pH différentes : pH égal à 7,5 pour PEIFg 12 (0,11/0,4), avec un rendement de 5 % (2,6 TON), pH égal à 6.5 pour PEIFg 4 (0.10/0.30) avec un rendement de 5 % (2,7 TON) et pH égal à 7 pour PEIFg 30 (0.35/0.20) avec un rendement de 7 % (3,4 TON)). Ainsi, plus le polymère contient de groupements octyle, plus le système est capable de supporter un pH élevé. Cependant, nous déplorons l'influence défavorable exercée par les tampons sur l'activité catalytique, probablement due à une force ionique trop importante, empêchant les interactions électrostatiques ou perturbant les transferts d'hydrures et de protons. Ces résultats confirment les résultats obtenus précédemment, lors des réactions catalysées par les porphyrines.

L'ensemble des réactions décrites jusqu'à présent ont majoritairement été réalisées sur des temps de réaction de 5 heures ou de 24 heures, en fonction des conditions utilisées. Cependant, une étude cinétique de ces réactions a été entreprise pour optimiser les conditions d'utilisation du « synzyme ».

III-B-3) Suivi de la réaction d'oxydation du thioanisole catalysée par les deux complexes Fe^{III}_2(HTPDP) et Cu^{II}TPA

Toujours dans les conditions de catalyse FMN/Cat/PEIFg/NADH/Substrat 1/1/6(ou 138)/50/1000, nous avons choisi le polymère pour lequel l'activité catalytique des catalyseurs est la meilleure, c'est à dire avec le PEIFg 30 (0.35/0.20) pour le complexe de cuivre et le PEIFg 4 (0.10/0.30) pour le complexe de fer. La **Figure VIII.8** montre les résultats obtenus grâce à 8 réactions, menées en parallèle et traitées à différents temps au cours de la réaction, de façon à obtenir 8 points entre 0 et 50 heures de réaction.

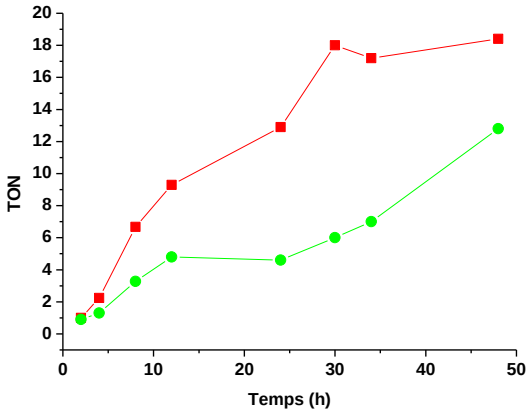


Figure VIII.8 : Suivi de la réaction d'oxydation du thioanisole dans les conditions de catalyse FMN/Cat/PEIFg/ NADH/Substrat 1/1/ (6 ou 138)/50/1000 avec le PEIFg 30 (0.35/0.20) pour le complexe de cuivre (■) et le PEIFg 4 (0.10/0.30) pour le complexe de fer (●). Les points sont reliés pour faciliter la lecture du graphique.

Le rendement en sulfoxyde avec le complexe Fe^{III}_2(HTPDP) est moins important que celui obtenu grâce au complexe de cuivre. Cette étude montre cependant que pour Cu^{II}TPA, (**Fig. VIII.8, (■)**), la réaction d'oxydation atteint un plateau au bout de 30 heures avec un rendement de 36 % (18 TON) en sulfoxyde. Plusieurs hypothèses s'offrent ainsi à nous : soit le NADH est consommé en totalité, mais la réaction n'est pas quantitative, toutefois l'ajout de 10 équivalents supplémentaires de NADH n'a pas été encore expérimenté, soit le complexe se dégrade au bout de 30 heures. La saturation du polymère peut également être envisagée, du fait des groupements phosphate portés par le NADH. A ce jour nous n'avons pas encore caractérisé les raisons de ce comportement. Quant au complexe de fer (**Fig. VIII.8, (●)**), la réaction d'oxydation semble être plus lente et se poursuit après 48 heures, ce qui indique une plus grande robustesse mais une moins grande réactivité de Fe^{III}_2(HTPDP) par rapport à Cu^{II}TPA.

Lors des expériences de réduction de la FMN par NADH dans le chapitre VI, nous avions observé que la FMN n'était pas réduite par des proportions de NADH relativement faibles (jusqu'à au moins 10 équivalents). En revanche, en présence de 50 équivalents, nous avions pu observer une faible réduction de la FMN. Dans ces conditions, même si les contrôles déjà effectués avec 10 équivalents ne montraient aucune activité catalytique, il nous a semblé judicieux de réaliser des contrôles supplémentaires pour les catalyses utilisant 50 équivalents de NADH au lieu de 10.

Ainsi nous avons pu constater que la FMN seule, en présence de 50 équivalents de NADH, permettait d'oxyder le thioanisole avec un rendement de 46 % *vs* NADH (soit 23 TON). Si l'on rajoute le PEIFg (0.20/0.30), le rendement croît jusqu'à 60 % (30 TON). Les composés flaviniques, comme la FMN, sont connus pour avoir une activité oxygénase au sein d'enzymes appelées flavine-monooxygénases. Il paraît donc possible qu'une fois réduite par NADH la FMN soit capable d'oxyder le thioanisole, ce qui n'est pas le cas pour des proportions de NADH égales ou inférieures à 10 équivalents. Il est également possible qu'en présence de catalyseur métallique, le transfert d'électron entre la FMN et le complexe soit suffisamment rapide pour que la réaction entre la FMN réduite et le dioxygène n'ait pas le temps de se produire. Dans ce cas, les rendements observés pour le système complet pourraient provenir exclusivement de l'activité du complexe métallique et non de la FMN, ce qui devrait permettre, à terme, de pouvoir oxyder d'autres substrats qui ne sont pas oxydés directement par la FMN (**Schéma VIII.3**).

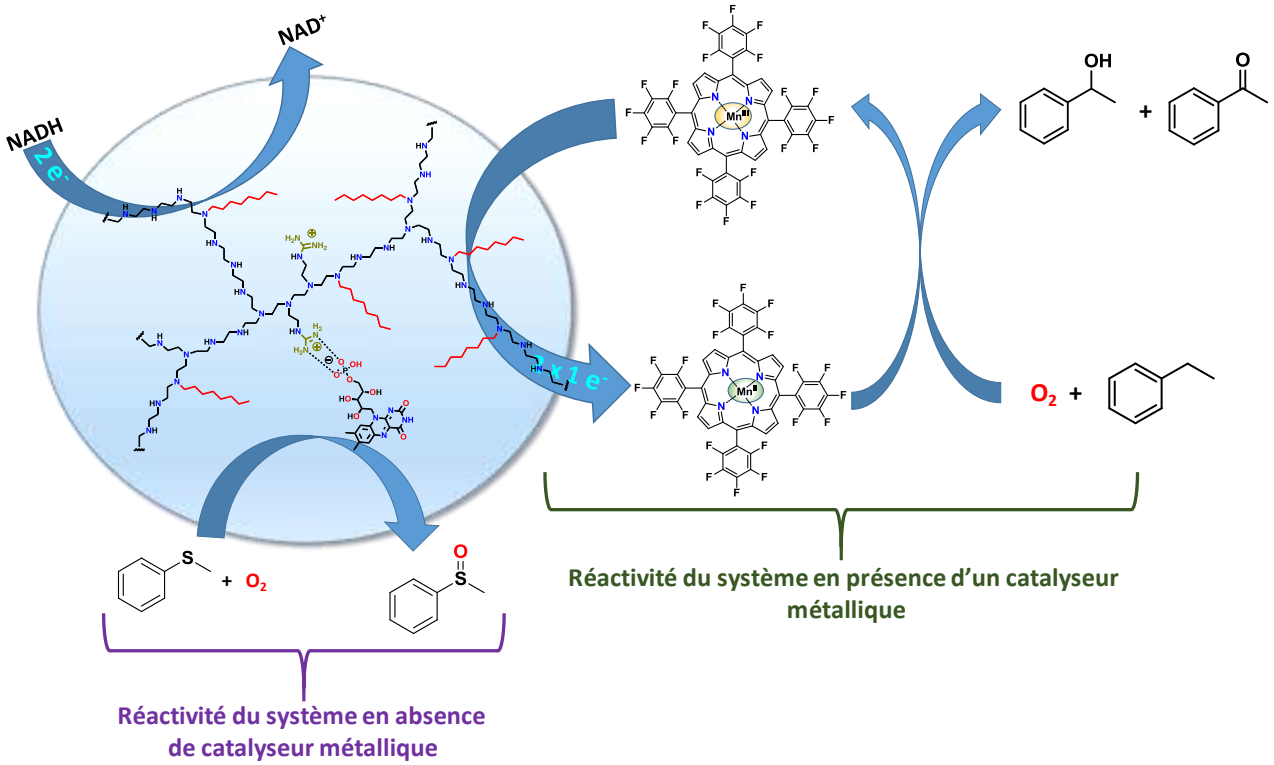


Schéma VIII.3 : Représentation schématique des deux réactions qui peuvent avoir lieu au sein du « synzyme ». À gauche, en violet, l'activité liée à la flavine dans le PEI modifiée ; à droite, en vert, l'activité liée à la combinaison de la réductase artificielle avec un catalyseur métallique (ici une porphyrine de manganèse (III)).

Dans le but de tester la différence d'efficacité entre l'activité réductase de la FMN et son activité oxygénase, nous avons réalisé la catalyse d'oxydation du thioanisole en présence de FMN, de PEIFg (0.20/0.30) et d'un accepteur d'électron $[Co(NH_3)_5Cl]Cl_2$ (1 équivalent vs NADH). Dans ce cas, tout le produit oxydé formé devrait provenir exclusivement de l'activité oxygénase de la FMN car il n'y a pas en solution d'autres espèces permettant l'oxydation d'un substrat. L'expérience ainsi conduite démontre l'absence totale de produit oxydé. Il semble donc que l'activité réductase de la FMN, incorporée au polymère, soit suffisamment rapide pour interdire la réactivité de cette même

FMN avec le dioxygène. On peut donc considérer que les 36% (18 TON pour 50 équivalents de NADH) de rendement obtenus avec les complexes de cuivre ou de fer proviennent exclusivement de l'activité des complexes et non pas de la FMN. Les contrôles réalisés en absence de polymère conduisent pour les deux catalyseurs à des rendements de 6 % *vs* NADH soit 3 TON.

Ayant conscience que les résultats avec le thioanisole utilisé comme substrat pouvaient être sujets à controverse, nous avons décidé de tester de nouveaux substrats pour lesquels les flavoréductases n'ont théoriquement pas d'activité oxydante.

III-B-4) Catalyse d'oxydation sur de nouveaux substrats

Afin de réaliser à nouveau des réactions d'oxydation catalysées par le « synzyme », d'autres substrats ont été essayés tels que le toluène, le cyclohexane, le cyclooctène, l'éthylbenzène et le diphénylméthane. Aucun produit d'oxydation n'a pu être détecté lors de ces catalyses. Le cyclohexène, quant à lui, s'oxyde assez bien, avec un rendement de 65 % *vs* NADH (6,5 TON). Par ailleurs, les contrôles sans le polymère, ou avec la FMN seule, permettent un rendement à hauteur de 20 % *vs* NADH (2 TON). Enfin, si on remplace la FMN par la riboflavine, pour le complexe de cuivre, cette dernière permet également d'oxyder le cyclohéxène, avec un rendement de 40 % (4 TON), taux plus faible que celui constaté avec la FMN.

IV) Conclusion

Pour conclure ces études catalytiques, nous avons mis en évidence la possibilité de catalyser l'oxydation de divers substrats, notamment le thioanisole, en utilisant les « synzymes », avec comme cofacteur métallique soit des métalloporphyrines mimant l'activité des cytP450, soit des complexes non-héminiques mononucléaire de cuivre mimant la polysaccharide monooxygénase, ou binucléaire de fer mimant la MMO. Les résultats des réactions d'oxydation catalysées par le « synzyme » sont relativement modestes lorsque l'on utilise 10 équivalents de NADH. En effet, les rendements en produit d'oxydation ne dépassent pas 40 % *vs* NADH (4 TON). Il est possible que les faibles rendements observés soient dus à une saturation du polymère en NADH, à une mauvaise réactivité des catalyseurs ou encore à un déficit de protons en solution. À cet égard, il serait intéressant de réaliser des tests en catalyse d'oxydation, en ajoutant de faibles quantités d'acide pour chaque ajout de NADH. Nos études ont en outre permis de montrer que l'activité catalytique était fortement modulée par la quantité et le type du polymère en présence, ce qui laisse espérer que l'activité des cofacteurs métalliques utilisés puisse être encore améliorée par l'élaboration de nouveaux polymères, peut-être une série trifonctionnalisée.

Pour des concentrations élevées de NADH (50 équivalents) une oxydation du thioanisole a pu être observée même en absence des différents complexes métalliques comme catalyseurs, et pour des temps de réaction longs. À de telles concentrations de NADH, cette réaction est catalysée directement par la FMN via la formation d'hydroperoxydes de flavine. Néanmoins, il semble que lorsque les complexes Cu^{II}TPA et Fe^{III}_2(HTPDP) sont présents, le transfert des électrons se fasse

préférentiellement et de manière extrêmement rapide vers le métal et que, dans ce cas les réactions d'oxydation observées soient bien catalysées par ces complexes.

Ces résultats obtenus avec les « synzymes » utilisant les trois types de catalyseurs mentionnés ci-dessus ne sont pas surprenants puisque trois verrous scientifiques majeurs doivent être levés simultanément : (1) La transformation du transfert initial de 2 électrons du NADH vers la FMN en deux tranferts monoélectroniques séquentiels et sélectifs de la FMN vers le centre métallique, (2) l'activation réductrice du dioxygène par ce même centre métallique et (3) l'oxydation sélective d'un substrat par l'entité catalytique formée en milieu aqueux. Néanmoins, ces résultats constituent une preuve de concept et démontrent que l'oxydation d'un substrat par O_2, peut être catalysée à l'aide d'un système artificiel soluble dans l'eau, associant un PEIFg, la FMN et un catalyseur de réactions d'oxydation, qui est capable de reproduire l'activité des différents types de monooxygénase existant dans les systèmes naturels.

Références :

(1) Sacco, H. C.; Iamamoto, Y.; Lindsay Smith, J. R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, 181.
(2) Ren, Q.-Z.; Yao, Y.; Ding, X.-J.; Hou, Z.-S.; Yan, D.-Y. *Chem. Commun.* **2009**, 4732.
(3) Oszajca, M.; Drzewiecka-Matuszek, A.; Franke, A.; Rutkowska-Zbik, D.; Brindell, M.; Witko, M.; Stochel, G.; van Eldik, R. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20* (8), 2328.
(4) Groves, J. T.; Watanabe, Y. **1986**, *108* (3), 508.
(5) Groves, J. T.; Ungashe, S. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (21), 7796.
(6) Tabushi, I.; Kodera, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (15), 4734.
(7) Tabushi, I.; Koga, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101* (21), 6456.

CHAPITRE IX

Chapitre IX : Conclusion générale et perspectives

I) CONCLUSION GENERALE

Dans le but de reproduire l'activité des monooxygénases à fer ou à cuivre, capables d'activer le dioxygène de l'air pour catalyser diverses réactions d'oxydation sélective dans l'eau, nous avons pris le parti de développer des systèmes macromoléculaires incorporant à la fois des cofacteurs redox, pour acheminer les électrons, et des complexes métalliques pour activer le dioxygène.

Pour ce faire, nous avons commencé par synthétiser la matrice polymérique (PEIF), obtenue à partir d'un polymère de polyéthylène-imine (PEI) que l'on a fonctionnalisé avec différentes proportions de groupements guanidinium et octyle. Ceci a permis l'obtention d'une bibliothèque de polymères modifiés (PEIFg) qui ont été caractérisés par RMN ^{1}H en utilisant la séquence WATERGATE.

Par la suite, nous nous sommes attelés à la synthèse des catalyseurs d'oxydation, c'est-à-dire des différents complexes métalliques. Nous avons ainsi obtenu des complexes mononucléaires de fer(III) et de fer(II), dont nous avons tout d'abord pu étudier le comportement comme catalyseurs de réactions d'oxydation de divers substrats par H_2O_2 dans l'eau. Les complexes de fer(III) $[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENG)_2Cl_2]Cl_4$, $Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENméthoxy)_2Cl_2](CHCl_3)_4Cl_2$ et $[Fe^{III}(BPMEN)Cl_2]PF_6$ ont ainsi été cristallisés et caractérisés par diffraction des rayons X. La série de complexes de fer(II) correspondante est un peu plus limitée avec l'obtention de seulement deux complexes, $[Fe^{II}(BPMEN)(CH_3CN)_2](SbF_6)_2$ caractérisé par diffraction des rayons X, et $[Fe^{II}(BPMENG)(CH_3CN)_2](SbF_6)_3$, caractérisé par analyse élémentaire. Ces deux complexes de fer(II) ont été utilisés comme catalyseurs pour la réaction d'époxydation du cyclooctène par H_2O_2 dans MeCN, et ont montré des rendements très similaires pour cette réaction. Par la suite, l'influence de la proportion d'eau dans le milieu réactionnel sur l'activité catalytique de ces complexes a été étudiée et nous avons pu montrer qu'un ajout de 5 % d'eau dans le milieu réactionnel entraînait une diminution d'au moins 80 % de l'activité des deux complexes, une très faible proportion de produit d'oxydation étant formée (13 %). On peut noter à ce niveau que même l'ajout d'un groupement guanidinium dans la structure du ligand du complexe $[Fe^{II}(BPMENG)(CH_3CN)_2](SbF_6)_3$, ne permet pas d'améliorer son activité dans l'eau. De plus, l'ajout de polymère modifié par des groupements carboxylate (PEIFac 0.6/0.6) n'ayant pas permis d'améliorer l'efficacité de ces complexes, nous avons décidé d'utiliser d'autres complexes, disponibles au laboratoire, capables de réaliser de la catalyse de réactions d'oxydation dans l'eau comme certaines métalloporphyrines ou certains complexes binucléaires de fer(III).

En parallèle, deux cofacteurs redox ont été étudiés ; un complexe de ruthénium photoactivable et un cofacteur redox naturel, la flavine mononucléotide (FMN). Les études avec le complexe de ruthénium se sont révélées décevantes, les réactions d'oxydation affichant de très

faibles rendements. Nous nous sommes donc attelés à la construction d'une réductase artificielle en utilisant la FMN comme cofacteur redox.

Nous avons ainsi réalisé l'incorporation, par interactions électrostatiques, du cofacteur FMN dans un PEI modifié, soluble dans l'eau, portant des groupements guanidinium et octyle (PEIFg). Nous avons ainsi pu montrer que l'entité macromoléculaire PEIFg-FMN était capable de collecter efficacement des paires d'électrons du NADH, puis de délivrer rapidement ces électrons de façon séquentielle, un par un, vers des cofacteurs redox tels que des porphyrines de manganèse(III). Ce transfert d'électrons est 4 000 fois plus rapide que celui réalisé par la FMN seule en solution. L'ensemble PEIFg-FMN constitue donc une véritable réductase artificielle présentant une activité comparable à celle des cytochromes P450 réductases, flavoprotéines qui sont capables de d'acheminer les électrons du NADPH vers le fer de l'hème siège de l'activation du dioxygène. Ce résultat très original ouvre de nouvelles perspectives quant à l'élaboration de systèmes d'oxydation catalytique bio-inspirés des monooxygénases à fer et/ou à cuivre.

L'étape suivante a donc été d'étudier l'activité de cette réductase artificielle (PEIFg-FMN) en présence de complexes métalliques, afin d'évaluer son aptitude à réaliser la réduction du centre métallique qui puisse ensuite conduire à l'activation réductrice du dioxygène, nécessaire pour effectuer l'oxydation de différents substrats. En tant que preuve de concept, la réductase artificielle a été associée en solution à une porphyrine de manganèse(III), et exposée au dioxygène de l'air en présence de NADH. Dans ces conditions, le système PEIFg-FMN-Mn(III)-porphyrine s'est avéré capable de catalyser la réaction de sulfoxydation du thioanisole dans l'eau, à température ambiante et en utilisant le dioxygène en tant que seule source d'oxygène, en présence de NADH comme réducteur. Ce résultat extrêmement original constitue le premier exemple d'une hémoprotéine artificielle « hémosynzyme » capable, comme les monooxygénases à cytochromes P450, de catalyser l'oxydation de substrats par O_2 en milieu aqueux, dans des conditions douces de pression et de température.

Ce système a pu également être adapté à l'utilisation d'autres catalyseurs tels qu'un complexe binucléaire de fer(III) $[Fe^{III}_2(HTPDP)(CH_3OH)_3(CH_3O)]$ $(ClO_4)_4$ ou un complexe mononucléaire de cuivre $[Cu^{II}(HGPBP)Cl]ClO_4$. La réductase artificielle PEIFg-FMN rend ainsi possible la réduction du complexe de cuivre ou de fer par NADH, entraînant une activité catalytique de la part de ces complexes pour l'oxydation de substrats par O_2. Au cours de ces études, il s'est avéré que les rendements des réactions catalysées par ces systèmes dépendaient du type de polymère utilisé. En effet, le complexe de cuivre, plus soluble en milieu aqueux, préfère être inséré dans des polymères peu hydrophobes pour fonctionner efficacement, alors que le complexe de fer, peu soluble en milieu aqueux, préfèrera être inséré dans un environnement local plus hydrophobe. Les rendements en sulfoxyde restent modestes avec 40 % de conversion *vs* NADH dans le meilleur des cas, mais il nous semble possible de les améliorer par ajout de protons en solution. En effet, nous avons pu montrer, dans le cas particulier de la réduction de la porphyrine de manganèse, qu'un transfert de protons était impliqué dans l'étape cinétiquement détermitante (KIE = 11). Il est donc possible qu'un déficit de ces protons soit à l'origine de la modeste activité catalytique.

Enfin, la généralisation de l'utilisation de notre système à l'oxydation d'autres substrats a été envisagée. A ce jour, le seul résultat positif a été enregistré pour l'oxydation du cyclohéxène, en présence de porphyrine de manganèse, avec 60 % de conversion.

Ces rendements modestes pour l'oxydation catalytique ne sont pas surprenants puisque trois verrous scientifiques majeurs doivent être levés simultanément, (1) l'apport sélectif d'électrons aux centres métalliques, (2) l'activation réductrice du dioxygène par ces mêmes centres métalliques et (3) la catalyse dans l'eau. Néanmoins, les résultats décrits dans ce manuscrit démontrent clairement la possibilité de réaliser des systèmes artificiels ou « synzymes » solubles dans l'eau, associant une réductase artificielle PFEIg-FMN et un complexe métallique, capables de catalyser l'oxydation de substrats par O_2 dans l'eau, et donc l'activité catalytique des monooxygénases à fer ou à cuivre.

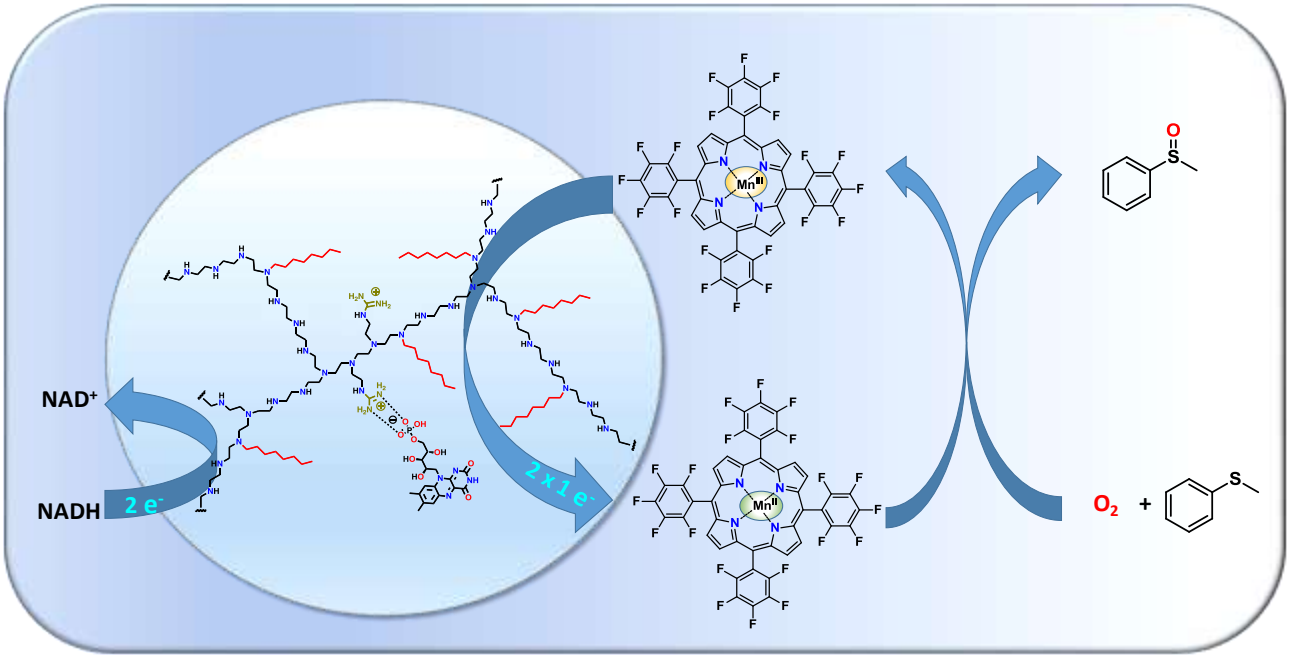


Schéma CCl.1 : Illustration de l'enzyme artificielle synthétisée « hémosynzyme ».

II) PERSPECTIVES

Les résultats obtenus au cours de ces recherches ouvrent de nombreuses perspectives, tant sur le plan fondamental que sur d'éventuelles applications en catalyse.

Concernant le développement des enzymes artificielles, chaque étape de leur construction nécessitera une optimisation. Dans un premier temps, une exploration plus profonde des conditions de modification des polymères devrait nous permettre d'obtenir un panel plus large de macromolécules qui pourront avoir un impact plus important sur les cinétiques de réduction de la FMN et des cofacteurs redox tels que les métalloporphyrines. Evidemment, l'incorporation de

catalyseurs d'oxydation plus performants pour l'activation du dioxygène en phase aqueuse sera un pas important vers le développement de catalyseurs d'oxydation plus respectueux de l'environnement. Cependant, au vu de la littérature, aucun candidat capable de fonctionner dans des conditions douces ne semble vraiment s'imposer pour jouer ce rôle. L'incorporation d'un tel catalyseur dans notre système est pourtant cruciale car elle permettrait probablement de catalyser des réactions d'oxydation plus difficiles que la seule sulfoxidation que nous avons observée jusqu'à ce jour. Dans cette optique, les complexes binucléaires de fer pourraient s'avérer des candidats intéressants, mais nous devons continuer à travailler sur leur structure de façon a exacerber leur réactivité vis à vis du dioxygène dans l'eau. Enfin, le développement de polymères incorporant des substituants chiraux pourrait aussi nous permettre d'accéder à la catalyse d'oxydation énantio-sélective, qui serait une valeur ajoutée importante pour notre système.

A plus long terme, le système que nous avons construit pour reproduire l'activité des réductases naturelles comme la cytochrome P450 réductase, pourrait en lui-même constituer un catalyseur avec des activités plus variées. En effet, un système capable de générer un flux mono-électronique en solution aqueuse pourrait permettre, en présence de certaines molécules présentant un potentiel redox adapté, de générer des radicaux propices au développement d'une chimie radicalaire intéressante pour la synthèse organique. Par ailleurs, comme nous l'avons montré dans le chapitre VIII, la FMN réduite peut également activer le dioxygène et catalyser certaines réactions d'oxydation comme le font les flavine-monooxygénases. Dans ces enzymes, l'environnement présent autour du cofacteur flavinique joue un rôle crucial en stabilisant des intermédiaires de type flavine-OO^- ou flavine-OOH, qui peuvent être impliqués dans des réactions aussi diverses que l'époxydation sélective d'alcènes ou la réaction de Baeyer-Villiger. En plus de permettre la réduction de la flavine, comme nous l'avons démontré précédemment, le microenvironnement local généré par le polymère pourrait ainsi s'avérer crucial pour orienter la sélectivité d'enzymes artificielles présentant une activité de type flavine-monooxygénase.

PARTIE EXPERIMENTALE

Partie expérimentale

I) Matériels et Méthodes

La FMN, la riboflavine, le NADH et le PEI ont été achetés auprès de fournisseurs commerciaux et utilisés sans autre purification. Les produits de départ vendus sous forme de sels hydrochlorés, sont déhydrochlorés au préalable.

I-A) Spectroscopie d'absorption électronique UV/visible

Les expériences de spectroscopie d'absorption UV/visible ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre Varian Cary 300 Bio, équipé d'un thermostat Varian Cary Temperature Controller, et de cuves en quartz de 10 x 10 mm² x 20 mm équipées d'un septum pour les expériences réalisées sous atmosphère inerte. Le logiciel Cary WinUv a été utilisé pour la réalisation des spectres. La vitesse de balayage utilisée pour la réalisation des spectres est de 3000 $nm.min^{-1}$.

I-B) Spectrométrie de masse

Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Brucker 2009 à analyseur tandem (quadripôle couplé à un temps de vol) équipé d'une source d'ionisation électrospray. Les concentrations des solutions injectées varient entre 10^{-4} et 10^{-3} $mol.L^{-1}$.

I-C) Diffraction des rayons X

Les analyses par diffraction des rayons X ont été réalisées à l'aide d'un diffractomètre Kappa X8APPEX II Bruker à radiation graphite-monochromatique MoKα (λ = 0,71073 Å). Les cristaux ont été montés sur un CryoLoop (Hampton Research) avec de la Paratone-N (Hampton Research) en tant que cryoprotecteur, puis gelés à l'aide d'un flux d'azote à 100 K. La température des cristaux a été maintenue à 100 K à l'aide d'un cryostat Cryostream 700 series, avec une précision de ± 1 K. Les données ont été corrigées des effets d'absorption et de polarisation de Lorentz. Les structures ont été résolues par méthodes directes à l'aide du logiciel SHELXS-97 et affinées par technique des moindres carrés. Tous les calculs effectués ont été réalisés à l'aide du pack logiciel WINGX.

I-D) Spectroscopie de résonnance magnétique nucléaire (RMN)

I-D-1) RMN ^{1}H et ^{13}C des ligands

Les analyses par résonnance magnétique nucléaire des ligands synthétisés ont été effectuées à l'aide de spectromètres Bruker AC250 (250 MHz) et AC360 (360 MHz). Les échantillons ont été dissous dans du chloroforme, du méthanol ou de l'eau deutéré(e) ($CDCl_3$, CD_3OD ou D_2O). Les déplacements chimiques sont donnés en partie par million (ppm) par rapport au TMS.

I-D-2) RMN ^{1}H des polymères

Les analyses par résonance magnétique nucléaire des polymères modifiés synthétisés ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre Bruker sur une console ADVANCE 3 B0 9,4T (400MHz) munie d'une sonde QXO et d'un régulateur de température BVT 3000. Les échantillons sont analysés directement dans l'eau grâce aux méthodes dites de DOSY et de Watergate, présentes dans le logiciel Bruker, et optimalisées pour nos conditions expérimentales à 300 K. Les déplacements chimiques sont donnés en partie par million (ppm) par rapport a l'étalon interne.

I-E) Spectroscopie électronique de fluorescence

Toutes les expériences de fluorescence sont réalisées sur un appareil Tecan infinite M200 pro plate-reader, en utilisant des plaques 96 puits à fond noir de la marque thermofisher.

I-F) Chromatographie en phase gazeuse (GC)

Toutes les expériences de GC sont réalisées sur un appareil SHIMADZU GC-2014A avec une colonne Zebron ZB Semi Volatiles (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

I-G) Electrochimie

Les expériences de voltamétrie à signaux carrés sont réalisées sur un appareil AUTOLAB 72159 PGSTAT12. Les mesures ont été réalisées avec une électrode de carbone, l'électrode de référence (Ag / AgCl) et la contre-électrode (Pt), dans les conditions suivantes : sauts de potentiel de -0.005V ; 0.020V d'amplitude et une fréquence de 25 Hz.

I-H) Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE)

Les expériences de RPE sont réalisées sur un spectromètre Bruker Elexsys E 500 avec un cryostat à flux d'hélium liquide Oxford ESR 9 muni d'un thermocouple or-chrome positionné directement sous l'échantillon. Les expériences sont faites à 100 K, avec une fréquence de 9,374

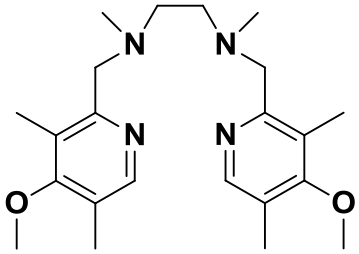
GHz, une puissance de 0,78 mW et une modulation de l'amplitude de 6 gauss. Les mesures sont répétées 4 fois.

I-I) Irradiation

Les expériences de photoréduction et de photocatalyse sont réalisées en utilisant un matériel T-Cube LED Driver avec une LED D1B de chez THORLABS, la LED possédant une longueur d'onde de 450 nm.

II) Synthèse des ligands

II-A) Synthèse du ligand N,N'-diméthyl-N,N'-bis(2-(3,5-diméthyl-4-méthoxy-pyridylméthyl)éthane-1,2-diamine (BPMENméthoxy ou 1)



BPMENméthoxy

Mode opératoire :

Le chlorhydrate de 2-(chlorométhyl)-4-méthoxy-3,5-diméthylpyridine (254 mg, 1,16 mmol) est dans un premier temps déchlorhydraté par dissolution dans une solution aqueuse saturée en carbonate de sodium (10 mL) puis la 2-(chlorométhyl)-4-méthoxy-3,5-diméthylpyridine obtenue est extraite au dichlorométhane (3 x 20mL). La solution de dichlorométhane est évaporée à sec et le produit est isolé sous la forme d'une huile rose (216 mg, 1,16 mmol).

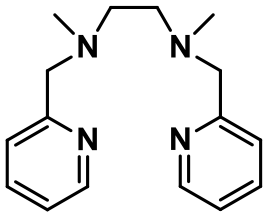
Dans un deuxième temps, à une solution de N,N'-(diméthyl)éthylènediamine (50 µL, 0.58 mmol) dans du DCM (10 mL) sont additionnés 2 équivalents de 2-(chlorométhyl)-4-méthoxy-3,5-diméthylpyridine (216 mg dans 1mL dans DCM ; 1,16 mmol) et 8 équivalents de Et_3N (650 µL, 8,02 mmol). La solution rose est laissée à réagir sous agitation à température ambiante. Après 24 heues, la solution jaune résultante est lavée avec H_2O (10 mL), séchée et évaporée sous pression réduite. Le composé final **BPMENméthoxy** (ou **1)** est obtenu sous la forme d'une huile jaune (191 mg, 0.45 mmol) avec un rendement de 80 %.

CCM (silice): Rf = 0, 20 (CH_2Cl_2/MeOH (10 %)/NH_4OH (2 %))

RMN ^{1}H : (300 MHz, *$CDCl_3$*) : δ (en ppm) 8,13 (s, 2H) ; 3,70 (s, 6H (OMe)) ; 3,55 (s,4H) ; 2,57 (s, 4H) ; 2,25 (s, 6H) ; 2,19 (s, 6H) ; 2,15 (s, 6H).

ESI-MS HR : m/z calc : 387,2715 (100, $[M+H]^+$) m/z mes : 387,2766 (100, $[M+H]^+$)

II-B) Synthèse du ligand *N,N'*-diméthyl-*N,N'*-bis(2-pyridylméthyl)-éthane-1,2-diamine (BPMEN ou 2)



BPMEN

Mode opératoire :

Le chlorhydrate de (2-chlorométhyl)pyridine (376 mg, 2,5 mmol) est tout d'abord déchlorhydraté par dissolution dans une solution aqueuse saturée en carbonate de sodium (10 mL) puis la (2-chlorométhyl)pyridine obtenue est extraite au dichlorométhane (3 x 20mL). La solution de dichlorométhane est évaporée à sec et le produit est isolé sous la forme d'une huile rose (320 mg, 2,5 mmol).

A une solution de N,N'-(diméthyl)éthylènediamine (136 µL, 1,25mmol) dans du DCM (10 mL), sont additionnés 2 équivalents de 2-(chlorométhyl)pyridine (320 mg dans 1mL de DCM, 2,5mmol) et 8 équivalents de Et_3N (1,42 mL). La solution rose est laissée réagir sous agitation à température ambiante. Après 24 heures, la solution jaune résultante est lavée avec H_2O, séchée et évaporée sous pression réduite. Le ligand **BPMEN** (ou **2**) est obtenu sous la forme d'une huile jaune (270 mg, 1 mmol) avec un rendement de 80 %.

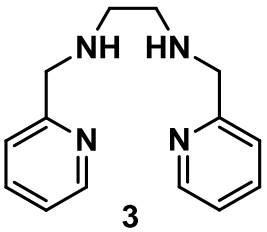
CCM (silice): Rf = 0,20 (CH_2Cl_2/MeOH (10 %)/NH_4OH (2 %))

RMN ^{1}H : (300 MHz, *$CDCl_3$*) : δ 8,53 (d, 2H, 4Hz); 7,61 (t, 2H, 7,8 Hz (x 2)); 7,41 (d, 2H, 7,8 Hz); 7,13 (t, 2H, 4,8 et 7,8 Hz); 3,68(s, 4H); 2,65 (s, 4H); 2,28 (s, 6H).

ESI-MS HR : m/z calc : 271,1878 (100, $[M+H]^+$) m/z mes : 271,1911 (100, $[M+H]^+$)

II-C) Synthèse du ligand *N*,*N*′-diméthyl-*N*,*N*′-bis(2-pyridylméthyl)-N-(3-guanidino(amino)propane)éthane-1,2-diamine (BPMENG)

II-C-1) Etape 1 : synthèse du composé **3**



3

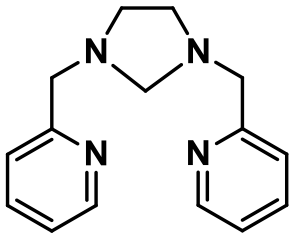
Mode opératoire :

À une solution de 2-pyridinecarboxaldéhyde (1,584 mL, 16,6 mmol) dans du méthanol (15mL) est additionnée goutte à goutte à 0°C de l'éthylènediamine pur (561 µL, 8,3 mmol). Au bout de 16 heures de réaction à température ambiante, du borohydrure de sodium ($NaBH_4$) (694 mg, 18,3 mmol) est additionné lentement à 0°C. Ensuite la solution est laissée à réagir 5 heures sous agitation après retour à température ambiante, puis encore une heure à reflux. Après évaporation sous pression réduite, l'huile obtenue est solubilisée à nouveau dans une solution aqueuse saturée en $NaHCO_3$ (30mL). Le produit est récupéré grâce à une extraction dans le dichlorométhane (3 x 30 mL), séché sur sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) puis évaporé de nouveau. Le composé **3** est obtenu sous la forme d'une huile jaunâtre (1,980 g, 8,25 mmol) avec un rendement de 99 %.

CCM (silice) : Rf = 0,30 (CH_2Cl_2/MeOH (5 %)/Et_3N (1 %))

RMN ^{1}H : (360 MHz, *$CDCl_3$*) : δ 8,55 (d, 2H, *j* = 4,3Hz) ; 7,63 (t, 2H, *j* = 4,3 Hz et 7,5 Hz) ; 7,33 (d, 2H, *j* = 7,5Hz) ; 7,15 (t, 2H, *j* = 7,5Hz (x 2)) ; 3,94 (s, 4H) ; 2,86 (s, 4H).

II-C-2) Etape 2 : synthèse du composé **4**



4

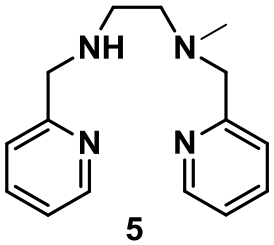
Mode opératoire :

À une solution du composé **3** (1,980 g, 8,25 mmol) dans de l'éther (20mL), une spatule de Na_2SO_4 puis un équivalent de formaldéhyde pur 40 % p/v sont ajoutés. Le mélange réactionnel est porté à reflux. Après 16 heures sous agitation, la phase organique est lavée avec de l'eau (20 mL) puis séchée sur Na_2SO_4 et enfin évaporée sous pression réduite. Le composé **4** est obtenu sous la forme d'une huile jaune clair (1,770 g, 7 mmol) avec un rendement de 85 %.

CCM (silice) : Rf = 0,38 (CH_2Cl_2/MeOH (Et_3N (1 %) 95/5)

RMN ^{1}H : (300 MHz, *$CDCl_3$*) : δ 8,55 (d, 2H, *j* = 5,4 Hz) ; 7,61 (t, 2H, *j* = 9Hz (x 2)) ; 7,43 (d, 2H, *j* = 9Hz) ; 7,12 (t, 2H, *j* = 5,4 Hz et 9 Hz) ; 3,88 (s, 4H) ; 3,58 (s, 2H) ; 2,93 (s, 4H).

II-C-3) Etape 3 : synthèse du composé **5**



5

Mode opératoire :

À une solution du composé **4** (1,780 g, 7mmol) dans le méthanol anhydre (40 mL) sont additionnés successivement à 0°C, un équivalent de cyanoborohydrure de sodium ($NaBH_3CN$) (441 mg) par petites portions et deux équivalents d'acide trifluoroacétique (TFA) (1,07mL) goutte à

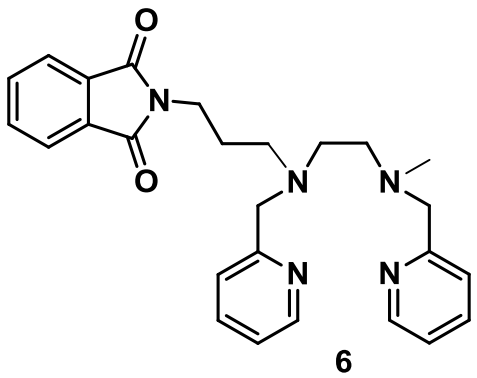
goutte. Au bout de 24 heures de réaction à température ambiante sous agitation, la réaction est jugulée par l'ajout de 30 mL d'une solution de soude à 15 %, et laissée à réagir pendant 6 heures. La phase aqueuse est ensuite extraite au DCM (2 x 40 mL), séchée sur Na_2SO_4 puis évaporée sous pression réduite. Le composé **5** est obtenu sous la forme d'une huile jaune (1,690g, 6,5mmol) avec un rendement de 93 %.

CCM (alumine) : Rf = 0,85 (CH_2Cl_2/MeOH (5 %)/Et_3N (1 %))

RMN ^{1}H : (360 MHz, *$CDCl_3$*) : δ 8,52 (2H, m) ; 7,61 (m, 2H) ; 7,45 (d, 1H, *j* = 7,9 Hz) ; 7,31 (d, 1H, *j* = 7,5 Hz) ; 7,13 (t, 2H, *j* = 6Hz (x 2) ; 3,92 (s, 2H) ; 3,67 (s, 2H) ; 2,78 (t, 2H, *j* = 5,6 et 6 Hz) ; 2,64 (t, 2H, *j* = 5,6 et 6 Hz) ; 2,26 (s 3H).

ESI-MS HR : m/z calc : 257,1722 (100, $[M+H]^+$) m/z mes : 257,1747 (100, $[M+H]^+$)

II-C-4) Etape 4 : synthèse du composé **6**



6

Mode opératoire :

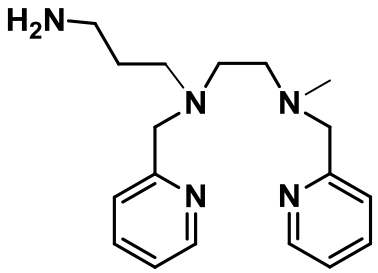
À une solution du produit commercial N-(3-bromopropyl)phtalimide (1,670 g, 6,5mmol) dans de l'acétonitrile (30 mL) sont additionnés successivement deux équivalents de triéthylamine (Et_3N) (1,85 mL) et un équivalent du composé **5** (1,69g). Après 24 heures à reflux, la solution est évaporée puis reprise dans un minimum d'eau. La phase aqueuse est ensuite extraite au dichlorométhane (4 x 30 mL), séchée sur Na_2SO_4 et enfin évaporée sous pression réduite. Une purification sur colonne d'alumine ((MeOH/Et_3N(2%)/CH_3Cl) 30/70) permet d'obtenir le composé **6** sous la forme d'une huile jaune (1,450 g, 3,17 mmol) avec un rendement de 50 %.

CCM (alumine) : Rf = 0.3 (CH_3Cl/(MeOH/Et_3N(2%)) 30/70)

RMN ^{1}H : (360 MHz, *$CDCl_3$*) : δ 8,52 (d, 1H, *j* = 4 Hz) ; 8,48 (d, 1H, *j* = 4 Hz) ; 7,82 (dd, 2H, *j* = 3 Hz (x2)) ; 7,70 (dd, 2H, *j* = 3 Hz (x 2)) ; 7,60 (m, 2H) ; 7,46 (d, 2H, *j* = 7 Hz) ; 7 ,13 (m, 2H) ; 3,78 (s, 4H) ; 3,68 (t, 4H, *j* = 7 Hz (x 2)) ; 2,63 (s, 3H) ; 2,25 (m, 4H) ; 1,84 (qt, 2H, *j* = 7Hz (x 4)).

ESI-MS HR : m/z calc : 444,2355 (100, $[M+H]^+$) m/z mes : 444,2373 (100, $[M+H]^+$)

II-C-5) Etape 5 : synthèse du composé **7**



7

Mode opératoire :

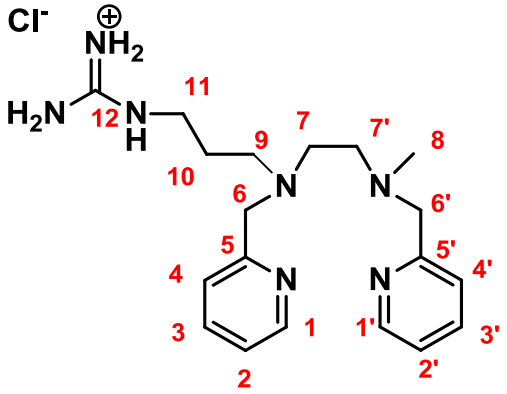
À une solution du composé **6** (1,450 g, 3,17 mmol) dans de l'éthanol absolu (30 mL) est additionné un équivalent d'hydrazine monohydraté pur (154 µL, 3,17 mmol). Après 3 heures de réaction à reflux, 5mL d'une solution d'acide chlorhydrique à 4M sont ajoutés puis la solution est à nouveau portée à reflux pendant 30 minutes. La solution est ensuite évaporée sous pression réduite. L'huile ainsi récupérée est solubilisée dans une solution aqueuse saturée en carbonate de sodium (Na_2CO_3) jusqu'à obtenir un pH de 10 (environ 30 mL) puis extraite avec du chloroforme (3 x 30 mL), séchée et enfin évaporée à nouveau sous pression réduite. Le composé **7** est obtenu après purification sur une colonne de gel d'alumine ($MeOH/Et_3N(2\%)/CH_3Cl$) 40/60) sous la forme d'une huile jaune (746 mg, 2,38 mmol) avec un rendement de 75 %.

CCM (alumine) : Rf = 0,4 ($MeOH/Et_3N(2\%)/CH_3Cl$) 40/60)

RMN ^{1}H : (300 MHz, *$CDCl_3$*) : δ 8,53 (t, 2H, *j* = 4,8 Hz (x 2)) ; 7,60 (t, 2H, *j* = 4,8 et 8,1 Hz) ; 7,43 (d, 1H, *j* = 8,1 Hz) ; 7,36 (d, 1H, *j* = 8,1 Hz) ; 7,12 (q, 2H, *j* = 4,8 Hz (x 3)) ; 3,75 (s, 2 H) ; 3,65 (s, 2H) ; 2,70 (t, 4H, *j* = 5,6 Hz et 6,9 Hz) ; 2,54 (t, 4H, *j* = 6,9Hz (x 2)) ; 2,25 (s, 3H) ; 1,59 (qt, 2H, *j* = 5,6 Hz (x 2) et 6,9 Hz (x 2)).

ESI-MS HR : m/z calc : 314,2300 (100, $[M+H]^+$) m/z mes : 314,2318 (100, $[M+H]^+$)

II-C-6) Etape 7 : Synthèse du produit final **BPMENG**



BPMENG

Mode opératoire :

À une solution du composé **7** (746 mg, 2,38 mmol) dans le DMF (30 mL) sont additionnés successivement deux équivalents de Et_3N (672 µL) et un équivalent de 1*H*-Pyrazole-1-carboxamidine hydrochlorée (349 mg dans 1 mL de DMF). Après 6 heures de réaction à température ambiante, la solution jaune est concentrée sous pression réduite puis purifiée sur une colonne de gel d'alumine (MeOH/$CHCl_3$ (20/80), puis 100 % MeOH). Le composé final **BPMENG** est obtenu sous la forme d'une huile jaune (588 mg, 1,6 mmol) avec un rendement de 70 %.

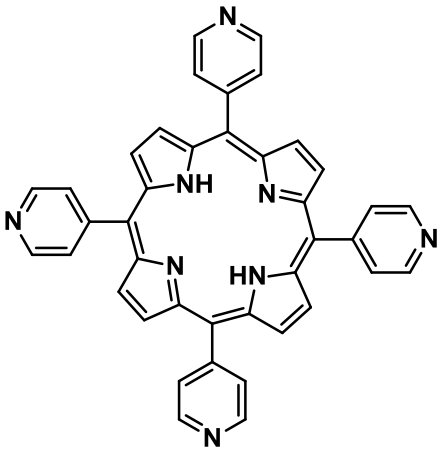
CCM (alumine) : Rf = 0.2 MeOH/$CHCl_3$ (20/80)

RMN ^{1}H : (300 MHz, *$CDCl_3$*) : δ 8,49 (t, 2H, *j* = 5.1 Hz) ; 7,77 (d, 2H, *j* = 5,1 Hz) ; 7,43 (t, 2H, *j* = 8,1 Hz) ; 7,33 (d, 2H, *j* = 8,1 Hz et) ; 3,70 (s, 4 H) ; 3,22 (t, 2H, 5,6 Hz); 2,70 (m, 6H) ; 2,54 (t, 2H, *j* = 6,9Hz (x 2)) ; 2,28 (s, 3H) ; 1,75 (qt, 2H, *j* = 5,6 Hz (x 2) et 6,9 Hz (x 2)).

RMN ^{13}C : (300 MHz, *$CDCl_3$*) : δ 169,6 (C5'); 168,6 (C12); 168,0 (C5); 159,2 (C5 et C5'); 148,10 (C1 et C1'); 133,5 et 133,3 (C2, C2' et C4, C4') ; 74,3 (C6') ; 71,8 (C6) ; 65 (C11) ; 62,1 (C9) ; 61,2 (C10) ; 53,6 (C7') ; 51,2 (C7) ; 37,6 (C8).

ESI-MS HR : m/z calc : 356,2563 (100, $[M+H]^+$) m/z mes : 356,2544 (100, $[M]^+$)

II-D) Synthèse du ligand porphyrinique TPyP



TPyP

Mode opératoire :

À une solution de pyrrole fraîchement distillée (1,46 mL, 21 mmol) dans de l'acide propionique (60 mL) est additionné un équivalent de 4-pyridinecarboxaldéhyde (2 mL). La solution est portée à reflux pendant 90 minutes, puis oxydée par l'ajout de 1,5 équivalent de 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone (DDQ ; 1,8 g). Après 1 heure, la solution est condensée sous pression réduite et précipitée à froid dans du méthanol pendant 48 heures. Le précipité ainsi obtenu est filtré sous vide et le ligand **TPyP** est obtenu sous la forme d'une poudre violette (220 mg, 0,4mmol) avec un rendement de 7 %.

CCM (silice) : Rf = 0,75 (10 % MeOH/CH_2Cl_2)

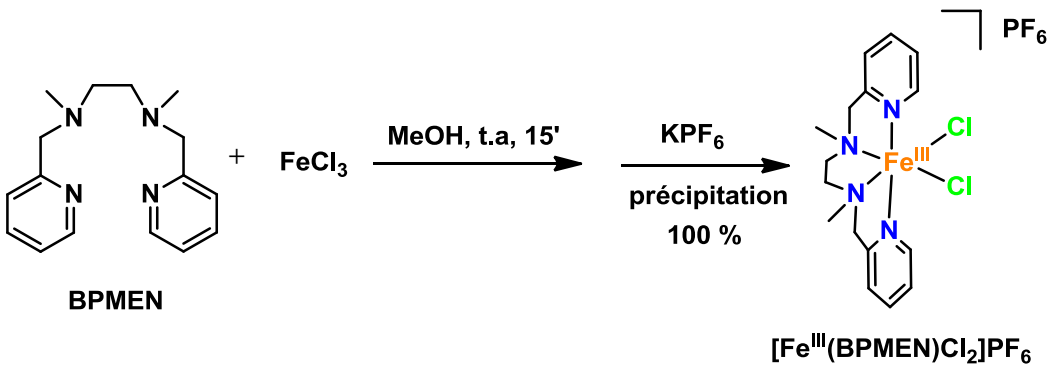
RMN ^{1}H : (360 MHz, 10 % CD_3OD/*$CDCl_3$*) : δ 9,07 (d, 8H, *j* = 4,3 Hz); 8,89 (s, 8H, pyrrole); 8,18 (d, 8H, *j* = 4,3 Hz); -2,89 (s, 2H, NH).

ESI-MS HR : m/z calc : 619,2314 (100, $[M+H]^+$) m/z mes : 619,2338 (100, $[M+H]^+$)

III) Synthèse des complexes

III-A) Synthèse des complexes portant un ligand de type BPMEN

III-A-1) Synthèse du complexe $[Fe^{III}(BPMEN)Cl_2]PF_6$



Mode opératoire :

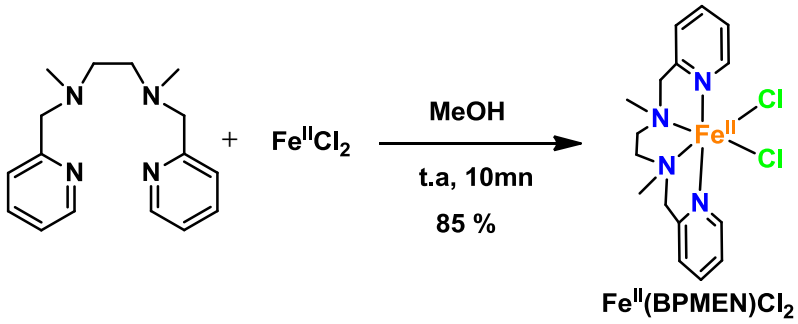
À une solution du ligand **BPMEN** (480 mg, 1,8 mmol) dans le méthanol (10 mL) est additionné goutte à goutte une solution de chlorure de fer(III) (1 équiv., 288 mg) dans le méthanol (1mL). Le mélange est laissé à réagir à température ambiante durant 15 minutes puis est précipité par ajout d'une solution de KPF_6 (3 équiv.) dans le méthanol (1mL). Le composé $[Fe^{III}(BPMEN)Cl_2]PF_6$ est obtenu sous la forme d'une poudre jaune (970 mg) avec un rendement de 100 %. Le composé est ensuite mis à recristalliser dans MeCN par diffusion d'éther avec un rendement de 50 %.

La structure cristallographique du complexe $[Fe^{III}(BPMEN)Cl_2]PF_6$ est décrite dans le chapitre IV, les paramètres associés sont donnés en **Annexe.**

UV-Visible : MeCN (0,5mM) **:** $\lambda = 371$ nm ; $\varepsilon = 2800$ mol.L^{-1}.cm^{-1}

ESI-MS HR : m/z calc : 396,0541 (100, $[M+H]^+$) m/z mes : 396,0579 (100, $[Fe^{III}(BPMEN)Cl_2]^+$)

III-A-2) Synthèse du complexe $Fe^{II}(BPMEN)Cl_2$



Mode opératoire :

La synthèse se fait en boîte à gants (BAG).

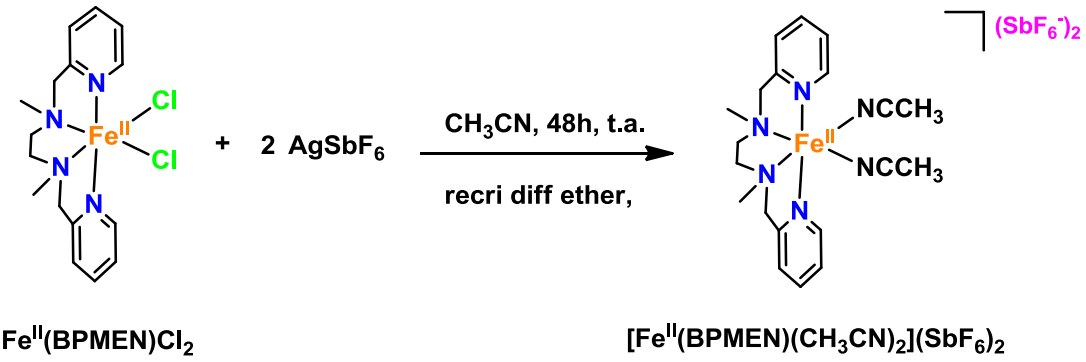
À une solution du ligand **BPMEN** (54 mg, 0,2 mmol) dans le méthanol (1 mL) est additionné goutte à goutte une solution de chlorure de fer(II) (1 équiv., 25mg) dans le méthanol (1mL). Au cours de l'addition, la solution se colore tout d'abord en vert puis lorsque tout le fer(II) a été ajouté, des cristaux jaunes en suspension dans le méthanol apparaissent. Après 10 minutes, les cristaux sont filtrés puis séchés avec de l'éther. Le complexe **$Fe^{II}(BPMEN)Cl_2$** est obtenu sous la forme de cristaux jaunes avec un rendement de 85 %.

Caractérisation par RX : Les paramètres de mailles ont été mesurés et sont semblables à ceux de la littérature (Cambridge Structural Database).

UV-Visible : eau/MeCN 10/90 (0,5mM) : λ = 256 nm, ξ = 3130 $mol.L^{-1}.cm^{-1}$; λ = 373 nm, ξ = 430.5 $mol.L^{-1}.cm^{-1}$

ESI-MS HR : m/z calc : 396,0571 (100, $[M+H]^+$) m/z mes : 396,0573 (100, $[Fe^{II}(BPMEN)Cl_2]^+$)

III-A-3) Synthèse du complexe $[Fe^{II}(BPMEN)(CH_3CN)_2](SbF_6)_2$



$Fe^{II}(BPMEN)Cl_2$ $[Fe^{II}(BPMEN)(CH_3CN)_2](SbF_6)_2$

Mode opératoire : (BAG)

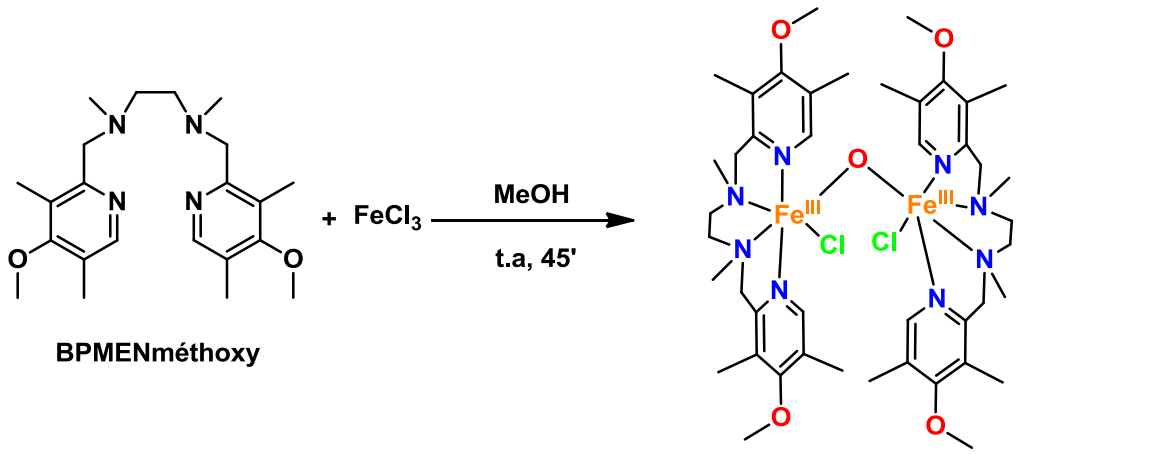
Le complexe **$Fe^{II}(BPMEN)Cl_2$** (60 mg, 0.151 mmol) est mis en suspension dans de l'acétonitrile (2 mL) puis une solution de $AgSbF_6$ (2 équiv., 104 mg) dans MeCN (2 mL) est additionnée goutte à goutte. Au cours de l'addition, le complexe se solubilise petit à petit entraînant un changement de couleur de la solution de jaune claire vers le violet ainsi que la précipitation d'un sel d'AgCl. La solution est laissée à réagir à température ambiante. Après 48 heures, la solution est filtrée sur célite, puis passée sur un filtre à seringue de 0.2 µm de diamètre, laissée à évaporer puis filtrée de nouveau sur un filtre à seringue. La solution est ensuite mise à recristalliser par diffusion d'éther dans MeCN. Le complexe **$[Fe^{II}(BPMEN)(CH_3CN)_2](SbF_6)_2$** est obtenue sous forme de cristaux violets avec un rendement de 30 %.

La structure cristallographique du complexe $[Fe^{II}(BPMEN)(CH_3CN)_2](SbF_6)_2$ ainsi que les paramètres associés sont donnés en **Annexe**.

UV-Visible : eau/MeCN 10/90 (0,5mM) : λ = 372 nm ξ = 3331 $mol.L^{-1}.cm^{-1}$

ESI-MS HR : m/z calc : 361,0882 (100, $[M+H]^+$) m/z mes : 361,0866 (100, $[Fe^{II}(BPMEN)Cl]^+$)

III-A-4) Synthèse du complexe $[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENméthoxy)_2Cl_2](CHCl_3)_4Cl_2$



Mode opératoire :

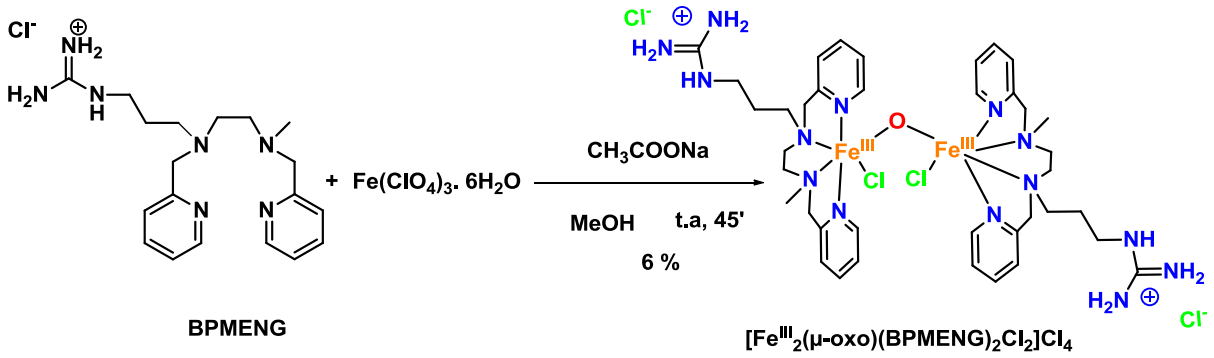
À une solution du ligand **BPMENméthoxy** (70 mg, 0,18 mmol) dans le méthanol (10 mL) est additionnée une solution de chlorure de fer(III) (1 équiv., 29 mg) dans le méthanol (1mL). Le mélange est laissé à réagir à température ambiante. Après 45 minutes, la solution est évaporée sous pression réduite, reprise dans le chloroforme et recristallisée par diffusion dans le pentane. Le complexe **$[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENméthoxy)_2Cl_2](CHCl_3)_4Cl_2$** est obtenu sous la forme de cristaux marron (85 mg) avec un rendement de 46 %.

La structure cristallographique du complexe $[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENméthoxy)_2Cl_2](CHCl_3)_4Cl_2$ est décrite dans le chapitre IV, les paramètres associés sont donnés en **Annexe**.

UV-Visible : MeCN (0.1mM) : λ = 371 nm, ξ = 7254 $mol.L^{-1}.cm^{-1}$

ESI-MS HR : m/z calc : 485,1705 (100, $[M+H]^+$) m/z mes : 485,1693 (100, $[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENméthoxy\text{-}H)_2Cl_2]^{2+}$

III-A-5) Synthèse du complexe $[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENG)_2Cl_2]Cl_4$



Mode opératoire :

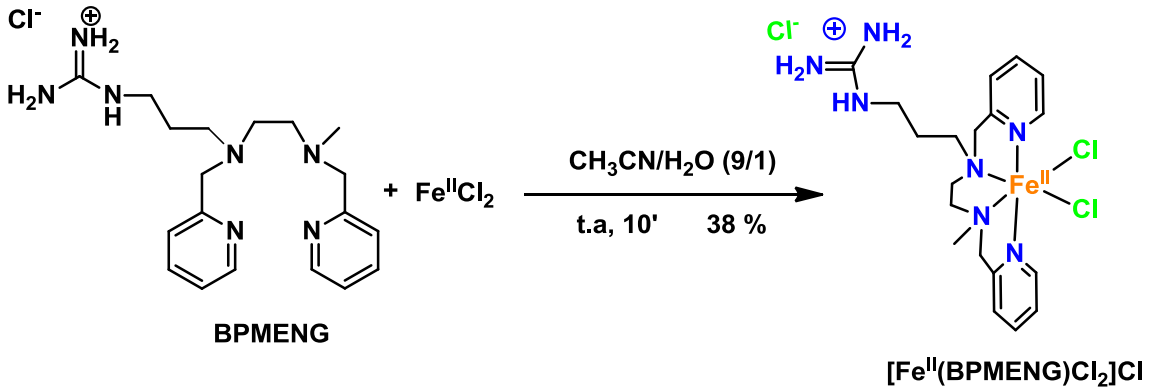
À une solution du ligand **BPMENG** (35 mg, 0,1 mmol) dans le méthanol (6 mL) sont additionnés une solution de perchlorate de fer (1éq, 45 mg) dans le méthanol (1 mL) et de l'acétate de sodium (0,5 éq, 7 mg). Le mélange est laissé à réagir à température ambiante. Après 45 minutes, la solution est condensée sous pression réduite, reprise dans de l'acétonitrile et recristallisée par diffusion d'éther. Le complexe **$[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENG)_2Cl_2]Cl_4$** est obtenu sous la forme de cristaux rougeâtres (6 mg) avec un rendement de 6 %.

La structure cristallographique du complexe $[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENG)_2Cl_2]Cl_4$ est décrite dans le chapitre IV, les paramètres associés sont donnés en **Annexe**.

UV-Visible : H_2O (0,1 mM) : λ = 256 nm, ξ = 23000 $mol.L^{-1}.cm^{-1}$; λ = 326 nm, ξ = 8536 $mol.L^{-1}.cm^{-1}$; λ = 362, ξ = 7048 $mol.L^{-1}.cm^{-1}$

ESI-MS HR : m/z calc : 356,2524 (100, $[BPMENG]^+$) ; 205,5900 $[ligand\text{-}H^+ + fer(II)]^{2+}$ / m/z mes : 356,2544 (100, $[BPMENG]^+$) ; 205,5906 $[ligand\text{-}H^+ + fer(II)]^{2+}$

II-A-6) Synthèse du complexe $[Fe^{II}BPMENGCl_2]Cl$



Mode opératoire : BAG

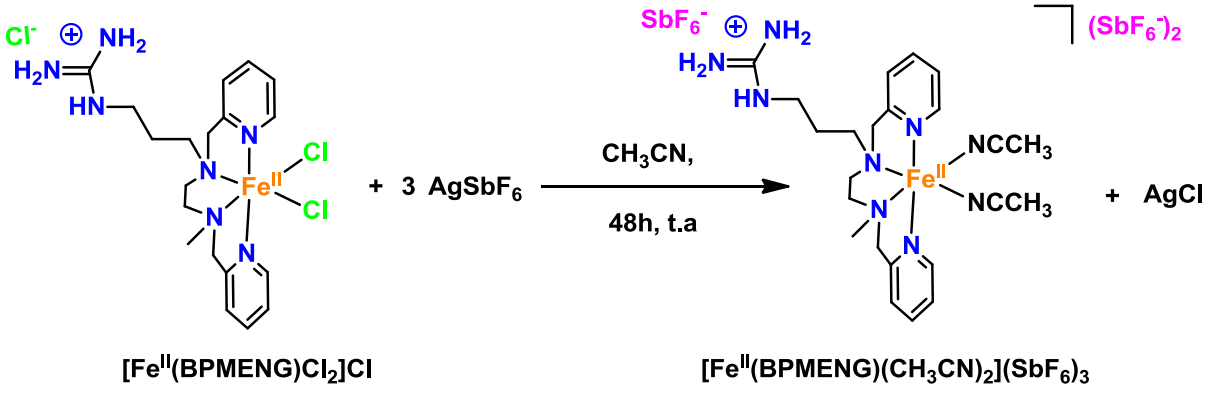
À une solution du ligand **BPMENG** (510 mg, 1.43 mmol) dans le méthanol (3 mL) est additionné goutte à goutte une solution de chlorure de fer(II) (1 équiv., 25 mg) dans un mélange eau/MeCN (9 :1 ; 1 mL). Au cours de l'addition, la solution se colore en jaune puis un précipité jaune apparaît. Le précipité est filtré puis séché à l'éther. Le complexe **[Fe^{II}(BPMENG)Cl$_2$]Cl** est obtenu sous la forme d'une poudre jaune avec un rendement quantitatif. Ce composé a été recristallisé par diffusion d'éther dans MeCN avec un rendement de 38 %.

La structure cristallographique du complexe [Fe^{II}(BPMENG)Cl$_2$]Cl est décrite dans le chapitre IV, les paramètres associés sont donnés en **Annexe**.

UV-Visible : eau/MeCN 10/90 (0,5mM) : λ = 256 nm ξ = 600 mol.L^{-1}.cm^{-1} ; λ = 385 nm ξ = 80 mol.L^{-1}.cm^{-1}

ESI-MS HR : m/z calc : 205,5856 (100, [ligand(-H$^+$) + fer(II)]$^{2+}$; 410,1712 (15, [ligand(-2H$^+$) + fer(II)]$^+$)
m/z mes : 205,5917 (100, [ligand(-H$^+$) + fer(II)]$^{2+}$; 410,1740 (15, [ligand(-2H$^+$) + fer(II)]$^+$)

III-A-7) Synthèse du complexe [Fe^{II}(BPMENG)(CH$_3$CN)$_2$](SbF$_6$)$_3$



[Fe^{II}(BPMENG)Cl$_2$]Cl [Fe^{II}(BPMENG)(CH$_3$CN)$_2$](SbF$_6$)$_3$

Mode opératoire : BAG

Le complexe **[Fe^{II}(BPMENG)Cl$_2$]Cl** (629 mg, 1.31 mmol) est mis en suspension dans de l'acétonitrile(2.5 mL) puis une solution de AgSbF$_6$ (3 équiv., 1.49g) dans de l'acétonitrile (2.5 mL) est additionnée goutte à goutte. Au cours de l'addition, le complexe se solubilise petit à petit, colorant la solution de jaune claire à jaune-orangé et un sel d'AgCl précipite. La solution est laissée réagir à température ambiante. Après 48 heures, la solution marron résultante est filtrée sur célite, puis passée sur un filtre à seringue de 0.2 µm de diamètre. Ensuite le produit est laissé à évaporer dans la BAG et resolubilisé dans un minimum de MeCN, puis filtré à nouveau sur un filtre à seringue.

La solution est précipitée par diffusion d'éther et le complexe **$[Fe^{II}(BPMENG)(CH_3CN)_2](SbF_6)_3$** est obtenu sous la forme d'une poudre marron avec un rendement de 20 %.

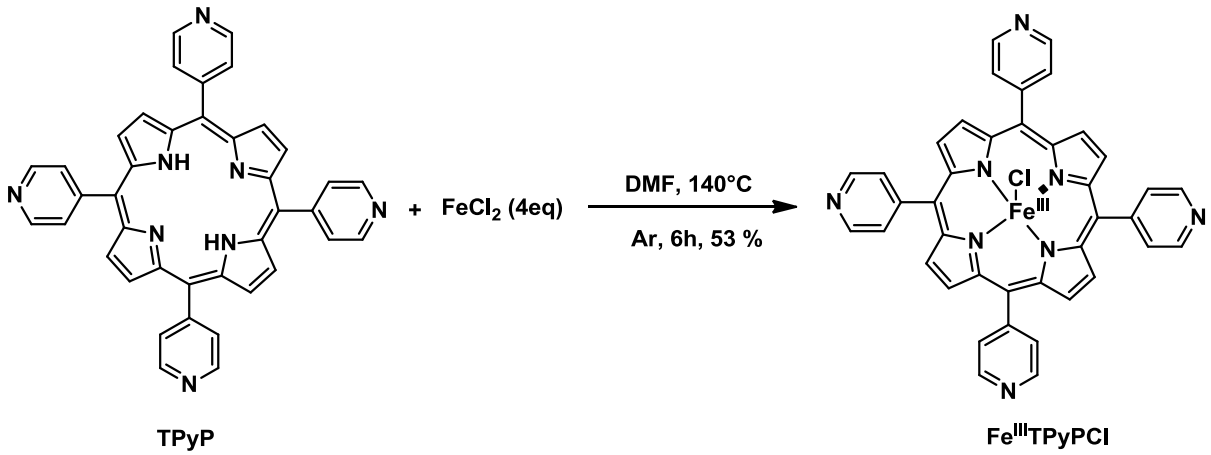
Analyse élémentaire : analyse 24,01 C %, 3,37 H %, 8,6 N %, calculé 24,05 C %, 3,31 H %, 8,97 N %.

UV-Visible : eau (1 mM) : λ = 569 nm ξ = 136 $mol.L^{-1}.cm^{-1}$

ESI-MS HR: m/z calc : 205,5856 (100, $[[ligand(-H^+) + fer(II)]^{2+}$); 883,9801 (25, $[ligand + fer(II) + SbF_6)_2]^+$)
m/z mes : 205,5910 (100, $[[ligand(-H^+) + fer(II)]^{2+}$); 883,9780 (25, $[ligand + fer(II) + SbF_6)_2]^+$)

III-B) Complexes de type porphyrine

III-B-1) Synthèse du complexe Fe^{III}TPyPCl

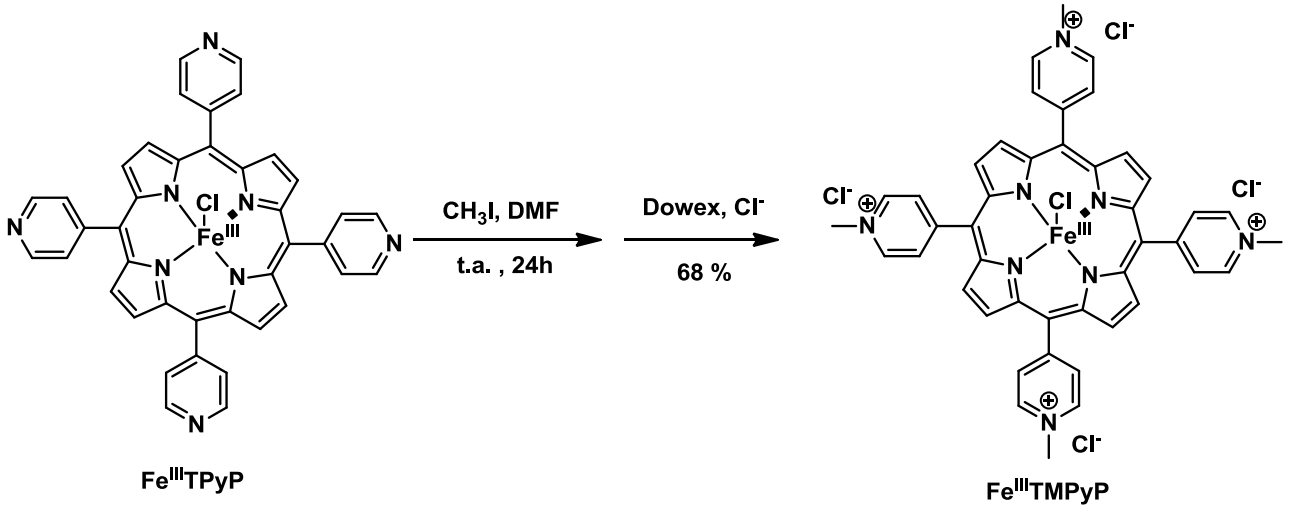


Mode opératoire :

À une solution du ligand **TPyP** (50,7 mg ; 0,097 mmol) dans le DMF (25 mL) dégazée pendant 30 minutes est additionnée une solution de $FeCl_2$ (25 équiv., 63 mg) dans le DMF (5 mL). La solution violette est portée à reflux. Après 6 heures, la solution marron résultante est évaporée à sec sous pression réduite, puis lavée avec une solution de HCL (1M) (4 x 10 mL). Le complexe **Fe^{III}TPyPCl** est récupéré sous la forme d'une poudre marron-verte (35 mg) avec un rendement de 53 %.

ESI-MS HR : m/z calc : 672,1162 (100, $[M+H]^+$) m/z mes : 672,1446 : (100, $[fer(II) + ligand-H]^+$)

III-B-2) Synthèse du complexe $Fe^{III}TMPyP$



Mode opératoire :

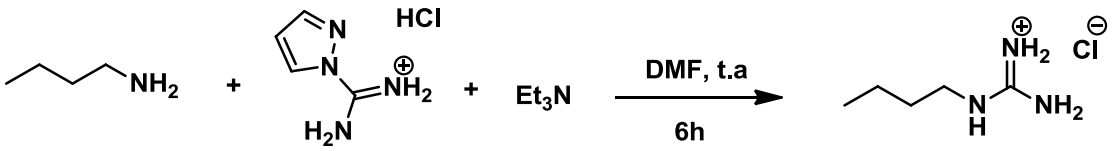
À une solution du complexe **$Fe^{III}TPyP$** (35 mg, 0,052 mmol) dans le DMF (30 mL) on additionne de l'iodure de méthyle (24 équiv., 80 µL). Le mélange est laissé à réagir à 50°C. Au bout de 24 heures, le DMF est condensé sous pression réduite (2 mL) et le produit est précipité dans l'acétone et laissé à 4°C. Après 3 heures, le mélange est filtré sur fritté et le produit est récupéré sous la forme d'une poudre verte. Cette poudre est purifiée sur une colonne dowex échangeuse d'anions Cl^- pour remplacer les ions iodure par des ions chlorure. Le complexe **$Fe^{III}TMPyP$** est obtenu sous la forme d'une poudre verte (32mg) avec un rendement de 68 %.

ESI-MS HR : m/z calc : 183,0482 (100, $[M+H]^+$) m/z mes : 183,0625 (100, $[fer(III)+ TMPyP-H]^{4+}$)

IV) Synthèse des polymères modifiés

IV-A) Preuve de concept

IV-A-1) Preuve de concept de la guanidilation des amines primaires :

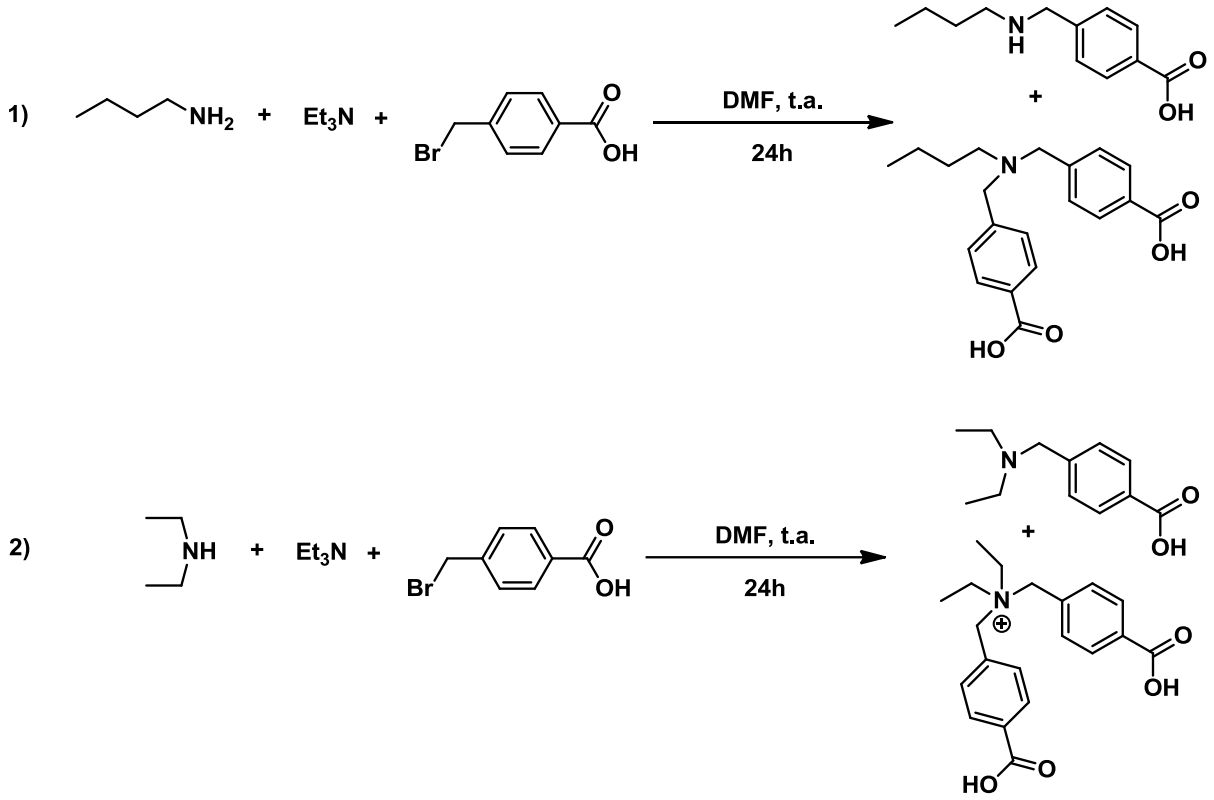


Mode opératoire :

À une solution de butylamine (67 µL, 0,68 mmol) dans le DMF (5mL), sont additionnés de la triéthylamine (4 équiv., 378 µL) puis une solution de 1*H*-Pyrazole-1-carboxamidine hydrochlorée (1 équiv., 100 mg) dans le DMF (1 mL). Après 6 heures à température ambiante, la solution est évaporée à sec et caractérisée par spectrométrie de masse. Un seul pic est observé caractéristique du composé amine guanidilée.

ESI-MS : m/z = 116 (100, $[M]^+$)

IV-A-2) Preuve de concept de la fonctionnalisation des amines primaires et secondaires par l'acide 4-(bromométhyl)benzoïque



Mode opératoire :

1) Amines primaires :

À une solution de butylamine (46 µL ; 0,46 mmol) dans le DMF (5 mL) sont additionnés 2 équivalents de triéthylamine puis 1 équivalent d'acide 4-(bromométhyl)benzoïque (100 mg dans 1 mL de DMF). Après 6 heures, la solution est évaporée puis caractérisée par spectrométrie de masse.

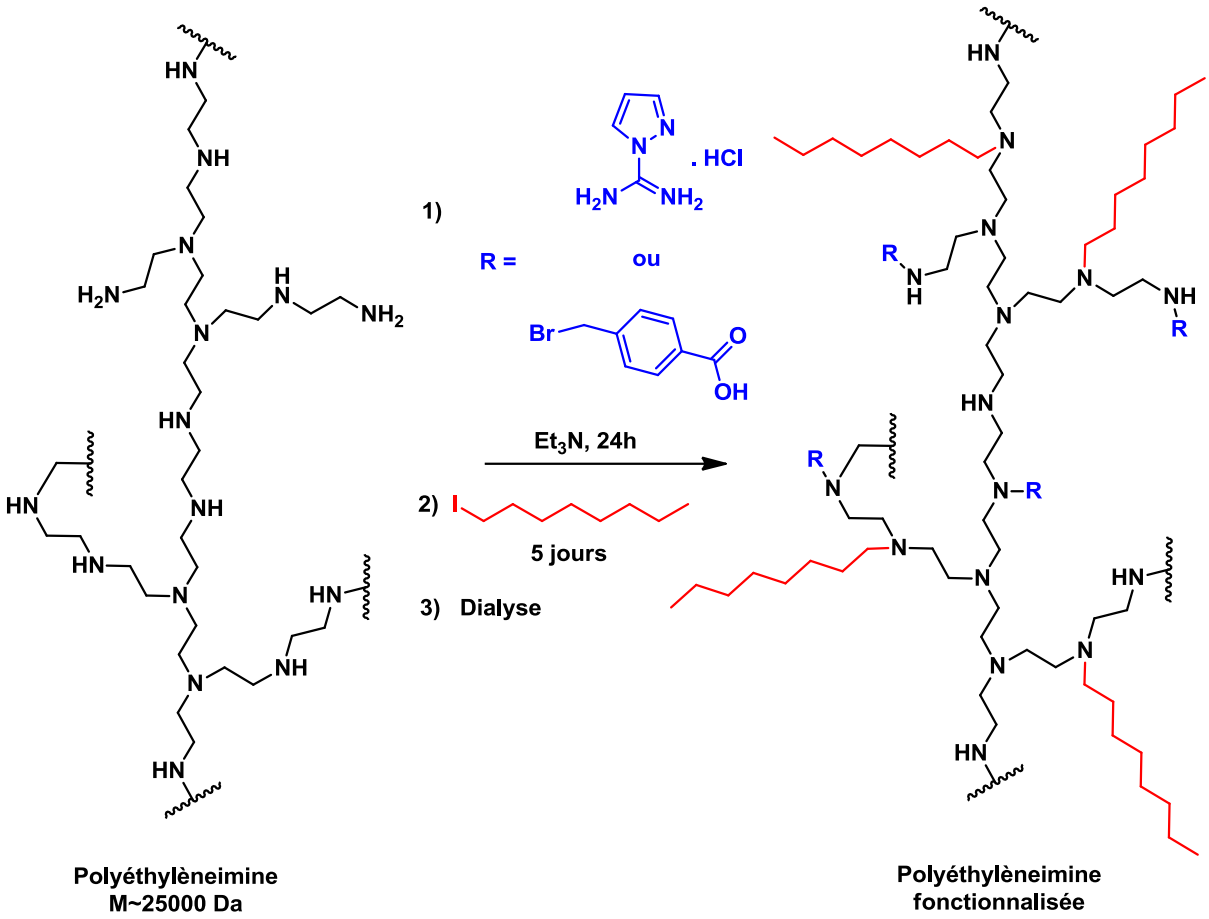
2) Amines secondaires :

Nous utilisons le même protocole pour 2) que pour 1) mais en utilisant la diéthylamine (48,5 µL ; 0,47 mmol) comme amine.

ESI-MS (mode négatif): 1) m/z = 207 (10, [amine monosubstituée]$^-$; 342 (100, [amine disubstituée]$^-$.

2) m/z =207 (10, [amine monosubstituée]$^-$; 342 (100, [amine disubstituée]$^-$.

IV-B) Synthèse des polymères fonctionnalisés



Mode opératoire :

Le début de la synthèse est la même pour tous les différents polymères modifiés réalisés. Les polymères modifiés sont synthétisés dans des tubes Falcon de 50 mL à partir de polyéthylèneimine multi-branché de taille moyenne de 25 kDa. Le polymère est solubilisé dans du DMF (20 mL) pour donner une concentration finale en PEIcom de 8,6 mg.ml^{-1} (200 mM en résidus de monomère). Ensuite, sont additionnés :

- Dans le cas de la monofonctionnalisation par les groupements carboxylate :

Pour la dérivatisation avec des groupements carboxylate, 4 équivalents de triéthylamine par groupements carboxylate sont additionnés à la solution de PEIcom puis une solution d'acide 4-(bromomethyl)benzoique (172 mg) dans le DMF (1mL) est ajoutée goutte à goutte (0,2 équivalent par monomère). La solution se trouble et est laissée 2 heures à température ambiante avant d'être traitée. Les études cinétiques par RMN ^{1}H indiquent que la réaction est achevée en une minute.

- Dans le cas de la monofonctionnalisation par les groupements octyle :

Pour la dérivatisation avec des groupements octyle, 4 équivalents de triéthylamine par groupements octyle sont additionnés à la solution de PEIcom puis, l'iodooctane est ajouté goutte à goutte (0,2 à 6 équivalents par monomère ; 0,216 à 6,240 mL). La solution est laissée 4 heures sous agitation à température ambiante. Les études cinétiques réalisées par RMN ^{1}H avec 0,4 équivalent d'octyle indiquent que la réaction est achevée en 2 heures et qu'au-delà de ce temps, le polymère commence à précipiter. Il faut noter que dès lors que 0,6 équivalent d'octyle seul sont ajoutés, le polymère modifié précipite et ne peut être resolubilisé. Il n'est donc pas possible de fonctionnaliser le PEIcom uniquement avec des groupements octyle.

- Dans le cas de la monofonctionnalisation par les groupements guanidinium :

Pour la dérivatisation avec des groupements guanidinium, 4 équivalents de triéthylamine par groupement guanidinium sont additionnés à la solution de PEIcom puis une solution fraîchement préparée de chlorhydrate de 1-H-pyrazole-1-carboxamidine dans le DMF (1 mL) est additionnée goutte à goutte (0,2 à 1 équivalent par monomère). Un précipité jaune se forme et la solution est laissée à réagir 24 heures sous agitation à température ambiante. Les études cinétiques réalisées par RMN ^{1}H pour une fonctionnalisation du PEIcom par 0,4 équivalent de guanidinium indiquent que le rendement de la réaction est de 50 % en 24 heures.

- Dans le cas de la bi-fonctionnalisation avec les groupements carboxylate et octyle :

Pour la dérivatisation avec à la fois des groupements carboxylate et octyle, nous procédons de la même manière que pour la monofonctionnalisation. Toutefois l'octyle est ajouté en deuxième après 2 heures de réaction avec en présence des groupements carboxylate. La solution est laissée à réagir 4 jours sous agitation à température ambiante.

- Dans le cas de la bi-fonctionnalisation avec les groupements guanidinium et octyle :

Pour la dérivatisation avec à la fois des groupements guanidinium et octyle, on procède de la même manière que la fonctionnalisation seule. Toutefois, l'octyle est ajouté en deuxième après 24 heures de réaction avec le guanidinium. La solution est laissée réagir 4 jours sous agitation

- Exemple détaillé de la synthèse d'un polymère bi-fonctionnalisé (PEIFg)

Par exemple, pour le polymère modifié par 0,2 équivalent de groupements guanidinium par monomère et 0,4 équivalent de groupements octyle par monomère, une solution de polyéthylèneimine est dissoute dans le DMF (30mL) pour donner une concentration finale en PEIcom de 8,6 mg ml-1 (200 mM en résidus de monomère). Pour la dérivatisation avec des groupements guanidinium, 4 équivalents de triéthylamine par guanidinium sont ajoutés à la solution de PEIcom puis une solution fraîchement préparée de chlorhydrate de 1-H-pyrazole-1-carboxamidine dans le DMF (1 ml à 1,2 $mol.L^{-1}$) est ajoutée goutte à gouttes sous agitation vigoureuse. Ce mélange réactionnel est ensuite laissé à réagir sous agitation pendant une nuit à température ambiante. Pour l'alkylation, 0,433 mL de iodooctane sont ajoutés goutte à goutte sous agitation vigoureuse, poursuivie pendant 4 jours à température ambiante.

Traitement :

Le traitement est le même pour tous les polymères modifiés. Une solution de HCl 50mM est ajoutée aux différentes solutions jusqu'à atteindre une dilution finale d'environ (1:2). Pendant ce traitement, les précipités formés au préalable lors de la réaction sont dissous à nouveau à l'exception des PEI monofonctionnalisés par des groupements octyle. Ces PEIF précipitent lorsque de fortes concentrations en groupements octyle sont additionnées, ils sont irrécupérables.

Purification :

Les solutions résultantes sont transférées dans des membranes de dialyse (Spectra/Pore membrane, Mw ~ 14000) pour ensuite être purifiées par dialyse sous faible agitation dans chacun des tampons suivants au moins 2 heures : 20 % EtOH dans HCl 50 mM ; HCl 50 mM ; eau distillé (x 2) ; NaOH 50 mM (x 2) et eau distillée (x 3). Après dialyse, les solutions sont remises dans un tube Falcon, les volumes sont quantifiés et les concentrations en monomère des différents polymères modifiés sont calculées par un simple produit en croix entre les volumes de départ et d'arrivé ainsi que par RMN ^{1}H.

Caractérisation :

Les tubes RMN sont réalisés suivant un protocole que nous avons mis en place, permettant d'avoir la plus grande reproductibilité lors de cette préparation afin de faciliter leur résolution par RMN. Pour cela, 2 mL de solution de polymère venant d'être dialysé, sont prélevés au pipetman de 1mL, puis 10 µL d'étalon interne sont ajoutés eux-aussi au pipetman (MeOH pour octyl et carboxylate et MeCN pour guanidinium). Ensuite, 600 µL de la solution servent à laver le tube RMN, et enfin 600µL sont mis dans le tube RMN puis analysés.

RMN ^{1}H, eau, 400 MHz :

Une expérience typique de WATERGATE est paramétrée avec un temps d'acquisition (AQ) de 3,17 secondes acquis sur 24 K points (TD), avec un délai (D1) de 15 secondes, un délai de scan (DS) de 8 et un nombre de scans de 32. Le temps total d'une mesure est de 12 minutes, et lors d'une expérience 5 mesures sont effectuées ce qui fait un temps total pour l'expérience d'une heure.
Une fois enregistré, le signal est multiplié par une exponentielle décroissante lb = 0,2 Hz avant de subir une transformée de Fourier (FT ; SI = 32K). Pour finir, le spectre obtenu subit une correction de ligne de base avant d'être intégré. Les déplacements caractéristiques de chacun des polymères sont les suivants :

Carboxylate : δ 7,72 (2H, aro) ; 7,25 (2H, aro); 3,56 (CH2 benzylique); 2,51 (CH_2 (PEI))

Octyle : δ 2,67 (CH_2 (PEI)); 1,30 (s, CH_2 octyle); 0,90 (s, CH_3 octyle)

Guanidinium : δ 3,56-3,03 (CH_2 portant fonction guanidinium) ; 2,65 (CH_2 (PEI))

V) Expériences réalisées sur l'enzyme artificielle

V-A) Incorporation de la FMN

V-A-1) Expérience UV-Visible

Une solution de FMN (2,5 mL, 50 µM) dans l'eau est préparée dans une cuve UV-Visible. Une solution de PEIFg (0.20/0.30) (4mM final en monomère, 80 équivalents) dans l'eau est ajoutée à la FMN. Le spectre UV-Visible de la solution est enregistré entre 300 et 600 nm avant et après l'ajout de PEIFg.

V-A-2) Expérience de fluorescence

Les expériences d'extinction de la fluorescence sont réalisées dans une plaque 96 puits à fond noir. Une solution de FMN (1µM) est réalisée et différentes quantités de PEIFg (0.20/0.30) sont ajoutées (0 à 90 équivalents en monomère) pour un volume final de 200 µL. Les spectres sont enregistrés à une longueur d'onde d'excitation de 450 nm avec 25 flashs, un temps de mesure de 20 µs, un temps de latence avant la mesure de 8 µs et un temps de repos après la mesure de 2 ms. Le maximum d'émission est mesuré à 530 nm.

V-B) Incorporation du catalyseur dans le polymère

V-B-1) UV-Visible

V-B-1-a) Avec un complexe de cuivre

Deux solutions, une de PEIcom (2,5 mM en monomère) et une de PEIFac 0.2/0.6 (9,3 mM en monomère) sont réalisées dans l'eau puis mis séparément dans deux membranes de dialyse (Spectra/Pore membrane, Mw ~ 14000). Ces membranes sont ensuite trempées dans une solution du complexe de cuivre $[Cu^{II}(HGPBP)Cl]ClO_4$ dans l'eau (1,1mM). La diminution du spectre d'absorbance de la solution de cuivre est mesurée par UV-Visible à 660nm. Un aliquote de chacune des solutions est prélevé aux différents temps (T= 0 ; 30 ; 90 min. et 65h), puis remis en solution pour ne pas modifier le volume des solutions et donc la concentration en cuivre.

V-B-1-b) Avec une porphyrine de fer

Une solution du complexe Fe^{III}TDCPP (65µM) dans un mélange eau/MeCN (9 :1 ; 5 mL) est réalisée. Ensuite cette solution est transférée dans deux cuves UV-Visible (2,5 mL). Du polymère modifié PEIFg (0.20/0.30) (1,625mM, 24 équivalents) est ajouté seulement dans une seule cuve. Les deux solutions sont laissées 24 heures au repos puis leur spectre UV-Visible respectif est enregistré.

V-B-2) Fluorescence des porphyrines

Les expériences d'extinction de la fluorescence sont réalisées dans une plaque 96 puits à fond noir. Une solution de porphyrine (10 µM) est réalisée et différentes quantités de PEIFg (0.20/0.30) pour Fe^{III}TDCPP et PEIFac (0.6/0.6) pour Mn^{III}TPyp et Mn^{III}TMPyP sont ajoutées (0 à 1 000 équivalents en monomère) pour un volume final de 300 µL. Les spectres sont enregistrés à une longueur d'onde d'excitation de 230 nm avec 25 flashs, un temps de mesure de 20 µs, un temps de latence avant la mesure de 5 µs et un temps de repos après la mesure de 2 ms. Le maximum d'émission est mesuré à 320 nm.

V-C) Expériences de réduction

V-C-1) Caractérisation de la réduction de la FMN par UV-Visible

Pour la réduction de la FMN par le NADH (avec ou sans polymère) ; des solutions de FMN (2,5 mM), de polymère modifié PEIFg (0.20/0.30) (20 mM), du NADH (12,5 mM) et de l'eau ont été préparées séparément et dégazées pendant une heure. Parallèlement, une cuve UV-Visible (2,5 mL) munie d'un septum est dégazée et une solution de FMN (50 µM) et de PEIFg (0.20/0.30) (1,2 mM) est préparée avant injection de NADH (200 µM, 4 équivalents) à travers le septum. La même expérience est réalisée sans polymère. Ensuite, le spectre de la cinétique de réduction de la FMN

est enregistré à 20°C sous atmosphère d'argon, entre 250 et 800 nm. Un spectre est enregistré toutes les 30 secondes pendant 5 minutes puis toutes les minutes pendant 55 minutes et enfin toutes les 10 minutes pendant 4 heures. La réaction est terminée au bout de 2 heures.

V-C-2) Caractérisation de la réduction et de l'oxydation des métalloporphyrines par UV-Visible

Pour la réduction de la porphyrine de manganèse, une solution aqueuse de FMN (10 µM), de polymère modifié PEIFg (0.20/0.30) (250 µM en monomère) et de Mn^{III}TPyP (10 µM) a été préparée directement dans une cuve UV-Visible (2,5 mL) équipée d'un septum. En parallèle, une solution de NADH (2,5 mM) dans l'eau est préparée puis les deux solutions sont dégazées pendant 15 minutes. Ensuite, le spectre de la cinétique de réduction de Mn^{III}TPyP a été enregistré à 20 ° C sous atmosphère d'argon entre 350 et 800nm, avant et après addition de NADH (40 µM, 4 équivalents). La même expérience a été réalisée sans polymère. Les spectres sont enregistrés toutes les 30 secondes pendant 10 minutes. Après réduction, la cuve est ouverte à l'air afin de suivre le processus d'oxydation de la porphyrine avec l'enregistrement d'un spectre toutes les minutes.

V-C-3) Caractérisation de la réduction et de l'oxydation du complexe de cuivre $[Cu^{II}(HGPBP)Cl]ClO_4$ par RPE et UV-Visible

V-C-3-1) UV-Visible, expérience 1

Pour la réduction du cuivre, une solution aqueuse de FMN (100 µM), de polymère modifié PEIFg (0.20/0.30) (2,5 mM en monomère) et de complexe de cuivre (1 mM) a été préparée directement dans une cuve en quartz (2,5 mL) équipée d'un septum. Une solution de NADH (30mM) est réalisée en parallèle et les deux solutions sont dégazées pendant 30 minutes. Ensuite, le spectre de la cinétique de réduction du complexe de cuivre a été enregistré à 20 °C sous atmosphère d'argon entre 350 et 800nm, avant et après addition de NADH (600 µM, 1,2 équivalent). Les spectres sont enregistrés toutes les minutes pendant 1 heure puis un spectre toutes les 10 minutes pendant 2 heures. Après réduction, la solution est exposée à l'air libre afin de suivre le processus d'oxydation du cuivre avec l'enregistrement d'un spectre toutes les 30 secondes pendant 10 minutes.

V-C-3-2) UV-Visible, expérience 2

Pour la réduction du cuivre, une solution aqueuse de FMN (100 µM) et de polymère modifié PEIFg (0.20/0.30) (2,5 mM en monomère) est réduite dans les mêmes conditions que décrites pour la réduction de la FMN. Ensuite, l'ajout du complexe de cuivre toutes les 5 minutes par portions de 0,2 équivalent permet l'oxydation de la FMN. Il est nécessaire de mettre jusqu'à deux équivalents de cuivre pour arriver au plateau. En parallèle, un contrôle est fait en ajoutant des volumes d'eau identiques afin d'être sûr que cette oxydation n'est pas due à une fuite d'oxygène dans l'expérience lors des différents ajouts.

V-C-3-3) RPE

Une solution aqueuse de complexe de cuivre (1 mM), de FMN (100 µM) et de polymère modifié PEIFg 0.2/0.3 (10 mM) est préparée en boîte à gants. Les tubes RPE sont réalisés avant et 1 heure (ou 2 heures pour les contrôles) après ajout de NADH (750 µM, 1,5 équivalent). Les tubes sont remplis avec 200 µL de solution puis sortis de la boîte à gants dans la minute pour être plongés dans un bain d'éthanol à ~ 173 K (éthanol refroidi dans de l'azote liquide) puis transférés dans l'azote liquide et refroidis à 77 K avant d'être entrés dans le spectromètre RPE. Les contrôles sont réalisés dans les mêmes conditions.

V-C-4) Caractérisation de la réduction du complexe de fer $[Fe^{III}_2(N\text{-}EtHMPTB)(CH_3OH)_2(H_2O)_2](ClO_4)_4$

V-C-4-1) Expérience de photo-réduction caractérisée par UV-Visible

Une solution du complexe de fer (0,5mM), de ruthénium $[Ru^{II}(bpy)_3]Cl_2$ (0,5 mM) et de triéthylamine (100 équivalents) dans MeCN est réalisée dans une cuve UV-Visible (2,5 mL). Le spectre d'absorbance est réalisée puis la solution est désoxygénée pendant 30 minutes avec de l'argon. Ensuite, la solution est irradiée en continu à 450 nm pendant 10 minutes avec une LED. Après irradiation, le spectre d'absorbance est enregistré avant et après exposition au dioxygène de l'air.

V-C-4-2) Expérience de réduction par le « synzyme » caractérisée par UV-Visible

Pour la réduction du fer, une solution aqueuse de FMN (100 µM) et de polymère modifié PEIFg 0.2/0.3 (2,5 mM en monomère) est réduite dans les mêmes conditions que décrites pour la réduction de la FMN. Ensuite, l'ajout du complexe de fer toutes les 5 minutes par portions de 0,2 équivalent permet l'oxydation de la FMN. Il est nécessaire de mettre jusqu'à deux équivalents de fer pour arriver au plateau. En parallèle, un contrôle est fait en ajoutant des volumes identiques de MeCN afin d'être sûr que cette oxydation n'est pas due à une fuite d'oxygène dans l'expérience lors des différents ajouts.

V-D) Electrochimie

Pour les expériences d'électrochimie, une solution de FMN (0,1 mM) dans un tampon HEPES (10 mM) est préparée. Le voltamogramme à signaux carrés est enregistré sous atmosphère d'argon avant et après l'addition du polymère modifié PEIFg (0.20/0.30) (2,5 mM) entre 0 V et -0,8 V. En l'absence du polymère, l'expérience est réalisée avec 10 mM de KCl comme électrolyte qui ne sont pas nécessaires en présence du polymère chargé positivement qui joue déjà ce rôle. Les mesures sont réalisées avec une électrode de carbone, l'électrode de référence (Ag / AgCl) et la contre-électrode (Pt). Le potentiel varie par sauts de -0.005 V, l'amplitude du signal est de 0.020 V, et la fréquence de 25 Hz.

VI) Expérience de catalyse

VI-A) Pousse seringue

À une solution de complexe (0,7 mM) et de substrat (700 mM) dans 900 µL d'acétonitrile, ont été injectés 100 µL d'une solution de peroxyde d'hydrogène (70 mM) dans l'acétonitrile, à l'aide d'un pousse seringue, sur une période de 30 minutes et sous agitation vigoureuse. Une fois l'injection terminée, le milieu réactionnel a été laissé sous agitation à température ambiante durant 5 minutes.

VI-B) Photo-catalyse

Une solution du complexe de fer (0,5mM), de ruthénium $[Ru^{II}(bpy)_3]Cl_2$ (0,5mM), de triéthylamine (50mM) et de substrat (500mM) dans MeCN est réalisée dans un Schlenk avec un volume final de 2 mL. Cette solution est ensuite gelée à l'azote liquide puis désoxygénée par 5 cycles vide/argon. La solution est irradiée en continu à 450 nm pendant 10 minutes avec une LED. Après irradiation, de l'oxygène est mis à buller pendant une minute et la réaction est laissée à réagir sous agitation 10 minutes.

VI-C) Enzyme artificielle

Les expériences de catalyse ont été réalisées dans des flacons de 1,5 mL. À une solution aqueuse de FMN (100 µM), de catalyseur (100 µM) et de polymère modifié PEIFg (2,5 mM en monomère) est ajoutée une solution de thioanisole dans MeCN (100 mM) donnant un volume final de 900 µL. Ensuite, 100 µL d'une solution de NADH à 10 mM (10 équivalents) ont été ajouté sous agitation vigoureuse et le mélange a été laissé sous agitation pendant 5 heures à température ambiante sous une atmosphère de O_2. Le volume final est de 1 mL.
Les expériences avec 50 équivalents de NADH sont réalisées de la même manière avec cependant un temps de réaction de 24 heures.

VI-D) Traitement des catalyses et conditions de GC des substrats

Pour les analyses par GC, 100 µL d'une solution d'acétophénone ou d'anisole (10 mM) dans l'acétonitrile ont été ajoutés sur une colonne de silice (1 cm dans une pipette pasteur), sur laquelle a ensuite été filtré le milieu réactionnel, et élué avec 3 mL d'acétonitrile. Enfin, 3 µL de filtrat ont été injectés dans une colonne Zebron ZB Semi Volatiles (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Selon le substrat utilisé, les conditions suivantes ont été utilisées :

Thioanisole : 100°C à 130°C, 5°C/min, puis 130°C à 300°C, 50°C/min, palier de 3 minutes. Température de l'injecteur et du FID : 300°C. Etalon interne : acétophénone. Temps de rétention (min) : acétophénone (4,03), thioanisole (4,32), sulfoxyde methyl-phényle (7,56), methyl-phényle sulfone (8,04).

Cyclooctène : 100°C à 160°C, 20°C/min, palier de 1 minute, puis 160°C à 300°C, 40°C/min, palier de 3 minutes. Température de l'injecteur et du FID : 300°C. Etalon interne : acétophénone. Temps de rétention (min) : cyclooctene (2,36), acétophénone (3,04), époxycyclooctène (3,36), *cis*-cyclooctane-1,2-diol (4,95).

Cyclohexène : 50°C à 180°C, 20°C/min, puis 180°C à 300°C, 50°C/min, palier de 3 minutes. Température de l'injecteur et du FID : 300°C. Etalon interne : anisole. Temps de rétention (min) : cyclohexène (2,09), époxycyclohexène (3,17), 2-cyclohexénol (3,40), anisole (3,63), 2-cyclohexénone (3,75), *cis*-cylclohexan-1,2-diol (4,92).

Diphenylméthane : 100°C à 270°C, 50°C/min, palier de 3 minutes. Température de l'injecteur et du FID : 300°C. Etalon interne : acétophénone. Temps de rétention (min) : acétophénone (2,55), diphenylméthane (3,70), benzophénone (4,30).

Ethylbenzène : 100°C à 130°C, 3°C/min, puis 130°C à 250°C, 50°C/min, palier de 3 minutes. Température de l'injecteur et du FID : 300°C. Etalon interne : acétophénone. Temps de rétention (min) : éthylbenzène (2,42), anisole (2,72), acétophénone (4,33), 1-phényléthanol (4,19).

Toluène : 50°C à 250°C, 25°C/min, palier de 3 minutes. Température de l'injecteur et du FID : 300°C. Etalon interne : anisole. Temps de rétention (min) : toluène (2,45), anisole (3,35), benzaldéhyde (3,73), alcool benzylique (4,22).

Cyclohexane : 50°C à 70°C, 2°C/min, puis 70°C à 250°C, 50°C/min, palier de 3 minutes. Température de l'injecteur et du FID : 300°C. Etalon interne : acétophénone. Temps de rétention (min) : cyclohexane (2,26), cyclohexanol (6,43), cyclohexanone (6,69), acétophénone (11,71).

Les analyses quantitatives ont été réalisées de façon similaire aux analyses quantitatives décrites pour l'étude de la catalyse d'oxydation du dibenzothiophène (gamme et droite d'étalonnage, étalon interne et coefficient de réponse). La concentration en différents composés organiques (composé X) des échantillons prélevés pour analyse par GC a été quantifiée d'après l'équation suivante :

$A_X = u \times n_X$

avec n_X la quantité de composé X en mole,
A_X l'aire du pic associé au composé X sur le chromatogramme,
u une constante.

La **Tableau PE.1** regroupe les équations des différentes droites d'étalonnage réalisées par GC, en vue de l'analyse quantitative des différents échantillons obtenus lors des expériences de catalyse d'oxydation effectuées avec ou sans l'aide d'un pousse seringue

Tableau PE.1 : Equations des droites d'étalonnage réalisées par chromatographie en phase gazeuse des différents composés utilisés lors des études de catalyse d'oxydation effectuées avec ou sans l'aide d'un pousse seringue.

Composé (substrat ou étalon interne)	Equation de la droite d'étalonnage
Sulfoxyde de méthyl-phényle	$A_X = 20747639494439,5 \times n_X$
Méthyl-phényl sulfone	$A_X = 21912439632367,3 \times n_X$
Epoxycyclooctène	$A_X = 23147459705666,9 \times n_X$
cis-cyclooctan-1,2-diol	$A_X = 24898835212949,9 \times n_X$
Epoxycyclohexène	$A_X = 16249481035628,9 \times n_X$
cis-cyclohexan-1,2-diol	$A_X = 17075948178525,1 \times n_X$
2-cyclohexénol	$A_X = 16926771040594,8 \times n_X$
2-cyclohexénone	$A_X = 14244399187692,3 \times n_X$
Benzophénone	$A_X = 43355742868429,9 \times n_X$
Acétophénone	$A_X = 21194870205794,8 \times n_X$
1-phényléthanol	$A_X = 22639069836570,7 \times n_X$
Benzaldéhyde	$A_X = 21040945116237,7 \times n_X$
Alcool Benzylique	$A_X = 20025975920787,3 \times n_X$
Cyclohexanol	$A_X = 1850950804664,0 \times n_X$
Cyclohexanone	$A_X = 18982420059669,4 \times n_X$
Anisole	$A_X = 20910960370488,5 \times n_X$

ANNEXES

ANNEXES

I) Données cristallographiques

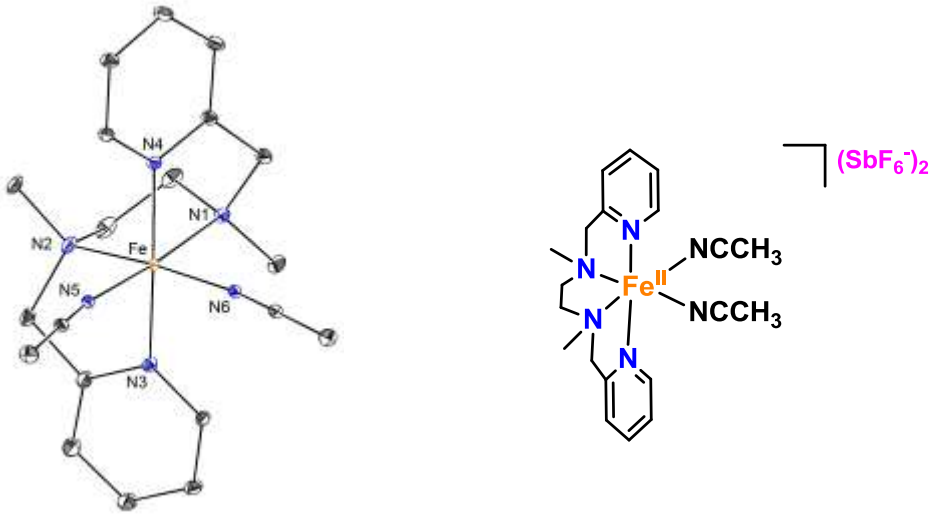


Figure Annexe.1 : Diagramme ORTEP (à 30 % de probabilité) du complexe [Fe^{II}(BPMEN)(CH$_3$CN)$_2$](SbF$_6$)$_2$. Les anions et les molécules de solvants non coordinées ont été omis pour plus de clarté.

Tableau Annexe.1 : Distances Fe-N et angles entre les atomes de N, Fe et O de la première sphère de coordination du complexe $[Fe^{II}(BPMEN)(CH_3CN)_2](SbF_6)_2$.

	Distances de la liaison en Å	Angles	Degrés (°)
	$[Fe^{II}(BPMEN)\ (CH_3CN)_2](SbF_6)_2$		
Fe-N1	2,04	N6-Fe-N5	89,59
Fe-N2	2,03	N6-Fe-N4	92,83
Fe-N3	1,99	N6-Fe-N3	88,34
Fe-N4	1,97	N6-Fe-N2	174,05
Fe-N5	1,94	N6-Fe-N1	93,58
Fe-N6	1,94	N5-Fe-N4	89,54
		N5-Fe-N3	93,53
		N5-Fe-N2	91,3
		N5-Fe-N1	173,34
		N4-Fe-N3	176,72
		N4-Fe-N2	81,3
		N4-Fe-N1	96,14
		N3-Fe-N1	80,73
		N3-Fe-N2	97,47
		N2-Fe-N1	86,15

Tableau Annexe. 2 : Distances Fe-N et angles entre les atomes de N, Fe et O de la première sphère de coordination du complexe $[Fe^{II}(BPMENG)Cl_2]Cl$.

	Distances de la liaison en Å	Angles	Degrés (°)
	$[Fe^{II}(BPMENG)Cl_2]Cl$		
Fe-N1	2,18	N4-Fe-N3	74,71
Fe-N2	2,29	N4-Fe-N2	93,05
Fe-N3	2,26	N4-Fe-N1	165,13
Fe-N4	2,19	N3-Fe-N1	93,83
Fe-Cl1	2,39	N3-Fe-N2	79,65
Fe-Cl2	2,44	N2-Fe-N1	75,28
		N4-Fe-Cl1	93,26
		N3-Fe-Cl1	164,19
		N2-Fe-Cl1	91,01
		N1-Fe-Cl1	96,1
		N4-Fe-Cl2	97,02
		N3-Fe-Cl2	93,02
		N2-Fe-Cl2	165,55
		N1-Fe-Cl2	92,96
		Cl1-Fe-Cl2	98,71

Tableau Annexe. 3 : Distances Fe-N et angles entre les atomes de N, Fe et O de la première sphère de coordination du complexe $[Fe^{III}(BPMEN)Cl_2]PF_6$.

Type liaison	Distances de la liaison en Å	Angles	degrés (°)
	$[Fe^{III}(BPMEN)Cl_2]PF_6$		
Fe-N1	2,15	N4-Fe-N3	75,11
Fe-N2	2,23	N4-Fe-N2	93,56
Fe-N3	2,22	N4-Fe-N1	166,17
Fe-N4	2,16	N3-Fe-N1	94,34
Fe-Cl1	2,27	N3-Fe-N2	79,72
Fe-Cl2	2,27	N2-Fe-N1	75,5
		N4-Fe-Cl1	94,19
		N3-Fe-Cl1	91,36
		N2-Fe-Cl1	165,66
		N1-Fe-Cl1	94,16
		N4-Fe-Cl2	93,59
		N3-Fe-Cl2	164,64
		N2-Fe-Cl2	90,83
		N1-Fe-Cl2	94,98
		Cl1-Fe-Cl2	100,01

Tableau Annexe. 4 : Distances Fe-N et angles entre les atomes de N, Fe et O de la première sphère de coordination du complexe $[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENG)_2Cl_2]Cl_4$.

Type liaison	Distances de la liaison en Å	Angles	degrés (°)	Angles	degrés (°)
	$[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})\ (BPMENG)_2Cl_2]Cl_4$			Fe-1-O1-Fe2	175,95
Fe1-N1	2,24	O1-Fe1-N4	96,46	O1-Fe2-N11	96,26
Fe1-N2	2,28	O1-Fe1-N3	95,21	O1-Fe2-N10	96,41
Fe1-N3	2,15	O1-Fe1-N2	166,17	O1-Fe2-N9	166,6
Fe1-N4	2,16	O1-Fe1-N1	93,97	O1-Fe2-N8	93,8
Fe2-N8	2,21	O1-Fe1-Cl1	101,19	O1-Fe2-Cl2	100,43
Fe2-N9	2,31	N4-Fe1-N3	165,18	N11-Fe1-N10	164,85
Fe2-N10	2,15	N4-Fe1-N2	93,02	N11-Fe2-N9	73,29
Fe2-N11	2,14	N4-Fe1-N1	75,03	N11-Fe1-N8	95,11
Fe1-O1	1,8	N3-Fe1-N1	95,09	N10-Fe1-N8	75,79
Fe2-O2	1,79	N3-Fe1-N2	73,97	N10-Fe1-N9	92,89
Fe1-Cl1	2,32	N2-Fe1-N1	78,76	N9-Fe2-N8	79,14
Fe2-Cl2	2,33	Cl1-Fe1-N4	94,02	Cl2-Fe2-N11	93,42
		Cl1-Fe1-N3	92,64	Cl2-Fe2-N10	92,43
		Cl1-Fe1-N2	88,12	Cl2-Fe2-N9	88,75
		Cl1-Fe1-N1	162,27	Cl2-Fe2-N8	162,5

Tableau Annexe. 5 : Distances Fe-N et angles entre les atomes de N, Fe et O de la première sphère de coordination du complexe $[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENméthoxy)_2Cl_2](CHCl_3)_4\ Cl_2$.

Type liaison	Distances de la liaison en Å	Angles	degrés (°)
Fe1=Fe2	$[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})\ (BPMENméthoxy)_2Cl_2]\ (CHCl_3)_4Cl_2$		
Fe-N1	2,2	O4-Fe-N4	96,01
Fe-N2	2,31	O4-Fe-N3	98,43
Fe-N3	2,17	O4-Fe-N2	165,53
Fe-N4	2,14	O4-Fe-N1	92,36
Fe-O	1,8	N4-Fe-N3	162,82
Fe-Cl1	2,33	N4-Fe-N2	73,68
		N4-Fe-N1	95,38
		N3-Fe-N1	74,82
		N3-Fe-N2	90,38
		N2-Fe-N1	78,83
		N4-Fe-Cl	93,21
		N3-Fe-Cl	92,67
		N2-Fe-Cl	88,41
		N1-Fe-Cl	161,91
		O4-Fe-Cl	102,53

Tableau Annexe. 6 : Données cristallographiques et détails de l'affinement des structures pour les composés caractérisés par diffraction des rayons X.

Compound	**$[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENméthoxy)_2Cl_2](CHCl_3)_4\ Cl_2$**	**$[Fe^{III}_2(\mu\text{-oxo})(BPMENG)_2Cl_2]Cl_4$**	**$[Fe^{III}(BPMEN)Cl_2]PF_6$**	**$[Fe^{II}(BPMENG)Cl_2]Cl$**
Empirical Formula	$C_{44}\ H_{68}\ Cl_2\ Fe_2\ N_8\ O_5$, 4(C H Cl_3), 2(Cl)	$C_{38}\ H_{60}\ Cl_2\ Fe_2\ N_{14}$ O, 4(Cl), 9(O)	$C_{16}\ H_{22}\ Cl_2\ F_6$ Fe N_4,(P F_6)	$C_{19}\ H_{30}\ Cl_2$ Fe N_7, Cl, 1.25 O
M_r	1520.04	1197.40	542.10	538.70
Crystal system	monoclinic	monoclinic	monoclinic	monoclinic
Space group	*C 2/c*	*P $2_1/n$*	*P $2_1/c$*	*P $2_1/c$*
a, Å	23.4084(10)	15.6412(5)	9.2776(3)	21.640(2)
b, Å	14.2065(5)	13.9857(4)	17.7458(6)	14.0476(15)
c, Å	20.1113(8)	25.7840(7)	12.8569(5)	8.1189(8)
α, °	90	90	90	90
β, °	93.1330(10)	92.1400(10)	97.0580(10)	96.278(3)
γ, °	90	90	90	90
Cell volume, $Å^3$	6678.0(5)	5636.4(3)	2100.70(13)	2453.2(4)
Z	4	4	4	4
T, K	100(1)	100(1)	100(1)	100(1)
F_{000}	3120	2480	1100	1120
μ, mm^{-1}	1.512	0.860	1.041	0.968
θ range, °	1.68 – 26.39	1.55 - 30.58	1.97 - 30.60	1.73 - 30.62
Reflection collected	31 516	116 622	27 223	22 620
Reflections unique	6 839	16 889	6 085	6 748
R_{int}	0.0264	0.0793	0.0322	0.0937
GOF	1.035	1.007	1.020	1.047
Refl. obs. ($I>2\sigma(I)$)	5 913	10 147	4 911	3 282
Parameters	365	642	543	278
wR_2 (all data)	0.1336	0.2206	0.0788	0.2568
R value ($I>2\sigma(I)$)	0.0488	0.0736	0.0303	0.0822
Largest diff. peak and hole (e-.$Å^{-3}$)	-1.275 ; 2.427	-1.828 ; 1.381	-0.455 ; 0.969	-0.981 ; 1.999

Compound	**$[Fe^{II}(BPMEN)(CH_3CN)_2](SbF_6)_2$**	**$[Fe^{II}(BPMEN)ACC]SbF_6$**
Empirical Formula	$C_{20}\ H_{28}\ Fe\ N_6$, $2(F_6\ Sb)$	$C_{20}\ H_{28}\ Fe\ N_5\ O_2$, $F_6\ Sb$
M_r	879.83	662.08
Crystal system	monoclinic	monoclinic
Space group	*P 2₁/c*	*P 2₁/c*
a, Å	17.2217(6)	10.6202(3)
b, Å	20.1069(7)	20.6412(6)
c, Å	16.9451(6)	11.6374(3)
α, °	90	90
β, °	91.4780(10)	100.1960(10)
γ, °	90	90
Cell volume, $Å^3$	5865.7(4)	2510.79(12)
Z	8	4
T, K	100(1)	100(1)
F_{000}	3408	1320
μ, mm^{-1}	2.416	1.725
θ range, °	1.68 – 26.39	1.95 - 30.63
Reflection collected	72 834	61 655
Reflections unique	21 292	7 528
R_{int}	0.0240	0.0793
GOF	1.021	1.068
Refl. obs. ($I>2\sigma(I)$)	17 682	6 041
Parameters	747	318
wR_2 (all data)	0.0751	0.0892
R value ($I>2\sigma(I)$)	0.0304	0.0368
Largest diff. peak and hole (e-.$Å^{-3}$)	-1.516 ; 3.405	-1.336 ; 2.053

II) Données RMN

II-A) Quantification du greffage des polymères PEIF par RMN ^{1}H dans l'eau

II-A-1) Protocole de mesures RMN

1. Introduction de l'échantillon
2. Vérification de la stabilisation de la température
3. Accord en fréquence (« tuning ») et adaptation en impédance (« matching ») de la sonde de mesure pour l'échantillon introduit
4. Réglage de l'homogénéité de champ magnétique pour l'échantillon introduit à l'aide de l'allure du signal de précession libre et du spectre RMN acquis en temps réel
5. Définition de la fenêtre spectrale, avec la contrainte du positionnement « on resonance » dans cette fenêtre pour le signal de l'eau en vue de l'application de la séquence WATERGATE. Le délai caractéristique du WATERGATE est fixé à chaque fois à la mi-largeur de la fenêtre spectrale
6. Calibration de l'impulsion 90 degrés
7. Estimation du temps de relaxation longitudinal limitant pour une impulsion de 90degrés
8. Optimisation des paramètres d'acquisition (AQ, D1, TD, NS, DS). Les paramètres standards optimisés que nous avons utilisés sont : NS=16, DS=8, AQ = 3,17 secondes. Chaque expérience WATERGATE dure 12 minutes.
9. Apodisation, Zero-filling, Transformation de Fourier, Correction de ligne de base, Intégrations

II-A-2) Calibration de l'impulsion 90 degrés (p90)

Les impulsions RMN dite « large-bande » i.e excitant tous les spins de l'échantillon de l'isotope étudié et donc toutes les fréquences du spectre RMN sont habituellement des impulsions de type rectangulaire. Une impulsion rectangulaire est caractérisée par une durée d'impulsion, p1 (en microsecondes), de puissance correspondant à une atténuation notée « power level » (ou pl) en décibels (**Figure Annexe.2**). Exciter des spins revient donc à envoyer une certaine énergie pendant une certaine durée. Comme dans la plupart des cas, nous avons choisi de travailler à atténuation fixée, et de faire varier la durée de l'impulsion, de manière à calibrer la durée correspondant à une excitation théta égale à 90 degrés, P90. Le signal RMN mesuré évolue en sin(ϑ), où ϑ égale le produit γ.B1.p1, γ désignant le rapport gyromagnétique de l'isotope excité, et B1 l'amplitude de l'impulsion radiofréquence associée à l'atténuation pl1. Afin de calibrer P90, la stratégie utilisée est de suivre l'évolution de signal RMN obtenu en faisant varier p1 jusqu'à observer la première annulation du signal, ce qui correspond à la situation où ϑ égale 180 degrés, ou la seconde annulation du signal, ce qui correspond à la situation où ϑ égale 360 degrés. L'électronique de la console RMN associée à la génération des impulsions étant linéaire, il suffit alors de diviser par 2 (resp. par 4) la valeur de p1 obtenue pour la première (resp. seconde) annulation du signal afin de déterminer p90 pour une atténuation pl1 donnée. Il est possible d'utiliser un programme automatisé qui augmente d'un pas fixe sur un domaine de valeurs données la valeur de p1 pour une valeur de pl1 donnée (« paropt »), mais il est souvent plus rapide de procéder à une recherche par dichotomie permttant d'ajuster le pas de recherche en fonction du résultat observé. Pour s'assurer de la stabilité de l'aimantation d'équilibre par rapport à l'aimantation thermodynamique au cours de l'expérience, des accumulations non enregistrées ou « Dummy Scans » (DS) ont toujours été utilisées.

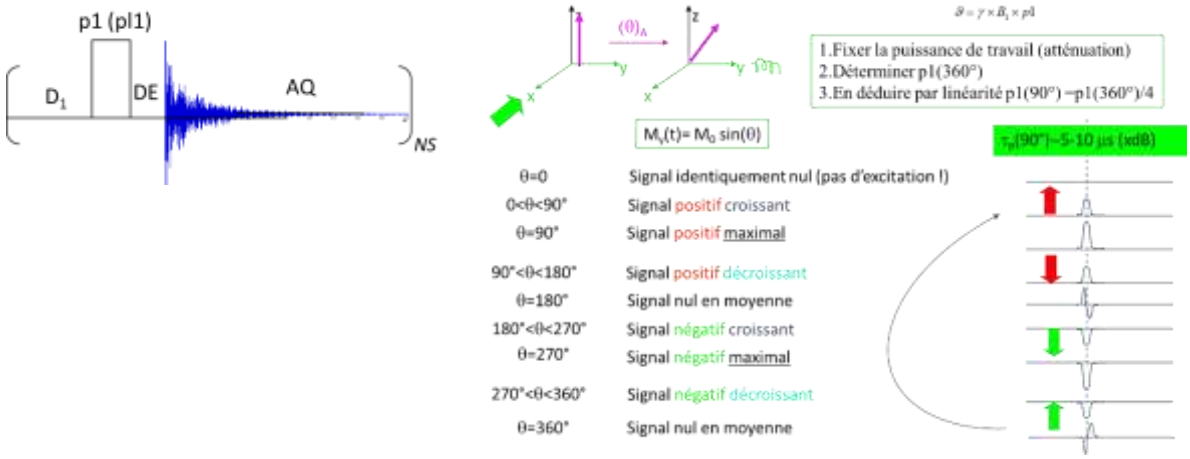


Figure Annexe.2 : à gauche : schéma de l'expérience RMN la plus simple, *i.e* excitation par une impulsion de durée p1 et d'atténuation pl1, puis détection du signal de précession libre ou FID. AQ est le temps d'acquisition du signal, D1 le temps d'attente avant chaque nouvelle accumulation, DE est un délai électronique, en général égal au pas d'échantillonnage du signal, assurant la détection du signal de précession libre dans le cas d'une impulsion non parfaitement rectangulaire. NS ou nombre de scans définit le nombre maximal d'accumulations du signal. A droite, évolution schématique de la phase du signal en fonction de ϑ.

II-A-3) Mesure de temps de relaxation longitudinale T_1

Une fois la calibration de l'impulsion p90 réalisée, il est possible de passer à l'estimation de la distribution des temps de relaxation longitudinale T_1 des spins d'intérêt. Celle-ci est quant à elle obtenue par la séquence dite d' « Inversion-Récupération » **(Figure Annexe.3).** Au cours de cette expérience, les spins excités sont tout d'abord par une impulsion égale à 180 degrés, ce qui, permet d'inverser l'aimantation globale du système de spins. Après un délai incrémentable, τ, l'état d'aimantation du système est observé par une impulsion de lecture de 90 degrés qui permet de mesurer la quantité d'aimantation effectivement revenue à l'équilibre au bout du temps τ. L'évolution de l'aimantation longitudinale Mz suit l'équation de Bloch $\frac{dMz}{dt} = \frac{Mz-M_0}{T_1}$ qui suppose une cinétique de retour à l'équilibre de constante de temps T_1 en partant d'une aimantation d'équilibre M_0. La résolution de cette équation avec la condition initiale de l'inversion de l'aimantation initiale *i.e* $M_z(0) = -M_0$ conduit à démontrer que $M_z(t) = M_0[1 - k\ exp(-t/T_1)]$, où k égale 2 dans le cas d'une impulsion parfaite. Deux solutions s'offrent en général pour déterminer alors la valeur de T_1. Si une détermination parfaite est requise, il est nécessaire d'acquérir suffisamment de points de la courbe $M_z(t)$, où le temps est échantillonné discrètement par la variable τ, afin d'ajuster par exemple par la méthode des moindres carrés les paramètres de l'équation *i.e.* M_0, k et T_1. En revanche, si une simple estimation peut suffire, ce qui a été notre cas de figure, nous pouvons simplement utiliser la constatation que $M_z(t)/M_0 = 0$ pour $t = T_1 ln2$. En ce cas, nous recherchons par dichotomie la valeur de τ pour laquelle le signal RMN observé s'annule. Une fois la valeur de temps de relaxation longitudinale la plus grande déterminée, il est possible de fixer la valeur de recyclage d'une expérience AQ+D1=5T_1 pour une impulsion de 90 degrés. Comme précédemment, pour s'assurer de la stabilité de l'aimantation d'équilibre par rapport à l'aimantation thermodynamique au cours de l'expérience, des accumulations non enregistrées ou « Dummy Scans » (DS) ont toujours été utilisées.

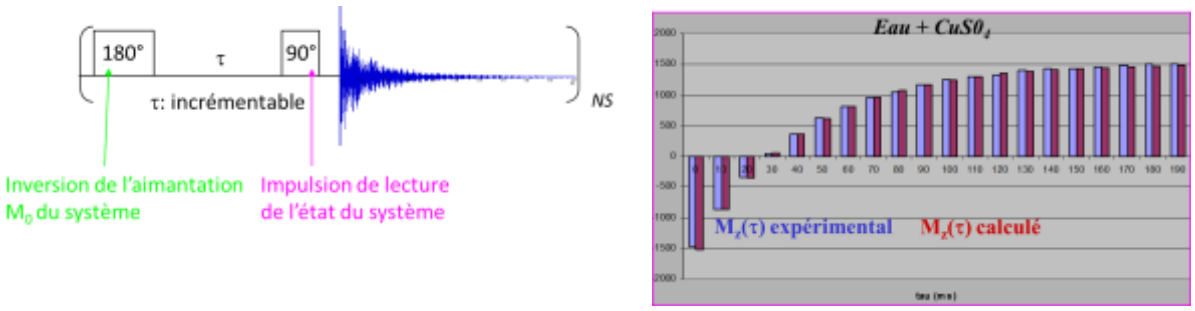


Figure Annexe. 3: à gauche, schéma de l'expérience RMN dite « Inversion-Récupération ». A droite, allure de la courbe issue des mesures de l'expérience dans le cas d'un échantillon standard constitué d'eau et de sulfate de cuivre (II) pour lequel τ=25ms *i.e* T_1=25/ln2=36ms.

II-A-4) Evaluation de l'erreur de mesure et tests paramétriques de validation de séries de données

- Table de Student

Pour un ensemble de N mesures notées xi, i=1 à N,
Calculer la moyenne arithmétique $\bar{x}$, *i.e* la meilleure estimation de l'espérance de la mesure

1. Calculer la variance estimée $v = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{N-1}$ de l'ensemble de mesures
2. Calculer l'écart-type estimé $s = \sqrt{v}$ de l'ensemble de mesures
3. Calculer l'incertitude-type $\frac{s}{\sqrt{N}}$ de l'ensemble de mesures
4. Choisir la valeur de l'intervalle de confiance. Pour un intervalle de confiance donné et compte-tenu du nombre de mesures N, dans l'hypothèse d'une distribution normale. Trouver le paramètre de Student *t* dans la table de Student. Pour un intervalle de confiance de 95 %, et N=5 mesures le paramètre de Student est 2.776
5. Calculer l'incertitude élargie $t.\frac{s}{\sqrt{N}}$; L'incertitude élargie est donc dans nos cas $2.776\frac{s}{\sqrt{N}}$
6. Donner le résultat final sous la forme : $\bar{x} \pm t.\frac{s}{\sqrt{N}}$
7. S'il existe plusieurs sources d'erreurs, combiner les variances estimées adéquates pour définir la variance estimée finale

- Test de Fisher-Snédécor

Ce test permet de comparer des séries de mesures. Il est nécessaire de comparer d'abord les variances estimées des séries de mesures, notées v_i, puis leurs moyennes arithmétiques pour définir leur concordance.

Soient deux séries de mesures, notées respectivement xi, i=1 à N1, et yi, i=1 à N2.

1. Calculer $F_{exp} = \frac{v_1}{v_2}$, les séries 1 et 2 étant identifiées en sorte que $F_{exp} > 1$
2. Trouver dans la table de Snédécor le paramètre F_{tab} tabulé pour un facteur de confiance donné. Lorsque N1=N2=5, à 95 % de confiance $F_{tab} = 6.39$
3. Si $F_{tab} > F_{exp}$, les variances sont dites similaires, il n'y a pas de différences significatives entre les deux distributions expérimentales

1. Calculer l'écart-type groupé, $s_p = \sqrt{\frac{(N1-1)v_1 + (N2-1)v_2}{N1+N2-2}}$
2. Calculer la grandeur $t_{exp} = \frac{|\overline{x_1} - \overline{x_2}|}{s_p} \times \sqrt{\frac{(N1)\times(N2)}{N1+N2}}$
3. Identifier dans la table de Student le paramètre de Student tabulé t_{tab} pour un facteur de confiance donné à N1+N2-2 degrés de liberté. Pour un facteur de confiance de 95 % dans nos cas $t_{tab} = 2.306$
4. Les moyennes ne sont pas significativement différentes si $t_{exp} < t_{tab}$

- Test de Dixon

Pour un ensemble de N mesures notées xi, i=1 à N,

1. Classer les valeurs xi dans l'ordre croissant, de $(x_i)_{min}$ à $(x_i)_{max}$
2. Définir la valeur qui paraît douteuse ou aberrante $(x_i)_{discutée}$
3. Calculer le paramètre de Dixon pour cette valeur discutée :

$$Q = \left| \frac{(x_i)_{discutée} - (x_i)_{la\ plus\ proche\ de\ la\ valeurdiscutée}}{(x_i)_{min} - (x_i)_{max}} \right|$$

4. Identifier dans la table de Dixon, le paramètre de Dixon tabulé pour N mesures pour un intervalle de confiance donné : si $Q > Q_{tabulée}$, la valeur discutée est rejetée comme étant douteuse ou aberrante

II-A-5) La séquence WATERGATE (WATER-suppression by GrAdient-Tailored Excitation)

- p27, pl18 et d19 désignent respectivement la durée d'impulsion associée à un angle de 90 degrés pour une atténuation pl18 inclus dans le bloc W5, et le délai binomial qui permet de définir les signaux qui vont subir la même suppression que le signal « on resonance ». Dans nos expériences, d19 est égale à l'inverse de la largeur spectrale, c'est le niveau de puissance amené pour l'expérience par le canal f1.

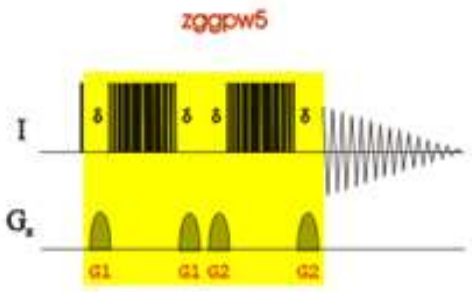


Figure Annexe. 4 : Figure extraite de http://triton.iqfr.csic.es/guide/eNMR/eNMRblock/watergate3.html

Description du bloc W5, à l'origine de la séquence WATERGATE

50u UNBLKGRAD

p16:gp1

d16 pl18:f1

p27*0.087 ph3

d19*2

p27*0.206 ph3

d19*2

p27*0.413 ph3

d19*2

p27*0.778 ph3

d19*2

p27*1.491 ph3

d19*2

p27*1.491 ph4

d19*2

p27*0.778 ph4

d19*2

p27*0.413 ph4

d19*2

p27*0.206 ph4

d19*2

p27*0.087 ph4

50u

p16:gp1

d16

50u

p16:gp2

d16

p27*0.087 ph5

d19*2

p27*0.206 ph5

d19*2

p27*0.413 ph5

d19*2

p27*0.778 ph5

d19*2

p27*1.491 ph5

d19*2

p27*1.491 ph6

d19*2

p27*0.778 ph6

d19*2

p27*0.413 ph6

d19*2

p27*0.206 ph6

d19*2

p27*0.087 ph6

46u

p16:gp2

d16

4u BLKGRAD

II-A-6) La séquence DOSY (Diffusion-Ordered SpectroscopY)

Expérience DOSY : identification des signaux RMN d'un mélange sur la base de la différence de diffusion translationnelle des constituants du mélange

Les molécules en fonction de leur taille, de leur forme et de leur poids moléculaire, dans un solvant isotrope de viscosité η donnée, possèdent, en plus de leur mouvement de rotation moléculaire ou mouvement Brownien, un mouvement de diffusion translationnelle qui leur est propre. Cette vitesse de diffusion translationnelle est caractérisée par une grandeur dite coefficient d'auto-diffusion translationnelle D.

Le modèle le plus simple décrivant cette grandeur est l'équation de Stockes-Einstein $D = \frac{k_B T}{6\pi\eta\, R}$. Dans cette équation k_B est la constante de Boltzmann, T la température en Kelvin, et R le rayon hydrodynamique de la molécule (rayon de la molécule d'intérêt en interaction avec le solvant, dans l'hypothèse où la molécule est considérée de dimensions sphériques).

Afin de mesurer ce coefficient, l'expérience DOSY peut être utilisée. La séquence d'impulsions associée à cette expérience est relativement complexe ; toutefois, sa quintessence peut être comprise à l'aide du schéma simplifié de la **Figure Annexe.5**. Dans cette séquence d'impulsion, sont impliquées des impulsions non sélectives schématisées par des rectangles pleins (respectivement 90° et 180°) et des impulsions de gradients de champ magnétique g . Selon l'équation de Larmor, la fréquence de résonance d'un spin i υ_i dépend du champ magnétique qu'il ressent : $\upsilon_i = \frac{\gamma_i}{2\pi} B_0(1-\sigma_i) = \frac{\gamma_i}{2\pi} B_{eff,i}$, où B_0 est le champ magnétique statique homogène du spectromètre, γ_i le rapport magnétogyrique du spin i, et σ_i son écran électronique. Si le champ magnétique ressenti par le spin i n'est plus spatialement homogène, mais au contraire dépend de la position (x,y,z) du spin i, alors il est possible d'encoder l'information spatiale d'une molécule donnée en fonction de la fréquence de résonance des spins i qui la constituent : $\upsilon_i(x,y,z) = \frac{\gamma_i}{2\pi} B_{eff,i}(x,y,z)$. Autrement dit, il est possible de connaître la position d'une molécule en connaissant la fréquence de résonance de ses spins. En pratique, pour contrôler la dépendance du champ magnétique effectivement ressenti en fonction de la position du spin i, un gradient de champ magnétique unidirectionnel (en général selon l'axe z) d'amplitude g est appliqué pendant une durée δ. Ainsi, pour un spin i, $\upsilon_i(z) = \frac{\gamma_i}{2\pi}(B_0 + g \cdot z)(1-\sigma_i)$ après la première impulsion de gradient, ou dans le repère tournant du spin i comme représenté sur la figure $\upsilon_i'(z) = \frac{\gamma_i}{2\pi}(g \cdot z)$. Le déphasage associé pour un spin i à la cote z après la période τ est $\Phi_i(\tau) = \frac{\gamma_i}{2\pi}(g \cdot z \cdot \delta)$. Nous pouvons raisonner dans le repère tournant plus simplement car l'impulsion 180° située au milieu de la période d'évolution (écho de spins) permet de refocaliser les évolutions ou déphasages liées aux déplacements chimiques et couplages scalaires au bout du temps 2 τ, en inversant le sens de précession des spins, et donc éliminer leur contribution pendant la durée Δ. Pendant la durée Δ chaque molécule va avoir loisir de diffuser translationnellement en fonction de son coefficient d'auto-diffusion D. A la fin de cette durée, chaque molécule a parcouru une distance proportionnelle à sa vitesse de diffusion selon z *i.e* à D. L'application du même gradient après la durée Δ va permettre de rephaser tous les spins qui n'ont pas diffusés, *i.e* demeurés à la même cote

z, générant pour eux un signal RMN maximal ($\Phi_i(2\tau) = \frac{\gamma_i}{2\pi}(g \cdot z \cdot \delta - g \cdot z \cdot \delta)$). Ceux en revanche qui ont diffusés, *i.e* déplacés à une cote z', ne sont que partiellement rephasés ($\Phi_i(2\tau) = \frac{\gamma_i}{2\pi}(g \cdot z \cdot \delta - g \cdot z' \cdot \delta)$), et leur signal RMN résultant donc atténué.

Ainsi pour une valeur g donnée, seules les molécules non affectées par la diffusion vont contribuer au signal RMN final détecté : on obtient *in fine*, un signal RMN dont l'atténuation ne dépend que de la diffusion des molécules (sous réserve que les valeurs de T_2 sont identiques ou similaires pour tous les signaux ce qui est en général le cas en milieu isotrope pour des molécules de tailles similaires). La mesure des coefficients de diffusion est réalisée en enregistrant le signal RMN en faisant varier de manière monotone la valeur du gradient g . L'intégrale des signaux mesurés après transformation de Fourier sur le spectre RMN suit l'équation $I(\delta, \Delta) \propto exp\left(\frac{-2\tau}{T_2}\right) \cdot exp\left(-\delta^2\gamma^2 g_0^2 D\left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right)$. Un exemple est présenté sur la **Figure Annexe.6** pour un mélange d'un mélange constitué équimolaire d'acétate d'éthyle, et de méthanol dans de l'eau deutérée (concentrations 10 mM).

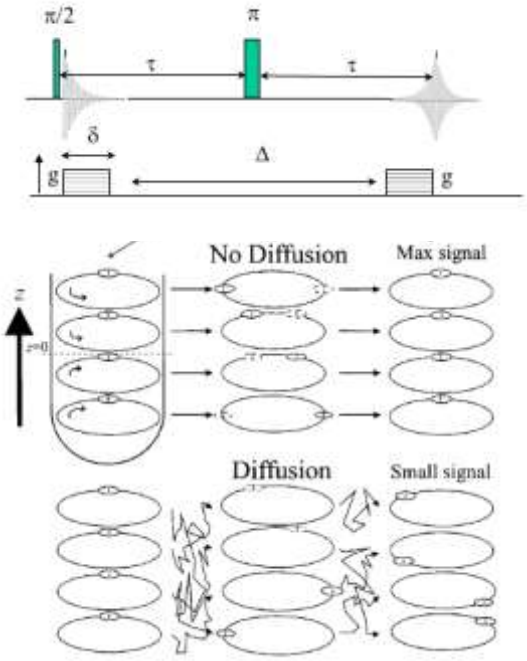


Figure Annexe.5 : en haut : Echo de spins en présence de champ magnétique inhomogène (PFG-SE) ; en bas : évolution schématisée d'un ensemble de spins subissant la séquence PFG-SE sans tenir compte puis en tenant compte du phénomène de diffusion translationnel (extrait de W.S. Price, *Conc. Magn. Reson. A*, (1997), 299-336)

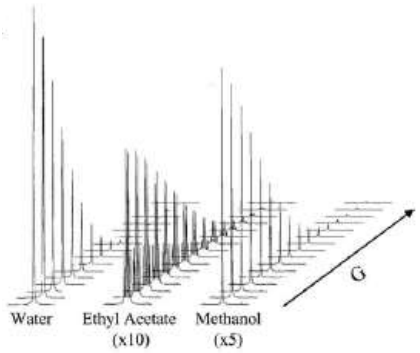


Figure Annexe. 6 : Atténuation du signal RMN mesuré pour des valeurs de gradients G variables d'un mélange équimolaire constitué d'acétate d'éthyle, et de méthanol dans de l'eau deutérée. (Extrait de K. E. Price, L. H. Lucas, C. K. Larive, *Anal Bioanal Chem* (2004), 378, 1405–1407).

Le signal RMN mesuré pour différentes valeurs de g , pour des valeurs de δ et Δ données vont permettent d'obtenir après transformations de Fourier et Laplace une carte dite carte DOSY, où les signaux appartenant à une même molécule sont repérés par le même coefficient d'autodiffusion, comme la diffusion translationnelle est un mouvement d'ensemble. En dimension horizontale de la carte on retrouve le spectre RMN 1D du mélange, et en dimension verticale la distribution des coefficients de diffusion.

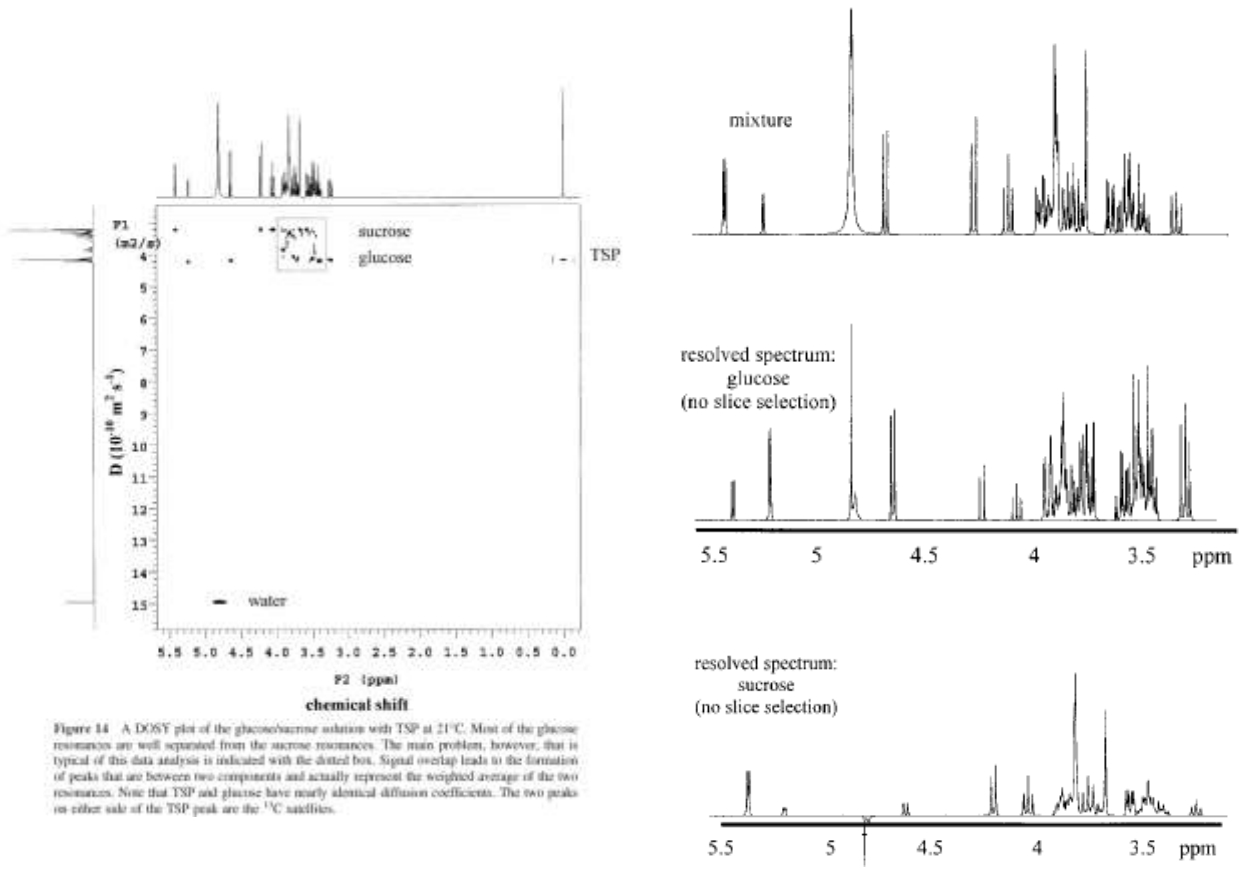


Figure Annexe. 7 : carte DOSY d'un mélange de sucrose et glucose dans de l'eau deutérée avec du TSP (acide triméthylsilylpropanoïque) extraite de B. Antalek, *Concepts Magn Reson* (2002), 14: 225–258.

Lorsque les proportions des constituants du mélange sont très déséquilibrées, comme dans notre cas où l'eau est majoritaire par rapport aux autres constituants de l'échantillon RMN, la séquence DOSY doit être modifiée de manière à insérer un module WATERGATE permettant la suppression de signal d'eau. En effet, le détecteur du signal RMN est saturé par le signal de l'eau et limite la mesure convenable des autres signaux même pour des grandes valeurs de *g*, réduisant la sensibilité et la résolution de la carte DOSY, ainsi que son exploitation ultérieure.

Le principe de l'encodage spatial en fréquence a d'autres applications, notamment en IRM où l'encodage est réalisé dans les trois directions de l'espace afin de déterminer la position de chaque molécule d'eau de l'objet considéré.

université PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE
Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes

Titre : Développement de catalyseurs d'oxydation bio-inspirés pour une chimie plus respectueuse de l'environnement

Mots clés : Chimie bioinorganique, polymère, catalyse, chimie bio-inspiré

Résumé : L'un des principaux verrous scientifique rencontré au cours du développement de catalyseurs d'oxydation bio-inspirés concerne l'étape de réduction du métal pour permettre l'activation du dioxygène. Pour essayer de lever ce verrou, nous avons développé un système macromoléculaire composé d'un polymère hydrosoluble dans lequel deux types de cofacteurs sont incorporés ; (1) des cofacteurs redox capables de collecter des électrons issus d'un réducteur en solution, et (2) des cofacteurs catalytiques capables d'activer le dioxygène. De façon à permettre l'incorporation de ces cofacteurs au sein du polymère, ce dernier a été modifié avec différents groupement chimiques qui ont étés quantifiés par RMN du proton dans l'eau. Par ailleurs, la synthèse de différents complexes métalliques, connus pour être de bons catalyseurs d'oxydation, tels que des métalloporphyrines ou des complexes mononucléaire et binucléaire de fer et de cuivre, a été réalisée.

Ces catalyseurs ont d'abord été étudiés avec H_2O_2 dans l'eau en présence ou en absence de polymère. En parallèle, l'incorporation de la FMN par interactions électrostatiques au sein du polymère a permis de générer un système capable de collecter les électrons de NADH en solution. Cette réduction s'est avérée 4 000 fois plus rapide que la réduction sans polymère modifié. Cette réductase artificielle (FMN+ PEI modifié) a ensuite été démontrée capable de réduire très efficacement les porphyrines de manganèse (III) ainsi que d'autres complexes métalliques. Au cours de l'étude, la capacité de ce système à séparer les électrons provenant de NADH a également été mis en avant. Finalement, cette réductase artificielle a été associée à différents catalyseurs métalliques afin d'étudier leur activité sur la réaction d'oxydation du thioanisole, ou d'autres substrats, par activation réductrice du dioxygène

Title : Development of bio-inspired oxidation catalysts for greener environmental chemistry

Keywords : Bioinorganic chemistry , polymer, catalyst , bio-inspired chemistry

Abstract : A major scientific lock encountered during the development of bio-inspired oxidation catalysts is the metal reduction step to allow activation of dioxygen. In this optic, we have developped a macromolecular system composed of a water-soluble polymer in which two kinds of cofactors are incorporated; (1) redox cofactors capable of collecting electrons from a reducing agent in solution, and (2) catalytic cofactors capable of activating oxygen. In order to allow the incorporation of these co-factors within the polymer, the latter one has been modified by various chemical groups which have been quantified by proton NMR in water. Furthermore, the synthesis of various metal complexes, known as good oxidation catalysts, such as metalloporphyrins or mononuclear and dinuclear complexes of iron and copper was performed.

These catalysts were first studied with H_2O_2 in water in the presence or the absence of polymer. In parallel, the incorporation of FMN by electrostatic interactions within the polymer has generated a system capable of collecting the electrons of NADH in solution. This reduction was found 4 000 times faster than the reduction without modified polymer. This artificial reductase (FMN + PEI modified) was then demonstrated to very efficiently reduce manganese porphyrins as well as other metal complexes. During this study, the ability of the system to split electron pairs collected from NADH has also been demonstrated. Finally, this artificial reductase has been associated with various metal catalysts in order to study their catalytic activity for various oxidation reaction using dioxygen.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France