



HAL
open science

Design de nouvelles métalloenzymes artificielles

Laurianne Rondot

► **To cite this version:**

Laurianne Rondot. Design de nouvelles métalloenzymes artificielles. Chimie inorganique. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV056 . tel-01684751

HAL Id: tel-01684751

<https://theses.hal.science/tel-01684751>

Submitted on 15 Jan 2018

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie inorganique et bioinorganique**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« **Laurianne RONDOT** »

Thèse dirigée par « **Stéphane Ménage** » et
codirigée par « **Caroline Marchi-Delapierre** »

préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des
Métaux**
dans l'École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant

Design de nouvelles métalloenzymes artificielles

Thèse soutenue publiquement le « **16 décembre 2016** »,
devant le jury composé de :

Mme Carole DUBOC

DR CNRS Grenoble, Présidente du jury

Mme Jalila SIMAAN

DR CNRS Marseille, Rapporteur

Mme Yasmina MEKMOUCHE

CR CNRS Marseille, Examineur

M. Jean marc VINCENT

DR CNRS Talence, rôle Rapporteur

M. Stéphane, MENAGE

DR CNRS Grenoble, Directeur de thèse

Mme, Caroline Marchi-Delapierre

MDC Université de Grenoble, Co-Directrice de thèse



S'investir dans un projet de thèse est une grande aventure qui permet de s'épanouir scientifiquement et personnellement. Mais tout cela ne se fait pas sans effort et sans accompagnement. C'est la raison pour laquelle je ne peux oublier de mentionner l'aide que j'ai reçue au cours de ces quatre ans de thèse. Ces manifestations ont été si nombreuses qu'il m'est difficile de ne pas oublier quelqu'un...je m'en excuse d'avance.

Tout d'abord, je souhaite remercier mon directeur de thèse Stéphane Ménage pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire CMB ainsi que dans l'équipe BioCE. Son encadrement de tous les jours, ses remarques constructives et nos discussions scientifiques (hebdomadaires et autres) ont été autant d'atout pour l'avancement de mes travaux. Je n'oublie pas qu'il m'a guidée dans le monde de la chimie inorganique moi qui me destinais initialement à la chimie organique. Merci pour son exigence et ses « Alors ? Alors ? » qui m'ont sans nul doute poussée à dépasser mes limites encore et encore. J'en ressors absolument grandie professionnellement.

Je souhaite sincèrement remercier Caroline Marchi-Delapierre pour son accompagnement au quotidien. Merci pour le temps qu'elle a mis (sans compter) à ma disposition pour débriefer avec une grande pédagogie sur les difficultés rencontrées au cours de mes travaux de thèse. Je n'oublierais pas tous ces précieux conseils, l'écoute dont elle a fait preuve, sa gentillesse à toute épreuve, ses encouragements et sa bienveillance qui m'ont permis de persévérer faces aux difficultés ou au contraire d'avancer sans difficultés. Et enfin, je ne saurais pas la remercier assez pour le soutien et l'aide dont j'ai bénéficié au cours de ces derniers mois. Je n'aurai pas pu souhaiter meilleure co-directrice autant scientifiquement qu'humainement...infiniment merci, merci ; merci !!.

Je voudrais chaleureusement remercier Christine Cavazza qui sans étiquette administrative d'encadrante, m'a accompagnée scientifiquement tout au long de mes travaux. Elle est sans nul doute celle qui a éclairé mon chemin vers le milieu de la biochimie, et introduit à l'art de la cristallographie. Je lui suis reconnaissante pour l'investissement dont elle a fait preuve sur chacun de mes projets de métalloenzymes artificielles, et les heures passées à l'ESRF. Merci en prime pour toutes nos petites discussions hors projet de thèse toujours dans la bonne humeur et la générosité. Son arrivée au laboratoire est une des clés importantes dans l'avancée de mes travaux !!!
Merci !!

À tous les trois, qui se sont complétés à la perfection, je souhaiterais leur dire combien j'ai appris à leurs côtés ; les remercier de m'avoir formée à différentes méthodes, techniques ou aspect de l'interface chimie-biologie. Leur exprimer ma gratitude pour la confiance qu'ils m'ont accordée, pour la liberté et l'autonomie dont j'ai pu bénéficier sans jamais me sentir seule.

Je souhaiterais également remercier la région Rhône-Alpes pour le financement de mes trois premières années de thèses.

Je remercie mon jury de thèse pour l'honneur qu'ils me font en participant à ce jury.

Je voudrais remercier mes collaborateurs, dont Nicolai Burzlaff et son équipe pour la synthèse du complexe $\text{Ru(II)bpza}(\text{CO})_2(\text{Cl})$ ainsi qu' Elisabetta Boeri-Erba pour les études de spectrométrie de masse ESI (ESI-MS) en conditions natives.

Je ne peux pas rédiger mes remerciements sans exprimer ma gratitude à ma stagiaire préférée maintenant devenue doctorante au bel avenir. Merci pour tout son travail et son implication à mes côtés tout au long de ses deux stages de master! Ces mois passés à l'accompagner ont été un vrai bonheur et j'ai pu observer au jour le jour sa persévérance, sa volonté et son épanouissement vers la future doctorante qu'elle est devenue. Finalement, les rôles sont inversés puisque c'est elle qui m'a accompagné sur le projet hybride à centre ruthénium. Sans son travail ce projet ne serait pas ce dont il est devenu !! Je n'oublie pas sa bonne humeur quotidienne et ses valeurs-important dans notre amitié ! « twist again » ne veut pas te lâcher ;)

Je souhaiterais remercier Adeline Jorge Robin pour m'avoir initiée aux joies de la chromatographie gazeuse, ainsi qu'aux subtilités de la maintenance et du nettoyage de source en compagnie de Mr Plaetevoet !! Maintenant je parle couramment le langage de la GC d'humeur chafouine. Je n'oublie pas non plus son implication à la paillasse dans mon projet de thèse ainsi que toutes nos petites ou grandes discussions personnelles. (Et elles furent nombreuses !!!). Un petit électron libre qui devrait prendre plus confiance ☺.

Je voudrais remercier Marina Iannello qui à mi-thèse a travaillé sans relâche pour décupler le stock d'hybride dont je disposais (ainsi que de cristaux correspondants !!!)...assurément la Lucky Luke dans le domaine. Le tout assorti d'une gentillesse, et d'une joie imparable et communicative !

Merci également à Jen toujours disponible pour m'aider dans la caractérisation et la mesure du CO₂. Je n'oublie pas ses conseils avisés, ses encouragements et son caractère qui font d'elle une belle personne !

Je voudrais remercier Olivier Hamelin, mon tuteur pédagogique dans le cadre du label RES. Ses conseils et accompagnements dans mes préparations de TP/TD ont été un levier dans le développement de mes outils pédagogiques. Merci beaucoup !!!!!

Un merci général s'impose en ce qui concerne l'étage de chimie (permanent et non-permanent) pour l'accueil chaleureux et pour les nombreuses discussions scientifiques. J'ai toujours pu trouver quelqu'un pour répondre à mes questions !!! ou tout simplement pour plaisanter le temps d'une catalyse ☺. Il en est de même en ce qui concerne l'étage de biologie.

Je souhaiterais adresser mes remerciements à mes colocataires de bureau, pour toutes les réflexions communes sur nos projets respectifs, le tout dans une ambiance légère (oui nous avons aussi bien ri !!!). Un merci particulier à Charlène et Lulu...les filles je crois que vous savez déjà tout !!!!

Enfin, un immense merci à mes proches ! Je pense à ma famille, mes grands-parents, mes parents, mes frères et belles sœur, mes neveux et nièces et ceux qui sont à venir ! Merci pour votre soutien inconditionnel et votre amour. Pour finir, merci Jérémie, mon conjoint sans qui tout ceci n'aurait pas été possible. Ce manuscrit vous est dédié.

Table des matières

Introduction générale	13
Chapitre 1.....	16
A) Les métalloenzymes artificielles	17
I) Concept général.....	17
II) Stratégies de développement.....	20
(1) Stratégies biochimiques.....	21
(2) Stratégies chimiques.....	32
III) Choix des deux acteurs.....	45
(1) Choix du complexe métallique.....	45
(2) Choix de la biomolécule.....	46
B) Oxydation par les métalloenzymes artificielles.....	48
I) Sulfoxydation	48
(1) Structures protéiques Myoglobine	49
(2) Structures protéiques streptavidine	52
(3) Structures protéiques BSA/HSA	57
(4) Structure protéique Xylanase	60
(5) Structure protéique NikA	61
(6) Conclusion.....	63
II) Epoxydation	64
(1) Structure protéique Xylanase	64
(2) Structure protéique Anhydrase carbonique	66
(3) Conclusion.....	68
III) Dihydroxylation.....	69
(1) Structure protéique BSA	69
(2) Structure protéique Streptavidine	70
(3) conclusion	71
IV) Hydroxylation aromatique	71
VI) Conclusion.....	77
C) Bibliographie	79
Chapitre 2.....	84
A) Introduction	85
I) Choix de la biomolécule	86

II) Choix du complexe inorganique	87
B) Synthèse et caractérisation de l'hybride Rubpza-NikA	88
I) Synthèse et caractérisation du complexe Rubpza	88
(1) Diffraction des rayons X.....	88
(2) Spectroscopie infrarouge	90
(3) Spectroscopie infrarouge en solution aqueuse.....	92
(4) Étude en spectrométrie de masse de Rubpza en solution aqueuse	93
II) Synthèse et caractérisation de l'hybride Rubpza-NikA	93
(1) Préparation.....	93
(2) Dosages.....	94
(3) ICP-AES spectrométrie par torche à plasma.....	95
(4) Dichroïsme circulaire	95
(5) Constante d'affinité	97
(6) Spectroscopie infrarouge	99
(7) Spectrométrie de masse.....	101
(8) Cristallogénèse	102
(9) Étude de la structure cristallographique	105
(10) Conclusion	107
C) Réactivité de l'hybride Rubpza-NikA	107
I) Définition des conditions catalytiques	107
II) Premiers résultats.....	110
III) Régiosélectivité.....	115
IV) Optimisation de l'oxydant	116
V) <i>Optimisation du rapport catalyseur / substrat / oxydant / chlorure</i>	118
VI) Catalyse d'oxydation du <i>trans et Cis-β</i> - méthylstyrène	119
VII) Stabilité et efficacité.....	124
VIII) Diastéréosélectivité	128
IX) Vers une catalyse énantiosélective.	131
X) Mécanisme	133
(1) Mécanisme en 2 étapes.....	134
(2) Espèce oxydante.....	136
XI) Conclusion	138
D) Bibliographie.....	139

Chapitre 3 : Des oxygénases artificielles à base de fer	142
A) Projet.....	143
B) Synthèse des ligands	146
I) Synthèse de l'acide <i>N</i> -(2, 6-diméthylbenzyl)- <i>N'</i> -(2-hydroxybenzyl)- <i>N</i> , <i>N'</i> -éthylènediaminediacétique : L2	146
(1) Étape n°1.....	146
(2) Étape n°2.....	147
(3) Étape n°3.....	148
II) Synthèse de l'acide <i>N</i> -(méthyl)- <i>N'</i> -(2-hydroxybenzyl)- <i>N</i> , <i>N'</i> -éthylènediaminediacétique : L1	149
III) Synthèse de l'acide <i>N</i> -(2-thiométhylbenzyl)- <i>N'</i> -(2-hydroxybenzyl)- <i>N</i> , <i>N'</i> -éthylènediaminediacétique : L3	150
IV) Conclusion :.....	150
C) Synthèse des complexes	150
I) Caractérisation des complexes FeL1 , FeL2 , FeL3	151
(1) Caractérisation Infrarouge	151
(2) Spectrométrie de masse	152
(3) Spectroscopie UV-visible.....	153
(4) Conclusion.....	154
II) Réactivité de FeLn en solution aqueuse en présence du couple O ₂ / DTT sans substrat exogène.....	155
(1) Études par spectroscopie UV-visible.	156
(2) Études par spectrométrie de masse	160
D) Préparation des hybrides et caractérisation.....	161
I) Constante de dissociation.....	162
II) Caractérisation des Hybrides par spectroscopie UV-visible	163
III) Caractérisation des hybrides par cristallographie aux rayons X.	165
E) Réactivité des hybrides FeLn-NikA	167
I) Réactivité des hybrides FeLn-NikA en solution aqueuse en présence du couple O ₂ / DTT sans substrat exogène.....	167
(1) Études par spectroscopie UV-visible.....	167
(2) Études <i>in crystallo</i> de la réactivité des hybrides FeL3-NikA	169
II) Réactivité de FeLn-NikA en solution aqueuse en présence du couple O ₂ / DTT et en présence d'un substrat exogène.....	174
(1) Catalyse d'oxydation d'alcène	176

(2) Catalyse d'oxydation de thioéthers aromatiques	177
(3) Conclusion	178
III) Optimisation du système catalytique.....	179
(1) Catalyse d'oxydation du cinnamate de méthyle	179
(2) Activation de l'oxygène moléculaire en présence d'autres réducteurs : TCEP et ascorbate de sodium	181
(3) Réduction du catalyseur par un système photocatalytique.....	184
(4) Stabilité des catalyseurs hybrides	193
(5) Apport de la protéine	197
(6) Limites du système : dégradation des HAP ?	199
IV) Conclusion	201
F) Conclusion	201
G) Bibliographie.....	203
Conclusion générale	205
Partie expérimentale.....	207
A) Techniques expérimentales.....	208
I) ICP-AES	208
II) Cristallisation de l'hybride Rubpza-Nika	208
B) Synthèse	209
I) Synthèses des ligands L1 , L2 et L3	209
(1) <i>N</i> -(2-hydroxybenzyl)- <i>N,N'</i> -éthylènediamine	209
(2) <i>N</i> -(2-hydroxybenzyl)- <i>N, N'</i> -éthylènediamine	210
(3) <i>N</i> -(2-hydroxybenzyl)- <i>N, N'</i> -éthylènediamine	211
(4) L2 Acide <i>N</i> -(2,6-Diméthylbenzyl)- <i>N'</i> -(2-hydroxybenzyl)- <i>N,N'</i> -éthylène-diaminediacétique.....	212
II) Mode opératoire type de synthèse des complexes <i>FeL1</i> , <i>FeL2</i> , <i>FeL3</i>	212
III) Mode opératoire type de synthèse des hybrides <i>FeL1</i> -Nika, <i>FeL2</i> -Nika et <i>FeL3</i> -Nika	213
IV) Caractérisation des hybrides.	213
(1) Dosage de la protéine Nika	214
(2) Dosage du fer :.....	214
V) Expérience type de test de catalyse d'oxydation par activation d'oxygène par <i>FeLn</i> -Nika en présence de DTT/TCEP ou ascorbate de sodium en tant qu'agent réducteur.	215
VI) Expérience type de test de photodégradation par activation d'oxygène par <i>FeLn</i> -Nika	215

VII) Expérience type de test de catalyse d'oxydation du styrène ou des <i>trans</i> - β -méthylstyrène et <i>cis</i> - β -méthylstyrène par Rub pza -NikA en présence de $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ en tant qu'oxydant.	216
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Introduction générale

Les avancées technologiques réalisées depuis la révolution industrielle du siècle dernier sont considérables. Cependant, elles furent en partie réalisées au détriment du respect de l'environnement en rejetant de nombreux polluants. Ceci a pu engendrer, entre autres, trou dans couche d'ozone, réchauffement climatique, chute de la biodiversité, pluies acides, problèmes de santé, etc. Aujourd'hui la prise de conscience de l'impact des activités industrielles sur l'environnement n'a jamais été aussi grande et impose aux entreprises de nouvelles contraintes environnementales. C'est dans ce contexte qu'est né le concept de chimie verte, qui consiste à développer des procédés plus respectueux de l'environnement. Ce concept est soutenu par douze principes, préconisés par Anastase et Warner, tels que l'économie d'atomes, l'utilisation de solvants et de matières premières inoffensives, la réduction de consommation énergétique et matérielle, ou l'utilisation de source renouvelable, etc... Les recherches se sont alors tournées vers une amélioration des procédés industriels en se concentrant sur la conception de réactions alliant efficacité et faible consommation. En abaissant le seuil d'énergie nécessaire pour permettre à la réaction de se produire, et en permettant une économie d'atome, l'emploi de réactions catalysées, apparaît comme une solution idéale.

Un second challenge pour les industries pharmaceutiques réside dans la synthèse de composés énantiopurs. En effet, un principe actif de médicament sous ses deux formes énantiomères peut présenter un risque potentiel pour le patient. Dans le meilleur des cas l'un des deux énantiomère est inactif. On peut citer la vitamine C dont c'est le cas sous sa forme acide ascorbique (*D*). Dans ce cas, cela n'engendre que des contraintes économiques. Cependant, dans le pire des cas, l'un des deux énantiomères peut entraîner des effets indésirables. C'est notamment le cas du salbutamol un

bronchodilatateur, dont l'énantiomère (*S*) engendre des allergies accompagné de bronchospasme. La catalyse énantiosélective devient alors un outil indispensable. Celle-ci a considérablement été développée depuis 20 ans (illustrée par le prix Nobel de chimie 2001 pour les travaux de William S. Knowles et Ryoji Noyori réalisés sur les réactions d'hydrogénation catalysées par chiralité) mais se heurte encore à de nombreux verrous technologiques. En effet, beaucoup de catalyses chimiques asymétriques nécessitent l'utilisation de métaux toxiques (osmium, titane...) ainsi qu'une quantité non négligeable de solvants organiques polluants. En parallèle, la biocatalyse s'est révélée être un outil de choix pour la synthèse de composés énantiopurs grâce à l'utilisation d'enzymes purifiées ou d'organismes entiers. Néanmoins, si celles-ci présentent l'avantage d'une catalyse plus douce en milieu aqueux, elles possèdent certains inconvénients tels qu'une haute spécificité pour leurs substrats, empêchant une certaine diversité dans les essais de catalyse. Aujourd'hui, l'une des activités de recherche de l'équipe BioCE du LCBM réside dans le développement de nouveaux biocatalyseurs rassemblant les mondes de la catalyse inorganique et de la biocatalyse : les Métalloenzymes artificielles. Ces dernières permettent notamment la mise au point de procédés catalytiques permettant de remplacer les solvants organiques par de l'eau et en employant les oxydants les plus propres comme par exemple l'oxygène moléculaire. À ce jour, les seuls catalyseurs capables de réaliser l'activation de O₂ sont des métalloenzymes : les oxygénases. En effet, elles offrent la possibilité de compartimenter les réactions au sein de la protéine, permettant ainsi de réguler l'activité de l'espèce active. Cette propriété a alors mené l'équipe BioCE à concevoir de nouveaux catalyseurs mimant leur activité : les oxygénases artificielles, sujet principal de ce travail.

Ce manuscrit s'articulera en trois parties. Le premier chapitre est une introduction bibliographique sur les métalloenzymes artificielles présentant les différentes techniques de conception de ces hybrides catalytiques. De même, un intérêt

particulier sera porté aux métalloenzymes artificielles impliquées dans des catalyses de réaction d'oxydation. Les deux chapitres suivant de ce manuscrit présenteront les travaux effectués au cours de mon doctorat concernant la conception de deux nouvelles oxygénases artificielles et le développement de leurs procédés catalytiques. Ceux-ci seront regroupés sous deux thématiques : une partie de ces travaux sera axé sur la catalyse d'oxydation d'alcène aromatique impliquant une protéine bactérienne NikA et un complexe de ruthénium II. La seconde partie de ces travaux de thèse s'inscrit dans la thématique d'oxydation par activation d'oxygène moléculaire portée par la conception de métalloenzymes artificielles à centre ferrique dans une protéine NikA. La production et la caractérisation de chacun de ces hybrides catalytiques seront présentées au même titre que l'étude de leurs propriétés catalytiques respectives.

Chapitre 1

A) Les métalloenzymes artificielles

À l'ère du développement d'une chimie durable, la catalyse est une clé essentielle dans la production de nombreux composés chimiques.¹ À ce jour, les procédés catalytiques sont d'ailleurs abondants, et peuvent être classés en trois catégories: homogène, hétérogène et biocatalyse. Nous ne comparerons ici que la catalyse homogène et la biocatalyse. La première catégorie est menée par des catalyseurs à métaux de transitions coordonnés à des ligands comportant des hétéroatomes (O, N, S).² Suivant les procédés, ils peuvent alors catalyser une grande diversité de réactions telles que les couplages de liaisons C-C, la fonctionnalisation de liaisons C-H, les réactions de polymérisation et les métathèses.³ Ce genre de catalyseurs permet aussi, souvent, une grande souplesse en ce qui concerne le panel de substrats. De plus, en fonction de la disposition spatiale du ligand ou de son encombrement stérique, les complexes de coordination peuvent induire une chimio- et une stéréo-sélectivité. Cependant, la seconde sphère de coordination de ces catalyseurs est souvent très difficile à contrôler ce qui peut compromettre l'efficacité de cette sélectivité. La biocatalyse, quant à elle, est dirigée par des enzymes.^{4,6} Elle permet d'atteindre de très hauts degrés d'efficacité catalytique dans des conditions douces. De plus, de par leurs structures complexes, les enzymes présentent un contrôle précis du site actif, et notamment de la seconde sphère de coordination. Ainsi, d'excellents excès énantiomériques peuvent être obtenus par biocatalyse. Toutefois, cette structure parfaitement organisée restreint la plupart du temps une enzyme à un seul type de réaction et à une petite gamme de substrats. Cependant, en comparant les avantages et les inconvénients de ces deux systèmes, il est clair qu'il existe une certaine complémentarité entre eux.

1) Concept général

Il y a déjà plusieurs décennies, une alternative promettant le développement de nouveaux catalyseurs capables d'allier les avantages de la catalyse homogène et de

la biocatalyse a été proposée: ainsi sont nées les « métalloenzymes artificielles ». Aujourd'hui, ces catalyseurs n'en sont plus au stade de la conception, puisqu'on en trouve de nombreux exemples dans la littérature, pour des catalyses de réactions diverses et variées.⁷⁻¹⁹ Il n'est pas rare de voir les métalloenzymes artificielles qualifiées d'hybrides puisqu'elles sont créées sur la base d'un croisement entre la chimie inorganique et la biochimie (Figure 1).

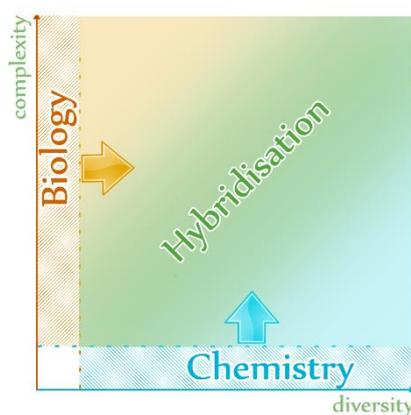


Figure 1. Une comparaison entre la chimie et la biologie selon deux paramètres : complexité et diversité. Figure adaptée de la conférence du Pr J.-M. Lehn « From Matter to Life : Chemistry ?! ».

Ainsi, composés d'un complexe inorganique et d'une structure biomoléculaire (protéine, peptide ou brins d'ADN), ces catalyseurs hybrides possèdent deux sphères de coordination imbriquées (Figure 2).

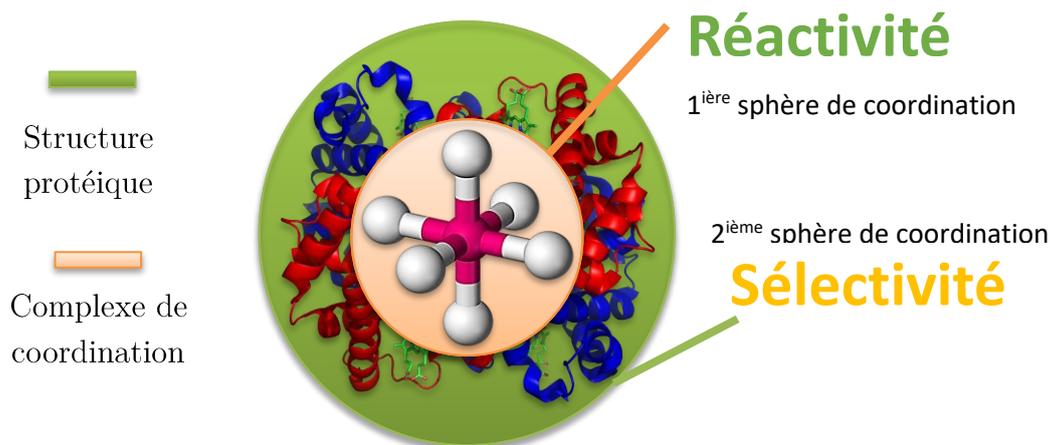


Figure 2. Illustration d'une métalloenzyme artificielle centrée sur le site actif. La première sphère de coordination est représentée en orange et la seconde sphère de coordination en vert.

La première sphère de coordination est formée par le(s) ligand(s) qui chélate(nt) l'ion métallique. À l'image de la catalyse homogène menée par des métaux de transition, elle permet de réguler la nature de l'activité catalytique. La seconde sphère de coordination est majoritairement composée d'acides aminés (a.a.) ou de nucléotides présentant un arrangement structural 3D bien particulier autour du complexe inorganique. Cette fois, contrairement à la catalyse homogène, la seconde sphère de coordination est clairement définie et peut être contrôlée comme nous le verrons au cours de ce chapitre. Les interactions que cette seconde sphère de coordination induit -liaisons hydrogène, interactions hydrophobes ou contraintes stériques- ont pour but de favoriser une approche spécifique du substrat. Ces dernières propriétés assurent alors la sélectivité de la réaction qu'elle soit régio-, chimio- ou énantio-sélective.

Il est aussi important de comprendre que la force de ces catalyseurs hybrides réside précisément dans la séparation de ces propriétés catalytiques en deux sous-unités. Ainsi, si la seconde sphère de coordination induit une sélectivité, les métalloenzymes artificielles disposent néanmoins de plus de souplesse qu'une métalloenzyme naturelle concernant la gamme de substrats qu'elles peuvent transformer. De plus, cette séparation leur permet de disposer d'un avantage certain : leur optimisation peut se faire suivant deux approches ; par mutation dirigée au niveau de la structure

biomoléculaire ou par synthèse chimique au niveau de la structure inorganique. Effectivement, le complexe métallique peut être modifié par un remaniement du ligand ou par un échange d'ion métallique. La modification de la seconde sphère de coordination peut se faire, par exemple mutagenèse dirigée ou par évolution dirigée. L'ensemble de ces modifications permet par exemple de conférer à une protéine très stable une nouvelle réactivité ciblée et efficace. À terme, il est envisageable d'effectuer des réactions enzymatiques inconnues dans la nature.

II) Stratégies de développement

L'origine des métalloenzymes artificielles remonte aux années 50 quand Akabori *et al.* publièrent la création d'un catalyseur d'hydrogénation asymétrique d'azalactones préparé par simple dépôt de chlorure de palladium sur des protéines de fibres de soies appelées fibroïnes (Figure 3).²⁰ Toutefois, les travaux qui seront considérés comme précurseurs dans le développement de métalloenzymes artificielles ne paraîtront que dans les années 70, émanant de deux groupes de recherches différents. En 1976, Kaiser et Yamamura ont transformé une carboxypeptidase en oxydase,²¹ alors qu'en 1978 ce sont Wilson and Whitesides qui décrivent le premier développement d'un catalyseur hybride isolé et caractérisé à centre rhodium-diphosphine (I) en partant d'une protéine dépourvue de toute propriété catalytique (Figure 3).²² Pour ce faire, l'introduction ciblée d'un complexe inorganique de synthèse dans la protéine avidine a été réalisée suivant la stratégie dite du «cheval de Troie» que nous développerons un peu plus loin.

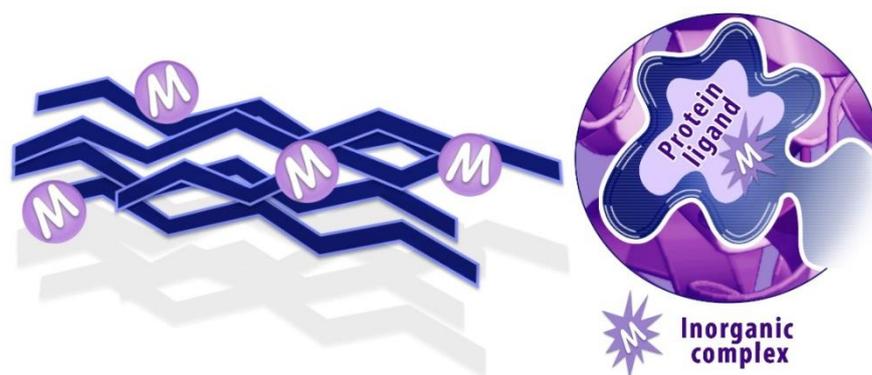


Figure 3. Les Prémices des Métalloenzymes artificielles : gauche : chlorure de palladium déposé sur des fibroïnes formant un catalyseur d'hydrogénation asymétrique.²⁰ Droite : premier exemple d'un hybride de type cheval de Troie ou le complexe inorganique est introduit à l'aide du ligand naturel de la protéine.²²

Depuis, de nombreuses méthodologies ont été proposées pour le développement de métalloenzymes artificielles, que ce soit par modification de site actif d'une métalloenzyme existante ou par création d'un nouveau site actif métallique au sein d'une biomolécule.

Au cours de ce premier chapitre, le principe en sera détaillé en se concentrant sur deux grands axes ; la stratégie biochimique ou la stratégie chimique.

(1) Stratégies biochimiques.

(a) Substitution d'ion métallique.

L'évolution et la sélection naturelle des enzymes s'est faite sur des millions d'années ce qui leur a permis d'acquérir des propriétés catalytiques hautement sélectives et efficaces. Mais, bien que possédant une diversité naturelle, les métalloenzymes effectuent uniquement des réactions dirigées par les métaux disponibles dans leur environnement cellulaire. Il peut alors être intéressant d'élargir les possibilités vers de nouvelles réactivités en substituant le métal natif d'une enzyme déjà existante par autre métal.

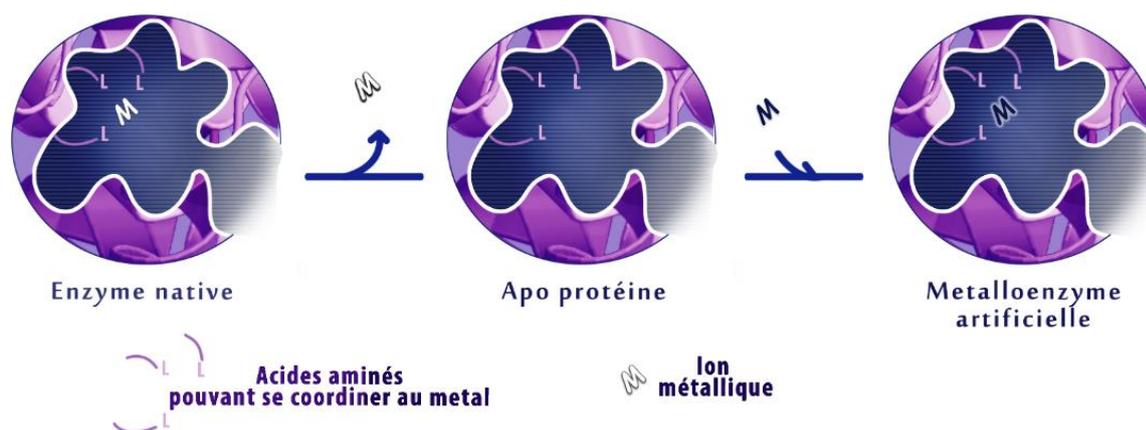


Figure 4. Illustration du développement d'une métalloenzyme artificielle par substitution du métal natif d'une métalloenzyme.

En premier lieu, il est nécessaire d'obtenir l'enzyme sous sa forme apo, *i.e.* sans son cofacteur métallique. Cette étape se fait soit par expression directe, soit par l'intervention d'agents chélateurs, ou encore par une simple étape de dénaturation. Ainsi, une fois démétallée, une nouvelle forme holoprotéine peut ainsi être générée par l'introduction d'un métal de choix (Figure 4).

Le premier exemple publié par Kaiser *and coll.* concerne la permutation de l'ion métallique zinc(II) d'une carboxypeptidase A (CPA) par du cuivre(II).²¹ Chez Cu(II)-CPA, on remarque une perte des activités peptidase et estérase, caractéristiques de sa forme native, au bénéfice d'une toute nouvelle réactivité d'oxydase. Cu(II)-CPA est efficace pour l'oxydation d'acide ascorbique en acide déhydroascorbique. Des études spectroscopiques comparatives ont montré une perturbation de l'environnement de l'ion métallique avec un changement du polyèdre de coordination de plan carré vers une structure tétraédrique. Néanmoins, la nouvelle enzyme étant inhibée en présence de 2-phénylpropionate, les auteurs concluent que le site de fixation de l'enzyme est resté le même. Ceci a permis par exemple de conserver une efficacité caractéristique des enzymes ($k_{\text{cat}} = 6 \text{ min}^{-1}$ et $k_{\text{cat}}/K_m = 2,5 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

Plus récemment, McLaughlin *et al.* ont exploité l'azurine, une protéine à cuivre, pour sa capacité à accueillir d'autres ions métalliques dans sa forme apo tels que Zn^{2+} ,

Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Au^+ , Ag^+ et Hg^{2+} . Ce faisant, ils ont notamment développé une Fe(II)-azurine non-hémérique, dont la stabilité a facilité des études spectroscopiques et cristallographiques par diffraction des rayons X (Figure 5).²³ Ces dernières ont suggéré une coordination de géométrie pseudo-tétraédrique impliquant deux histidines (His177-His46), une cystéine (Cys112) et une glycine (Gly45). Il a toutefois fallu que Liu *et al.* pratiquent des mutations de quelques résidus présents dans la seconde sphère de coordination pour conférer une activité d'oxydoréduction à cet hybride.²⁴ Le remplacement de la méthionine 121 par un acide glutamique conduit à une activité redox quantifiée par voltampérométrie cyclique avec un potentiel de 327 mV c.à.d. environ 100 mV plus haut que celui de la superoxyde reductase (SOR, 238 mV). Une activité de piège à superoxyde a alors été mesurée montrant une constante de vitesse du deuxième ordre d'environ $1,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à pH 7,8 et 25°C, comparable à celle du piège de référence, le nitrotétrazolium blue chloride (NBT) dont la constante de vitesse est de $5,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

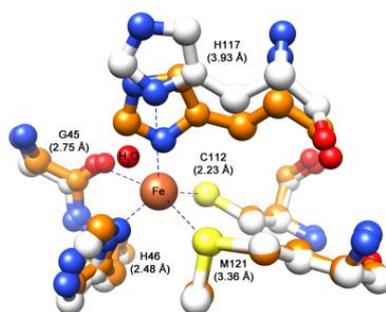


Figure 5. Structure obtenue par diffraction des rayons X du site actif de la Fe(II)-azurine (orange) superposée à la structure de l'azurine sous sa forme apo (blanc).

Nous venons de voir qu'il existe une réelle pertinence quant au développement de métalloenzymes artificielles par substitution du métal d'une enzyme naturelle. Cependant, les hybrides élaborés via cette stratégie connaissent encore une limitation concernant le champ de réactivité envisageable. De plus, le dernier exemple montre qu'une attention particulière doit être portée à la structure de l'enveloppe

biomoléculaire notamment en ce qui concerne l'environnement du site actif, et sur son implication dans la réactivité du catalyseur. À ces fins, la mutagenèse dirigée peut offrir une aide considérable.

(b) Mutagenèse dirigée.

La mutagenèse dirigée constitue une des méthodologies traditionnelles dans la modification de biomolécules. Cette méthodologie repose sur des connaissances (ou prédictions) reliant la seconde sphère de coordination et la réactivité souhaitée. Elle consiste alors à remplacer certaines fonctionnalités par d'autres en substituant des a.a. ou des acides nucléiques dans la biomolécule hôte (Figure 6). Cette modification de la seconde sphère de coordination permet par exemple de fixer de façon sélective un métal de transition dans une enveloppe protéique, de modifier le polyèdre de coordination de l'ion métallique d'une enzyme, ou encore de favoriser l'approche d'un substrat jusqu'au site actif. À terme, l'enjeu est d'améliorer l'énantiosélectivité d'une réaction enzymatique, de transformer une réactivité native ou de conférer une activité à une protéine catalytiquement inerte.

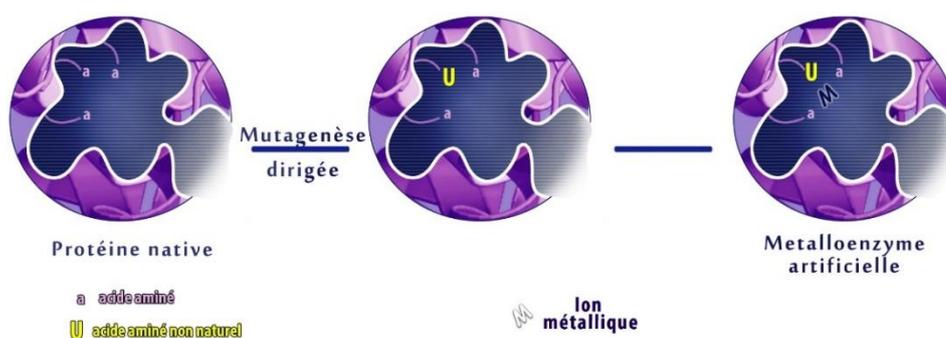


Figure 6. Illustration de création d'une métalloenzyme artificielle par mutagenèse dirigée sur une structure protéique.

Par cette approche, Lu *et al.* ont mis au point une réductase artificielle du monoxyde d'azote (NO) au sein d'une myoglobine (Cu_BMb) en créant un deuxième site de fixation pour un ion Cu(I) (Cu_B) à proximité de l'hème natif.²⁵ En absence d'une structure connue de l'oxydase d'oxyde nitrique (NOR), un modèle a préalablement

été conçu en s'appuyant sur la structure d'un homologue, la réductase HCO. Les auteurs ont utilisés la méthodologie qu'ils avaient précédemment employée pour induire à la Mb une propriété de réduction de l'oxygène moléculaire.²⁶ C. a. d. proposer un modèle du site Cu_B grâce à des simulations en modélisation moléculaire, ici avec un atome de zinc(II), afin d'intégrer un motif 2-His-1-Glu caractéristique des oxygénases à fer non-hémique. Puis, ce motif triade faciale a été créé dans le site distal de la Mb par mutagenèse dirigée. Une troisième histidine (His64), déjà bien positionnée, a été conservée à cet effet mais la leucine 29 et la phénylalanine 43 ont été mutées en histidine. Enfin, la valine 68, choisie pour sa proximité du site actif et des trois résidus histidine, a été permutée par un glutamate (Figure 7). L'introduction d'un atome de fer(II) ou de cuivre(I) conduit à une activité NOR mise en évidence en GC-MS par l'apparition d'un signal correspondant au N₂O après 4h de réaction en présence de dithionite et de Fe(II).²⁷

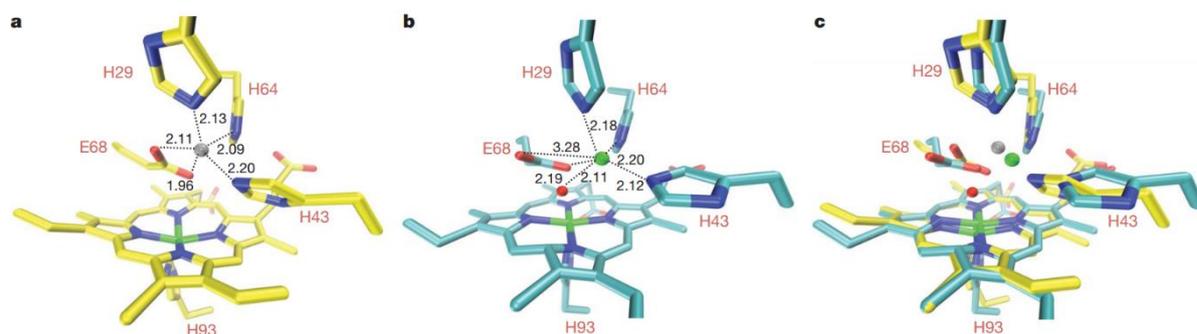


Figure 7. a) modèle Fe_BMb minimisé du triple mutant Leu29His/Phe43His/Val68Glu-Mb, b) structure cristalline acquise par diffraction des rayons X des cristaux Fe(II)-Fe_BMb (1.72 Å), c) superposition du modèle Fe_BMb (jaune) avec Fe(II)-Fe_BMb (bleu). a,b,c) L'atome de zinc est représenté par une sphère grise, Fe²⁺ par une sphère verte, et la sphère rouge représente la molécule d'eau présente dans la poche hémique.

La structure obtenue par diffraction des rayons X est en accord avec la proposition obtenue par modélisation. Le fer(II) s'ancre d'ailleurs de la même façon que le zinc dans le model Fe_BMb, avec toutefois l'intervention d'une interaction avec une molécule d'eau présente dans le site actif.

(c) Métalloenzymes artificielles par incorporation d'acides aminés non naturels.

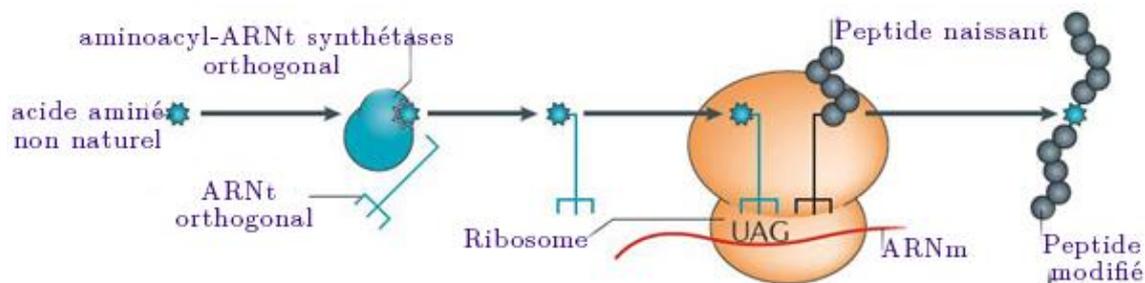


Figure 8. Illustration de la stratégie du «codon stop amber» qui permet d'introduire des acides aminés non naturels dans une séquence peptidique.

Le contrôle de la seconde sphère de coordination est un facteur clef de l'énantiosélectivité ou de l'efficacité des métalloenzymes artificielles. Toutefois, nous nous sommes jusqu'ici concentrés sur la présentation d'hybrides catalytiques composés d'une séquence peptidique se limitant aux 20 a.a. naturels. Une autre approche propose l'incorporation d'a.a. non naturels (UAAs pour «unnatural amino acids») au sein d'une protéine afin d'accéder à des réactivités non égalables par des enzymes naturelles.²⁸

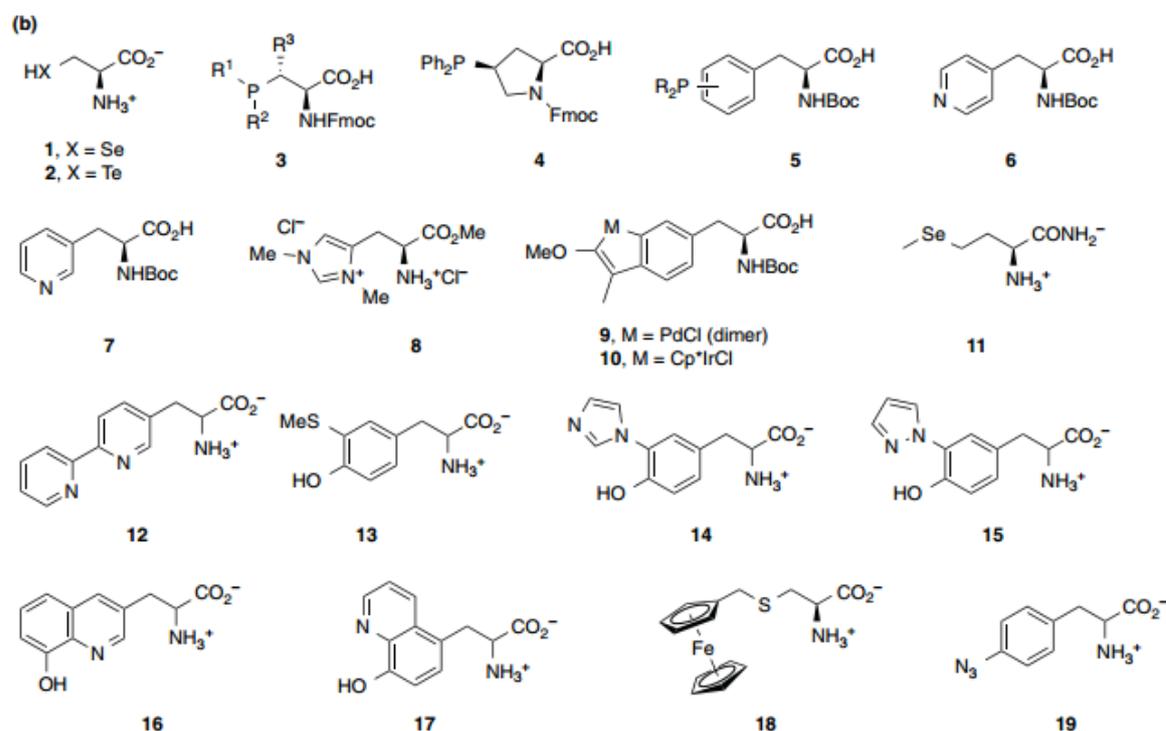


Figure 9. Liste des acides aminés non-naturels utilisés dans la modification des protéines.

L'approche la plus spécifique consiste à introduire des a.a. non naturels dans la séquence peptidique *via* la stratégie dite du «codon stop» (Figure 8).²⁹ Cela nécessite l'intervention d'acides ribonucléiques de transfert chargés en UAAs qui reconnaissent spécifiquement un codon stop pendant l'étape de la traduction. Cette méthodologie s'applique aussi à des systèmes *in vivo*, ce qui permet parfois d'augmenter les rendements en protéines.

L'incorporation sélective d'UAAs sert à la mise au point de nouvelles sphères de coordination autour du métal de transition ainsi qu'à la création de nouveaux sites d'ancrage du métal au sein de la protéine. À ce jour on compte une vingtaine d'UAAs impliqués dans la conception de métalloenzymes artificielles (Figure 9).

LmrR (Lactococcal multidrug resistance regulator) est une protéine homodimérique constituée de deux sous unités de 13,5 kDa chacune et dont la jonction forme une large poche hydrophobe. Récemment, Roelfes *et al.* ont conçu, grâce à la stratégie du codon stop, un mutant de ce dimère en intégrant un UAA bipyridylalanine (BpyAla) à l'interface de chacune des deux sous unités (Figure 10).³⁰ Les auteurs ont rapporté

une activité catalytique d'acylation de Friedel & Craft de LmrR-BpyAla après ancrage de deux ions cuivre(II) à l'interface hydrophobe grâce à la présence des deux nouveaux résidus BpyAla. Il est intéressant de noter que l'emplacement de l'UAA BpyAla module l'efficacité de la réaction, avec un taux de conversion allant de 18 à 36%, ainsi que l'énantiosélectivité avec un excès énantiomérique atteignant 66% lorsqu'il est inséré en position 89.

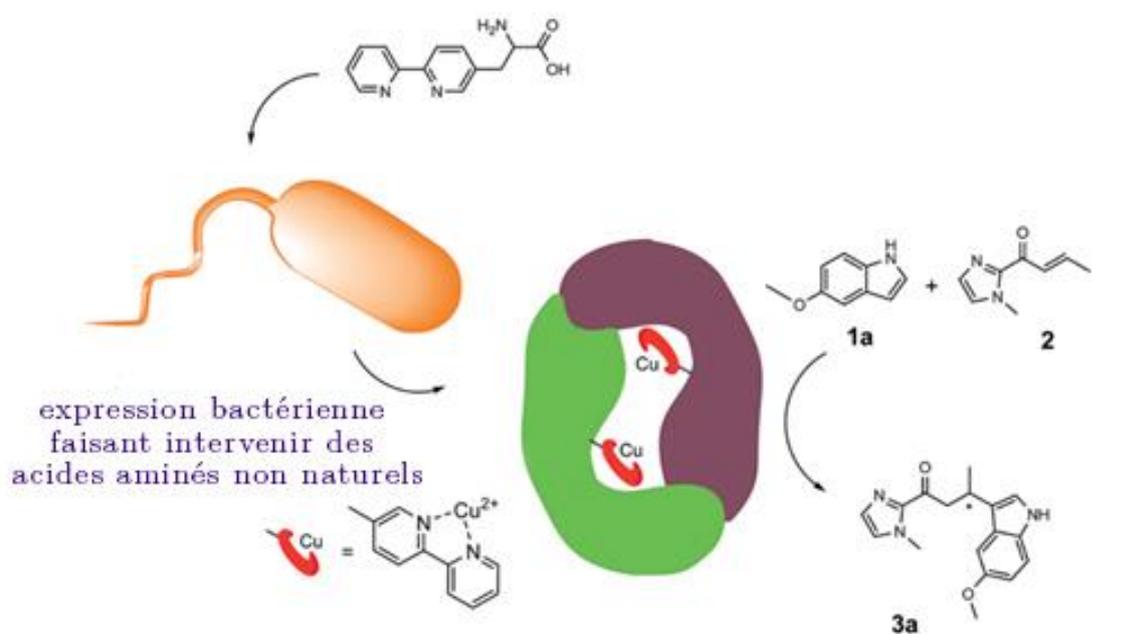


Figure 10. Représentation du développement d'une nouvelle métalloenzyme artificielle par incorporation *in vivo* de l'UAA BpyAla à l'interface du dimère LmrR et schéma de réaction de Friedel & Craft qu'elle catalyse.

Dernièrement, le groupe de Jared Lewis a profité de cette méthodologie pour introduire par codage génétique un UAA *p*-azido-*L*-phenylalanine (Az) en position 19 dans la séquence peptidique de la protéine tHisF de *Thermotoga maritima*.³¹ Une cycloalkylation sélective entre Az et un groupement bicyclo[6.1.0]nonyne chélatant un complexe de coordination a permis l'incorporation d'un tétra-carboxylate de dirhodium. Cette stratégie appelée «Rapid strain promoted azide-alkyne cycloaddition» (SPAAC) leur a permis d'obtenir l'hybride désiré (Figure 11). Cette nouvelle métalloenzyme s'est montrée efficace et sélective en catalyse de

cyclopropanation du styrène puisque le produit est obtenu avec un excès énantiomérique maximal de 92% pour un rendement de 74%.³²



Figure 11. Illustration de la création d'une métalloenzyme artificielle par l'introduction d'un acide aminé non naturel le *p*-azido-*L*-phénylalanine couplé à la stratégie SPAAC.

(d) *De Novo* Design.

La modélisation, par le développement de méthodes de calculs informatiques, a servi de point de départ dans le «redesign» de métalloprotéines. En effet, celle-ci a permis, par exemple le programme ROSETTA, d'accoster un ligand dans une protéine, ou d'affiner la compréhension de l'étroite relation qu'il y a entre la structure tertiaire des protéines et leur réactivité. Aujourd'hui, en raison des progrès techniques, cette méthodologie est mise au service de la conception dite de «A à Z» de métalloenzymes uniques : les métalloenzymes *De Novo*.^{33,34} Cette technologie ne requiert pas de modèle biologique existant mais repose au contraire sur : i) des études de modélisation d'une courte séquence peptidique; ii) une prédiction de son repliement peptidique en fonction de la réactivité souhaitée ; iii) la construction de cette séquence peptidique dans son intégralité. Le point le plus délicat de cette stratégie réside dans la génération d'un site de coordination stable pouvant accueillir un métal.

Les pionniers dans ce domaine sont les groupes de William DeGrado et de Vincenzo Pavone.³⁵ Le groupe de William DeGrado a commencé à travailler dans le domaine avec les enzymes synthétiques de type «dueferri» (DF) conçues pour réaliser des oxydations à deux électrons, évitant le passage par des radicaux oxygénés (ROS)

connus pour leur toxicité vis-à-vis des systèmes biologiques. Les DF de type DF_{tet} sont formées par l'auto-assemblage de 4 peptides (Figure 12) synthétisés pour former un site actif permettant de lier deux atomes de fer et un site de reconnaissance du substrat, le 4-aminophénol (4-AP).³⁶ Plusieurs variants ont été synthétisés, soit en modifiant l'homogénéité des peptides soit en mutant des a.a. spécifiquement placés afin d'améliorer l'entrée des réactifs au cœur du site actif ou la fixation du substrat. Le meilleur hybride, G₄-DF_{tet} est celui qui présente la plus grande cavité (Figure 12).

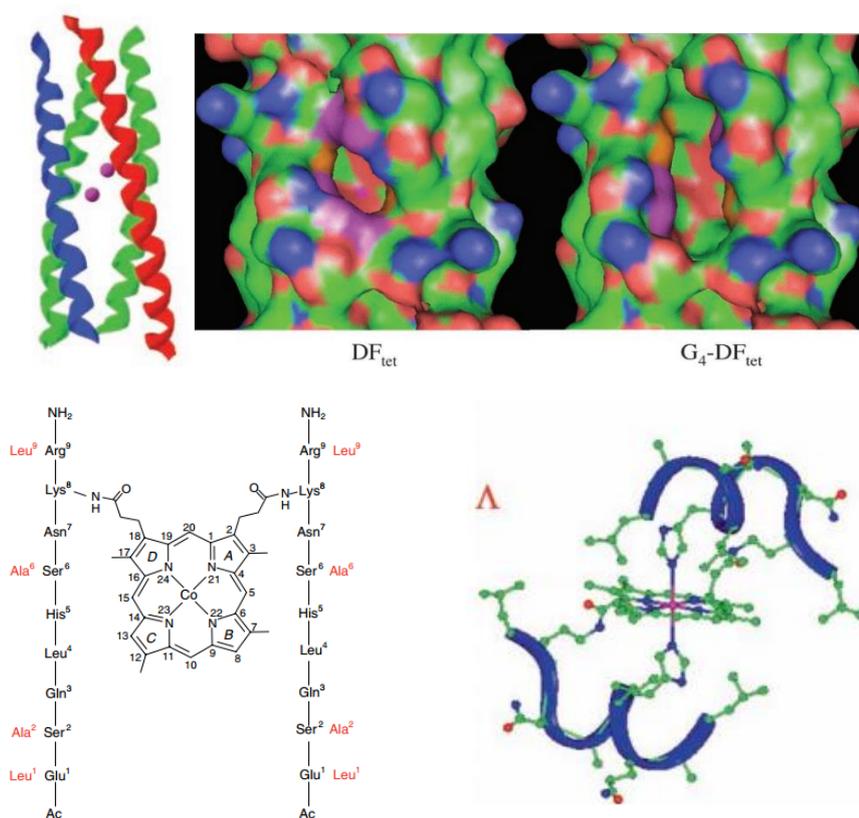


Figure 12. Haut gauche : structure complète de DF_{tet} avec deux peptides A différents (bleu et rouge) et deux peptides B (vert) coordonnant les deux atomes de fer, haut droite : effet des mutations sur l'accès du solvant vers le site actif, bas gauche : représentation schématique de la structure du Co(III)-mimochrome IV, bas droite : proposition de structure du Co(III)-mimochrome IV résultant d'études RMN et de calculs.

G₄-DF_{tet} est capable d'oxyder le 4-AP en benzoquinone monoimine sans apport de co-facteur avec des paramètres caractéristiques d'une enzyme naturelle selon Michaelis-Menten ($K_M = 0,83 \pm 0,06$ mM; $k_{cat} = 1,3 \pm 0,1$ min⁻¹; $k_{cat}/K_M = 1540$ M⁻¹.min⁻¹) et plus de 100 cycles catalytiques (TON). G₄-DF_{tet} est 1000 fois plus actif que

son parent DF_{tet}. De son côté, le groupe de Vincenzo Pavone a travaillé sur des mimochromes (Figure 12). Ces enzymes *De Novo* sont constituées de deux petits peptides de 9 a.a. liés de façon covalente à l'hème par des liaisons peptidiques entre les carboxylates de l'hème et les amines des chaînes latérales des Lys8 et par liaison dative entre les imidazoles des His5 et l'ion cobalt dans le cas du Co(III)-mimochrome IV.³⁷

Pecoraro *and coll.* ont proposé la création d'une métalloenzyme *De Novo* non-héminique à fonction d'hydrolase.³⁸ Le design original de cet hybride constitué de trois peptides lui permet de présenter deux sites de coordination permettant la fixation de deux métaux différents. En effet, comme le montre la Figure 13, le premier site a un rôle structural. Il est basé sur la structure du site de fixation du Hg(II) de la protéine MerR.³⁹ Il lie un atome de Hg(II) par les thiolates de trois cystéines –une par peptide– ce qui permet d'induire la superstructure 3D des trois peptides. Une fois la structure tertiaire mise en place, un second site peut alors accueillir du Zinc(II) lié par les imidazoles de trois histidines. La sphère de coordination du Zn est complétée par une molécule d'eau formant ainsi un site actif capable de catalyser l'hydratation de dioxyde de carbone ainsi que d'hydrolyser le *p*-NPA, acétate de *p*-nitrophényle, le substrat non-physiologique de l'anhydrase carbonique (CA), substrat de référence pour caractériser l'activité des modèles de CA. L'hybride présente une activité 100 fois plus faible que la CA humaine naturelle mais 500 fois meilleure que les complexes synthétiques comparables ($k_{cat} = (2,2 \pm 0,5) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ et $k_{cat}/K_M = 1,38 \pm 0,04 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à pH 7,5, 25 °C, 10 TON).

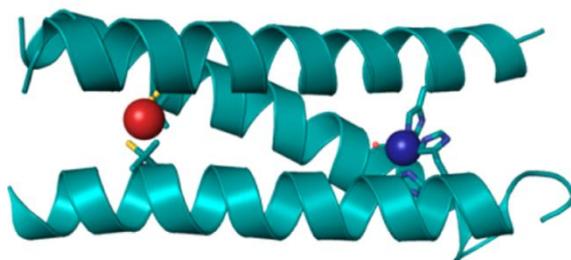


Figure 13. La metalloenzyme *De novo* $[Hg(II)]_5[Zn(II)(H_2O/OH^-)]_M(CSL9PenL23H)_3^{n+}$ avec les hélices peptidiques en cyan, le mercure (II) en rouge et le zinc en bleu (II).

Les métalloenzymes *De Novo* arborent le plus haut degré de complexité concernant la création de métalloenzymes artificielles, ce qui en fait un procédé prometteur pour atteindre des réactivités inaccessibles dans le vivant. Toutefois, étant très gourmande en moyens de calculs, cette méthodologie reste souvent limitée à la création d'une courte séquence peptidique. De même, certains motifs tels que les feuillets β demeurent encore difficilement reproductibles. Enfin, les protéines *De Novo* s'avèrent être souvent moins stables que les protéines naturelles.

Une alternative consiste alors à créer un site actif complet à l'intérieur d'une protéine naturelle possédant déjà un site de fixation ou une poche protéique. Ici commence l'élaboration de métalloenzymes artificielles par voie chimique.

(2) Stratégies chimiques.

L'insertion d'un complexe inorganique dans une biomolécule possédant une cavité adaptée et suffisamment large pour incorporer un complexe inorganique permet de s'affranchir des étapes de construction de la seconde sphère de coordination. L'optimisation de celle-ci par évolution dirigée reste néanmoins envisageable afin d'affiner l'efficacité du catalyseur nouvellement formé.

Il existe trois grandes stratégies pour ancrer un complexe inorganique au sein d'une biomolécule (Figure 14) : par liaison(s) covalente(s) entre les ligands du complexe et la biomolécule hôte ; par coordination d'un a.a. directement avec le métal catalyseur ;

enfin, par liaisons supramoléculaires entre le ligand du complexe inorganique et la biomolécule.

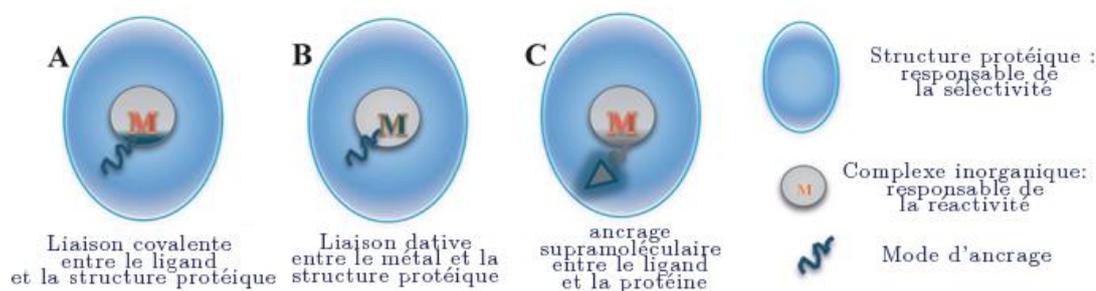


Figure 14. Illustration des différents modes d'ancrage d'un complexe inorganique au sein d'une protéine.

(a) Liaisons covalentes.

L'incorporation par liaison covalente intervient entre un ou plusieurs a.a. de la poche d'une protéine et le ligand du complexe inorganique *via* des a.a. tels que les cystéines, lysines et tyrosine. Pour un ancrage ciblé, il est donc nécessaire de garder le contrôle sur le nombre d'occurrence de l'a.a. en question ainsi que sur sa position au sein de la protéine.⁴⁰ Enfin, selon cet objectif, il peut être envisageable de modifier l'enveloppe protéique suivant les méthodes décrites précédemment *i.e.* mutagenèse dirigée ou incorporation d'UAA dans le site actif qui serait capable de se lier au ligand.

L'équipe de Mark Distephano a, par exemple, appliqué cette méthodologie pour l'élaboration d'une peptidase artificielle à partir d'une protéine de transport de lipides (ALBP, Figure 15).⁴¹ En effet, ALBP est une petite protéine de 131 a.a. avec une structure prédominante en feuillet β offrant une cavité protéique suffisamment large pour accueillir un complexe inorganique et permettre l'approche du substrat. La préparation du catalyseur hybride a été faite en deux étapes : premièrement, par l'alkylation d'un résidu cystéine unique (Cys117) par de l'iodoacétamido-1,10-phenanthroline ; deuxièmement, par la coordination d'un ion cuivre (II) sur le ligand. ALBP-Phen-Cu(II) catalyse des réactions d'hydrolyse de nombreux esters, pouvant atteindre un nombre de cycle catalytique de 7,6 dans le cas de l'hydrolyse du

tyrosinate de méthyle avec un excès énantiomérique de 39% et des paramètres de Michaelis-Menten cohérent avec un comportement enzymatique ($k_{\text{cat}} = 7,0.10^3 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, 25°C, tampon PIPES pH 6,1). Le meilleur excès énantiomérique (86%) a été obtenu pour le même substrat en baissant la température à 4°C mais au détriment de la cinétique (0,7 TON).

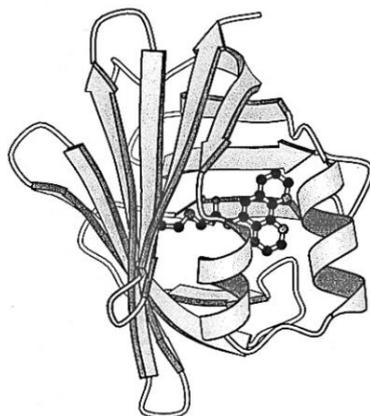


Figure 15. Modèle de ALBP-Phen-Cu(II).

Il est aussi intéressant de s'enquérir des travaux effectués par Lu *and coll.* sur le développement d'une métalloenzyme artificielle comprenant un ancrage par deux liaisons covalentes.⁴² Ainsi, un complexe de manganèse, coordonné par un ligand de type salen **L1** (Figure 16), a été introduit dans une apo myoglobine mutante (remplacement des résidus Tyr103 et Leu72 par deux cystéines). Les deux liaisons covalentes ont été formées *via* des ponts disulfures entre les groupements thiosulfonates de **L1** et les deux cystéines. L'importance de l'ancrage par deux liaisons covalentes a été démontrée puisque l'excès énantiomérique, obtenu lors de catalyse de sulfoxydation du thioanisole par Mn**L1**-Mb(Tyr103Cys-Leu72Cys), est cinq fois plus élevé que celui obtenu par l'hybride avec le complexe lié par une seule liaison (51% et 12%, respectivement). Les auteurs expliquent cette différence par une stabilisation de l'orientation du complexe au sein de la poche protéique.

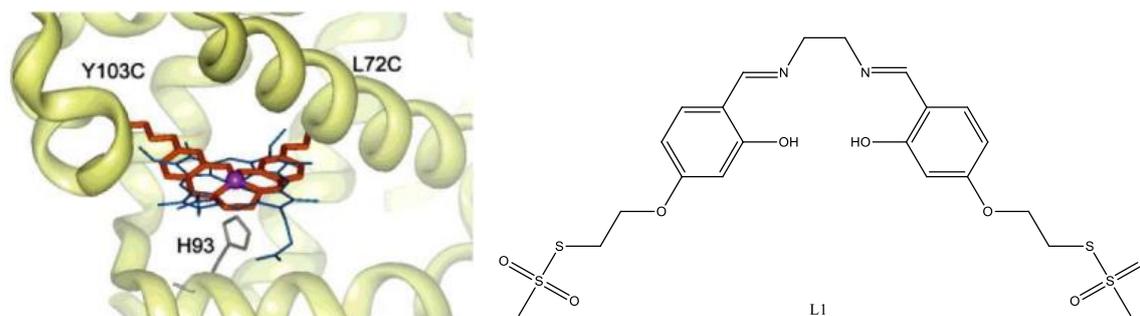
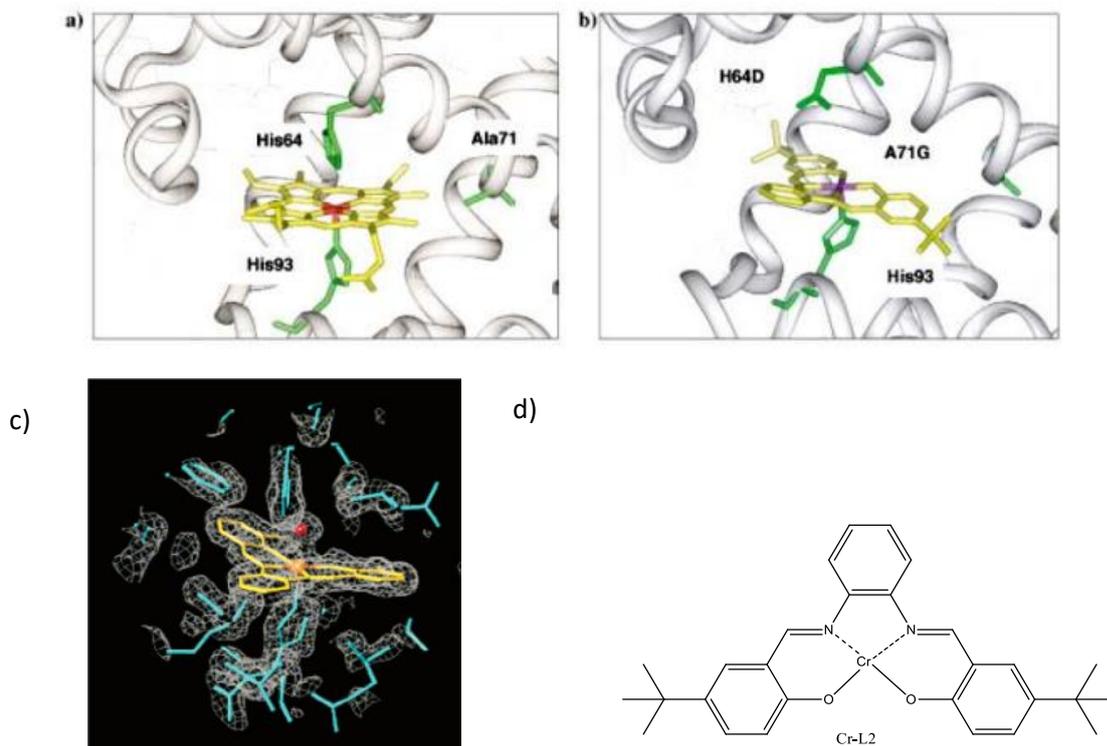


Figure 16. Gauche : La métalloenzyme artificielle Mn**L1**-Mb(Tyr103Cys-Leu72Cys) avec le complexe inorganique, dont le ligand **L1** est représenté en rouge et le métal en violet, ancré par liaison covalente grâce à une mutation des acides aminés **103** et **72**. Droite : Ligand **L1**.

(b) Liaison datives.

Une seconde approche d'ancrage met en jeu des liaisons de coordination spécifiques d'a.a. au métal de transition impliquant le plus souvent la coordination de résidus histidine ou cystéine. L'avantage de cette méthodologie repose dans le fait qu'elle laisse une grande liberté aux chimistes dans la synthèse du ligand puisque celui-ci ne doit pas répondre à une liste de critères permettant de fixer le complexe inorganique.

Watanabe *and coll.* ont ancré par liaison dative un complexe de chrome de type 5,5'-*t*Bu₂-salophène **L2** (Figure 17) dans un double mutant de l'apo myoglobine.⁴³ Cet ancrage a été réalisé grâce à la coordination directe au métal d'un atome d'azote de l'imidazole de la chaîne latérale du résidu His**93** soit de façon identique au cofacteur natif de la myoglobine. Néanmoins, cela a nécessité le remplacement de l'His**64** par un aspartate et de l'Ala**71** par une glycine afin d'obtenir une meilleure accessibilité pour les réactifs et une meilleure affinité du complexe pour la protéine, respectivement. La nature et la position des a.a. modifiés ont été déterminées grâce à des calculs avec le programme InsightII (Accelrys). Des structures obtenues par diffractions des rayons X du catalyseur Cr-3,3'-Me-salophène-Mb(His103Ala-Ala72Gly) ont confirmé la présence du complexe inorganique dans la cavité protéique ainsi que la nature de son ancrage dans celle-ci.⁴⁴ La réactivité de sulfoxydation de cette métalloenzyme sera discutée un peu plus loin.



(c) Liaisons supramoléculaires.

Enfin, les interactions dites supramoléculaires –réseau d'interactions non covalentes mais spécifiques- impliquant des liaisons hydrogène comme des liaisons hydrophobes de type π -stacking représentent la dernière catégorie d'ancrage de ce chapitre. On distingue deux voies de synthèse de métalloenzymes artificielles par liaison supramoléculaire : la stratégie d'hôtes/invités et celle du cheval de Troie.

La première implique des interactions spécifiques et uniques entre les chaînes latérales des a.a. de la protéine et le ligand du complexe, mais ne nécessite aucun couplage avec une molécule biologique. En effet, le complexe inorganique d'intérêt est développé afin d'être directement reconnu puis lié au sein de la biomolécule.

La seconde fait suite aux travaux précurseurs de Wilson et Withesides et exploite la forte affinité de reconnaissance d'une protéine pour un ligand : une enzyme et son cofacteur, une enzyme et son substrat ou un anticorps et son antigène.

i. *hôtes/invités.*

Investis dans la création d'oxygénases artificielles, Ménage *and coll.* ont inséré un complexe inorganique de synthèse FeL3 (Figure 18) comportant un motif N₂Py₂, dans une protéine périplasmique de transport de nickel chez d'*Escherichia coli*, NikA.⁴⁵

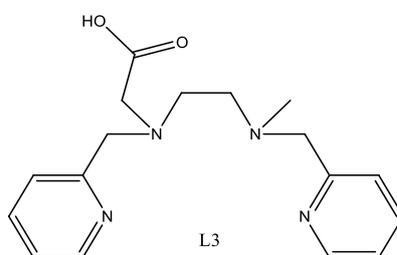


Figure 18. Structure du ligand L3 inséré dans NikA complexé avec du Fe(III).

Des études cristallographiques ont permis de localiser cet ancrage au niveau du site de fixation de l'ion Ni²⁺ (Figure 19).^{46,47} Les structures obtenues ont aussi permis de spécifier le mode de fixation du complexe impliquant des liaisons électrostatiques (ponts salins) entre le bras carboxylate du ligand et le résidu Arg137, des interactions de type π -stacking entre une pyridine et le Trp398 et, enfin, des interactions entre la Tyr402 et le groupement carboxylate *via* une molécule d'eau. L'ancrage se fait donc *via* des interactions supramoléculaires directes entre le ligand du complexe et la poche protéique.

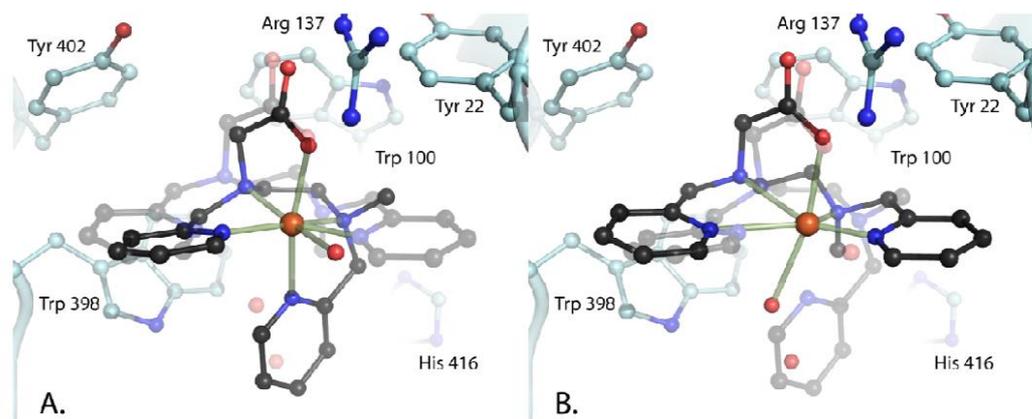


Figure 19. Structures de cristaux de FeL3-NikA montrant deux topologies (A et B) de FeL3 dans le site actif de l'hybride.

Néanmoins, les structures cristallines de l'hybride ont montré que le complexe FeL3 existe sous plusieurs topologies dans la cavité protéique, *cis-β* (Figure 19A) et *trans* (Figure 19B), dues à la position relative du ligand extracyclique par rapport au carboxylate. Une comparaison entre la structure apo-NikA et celle de l'hybride indique un changement conformationnel de la protéine qui se referme sur le complexe, ce qui assure ainsi son maintien au sein de la cavité avec une constante de dissociation de $5,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$. FeL3-NikA a montré une réactivité de sulfoxydation efficace que nous détaillerons plus loin.

Un autre exemple de ce type d'ancrage peut être exemplifié par les travaux du groupe de J.P. Mahy concernant les hémoprotéines, hémobzymes et hémozymes, visant à mimer les peroxydases naturelles de type cytochrome P450.⁴⁸ Les hémobzymes résultent de la stratégie antigène-anticorps. Un anticorps monoclonal est sélectionné pour son affinité envers le complexe inorganique choisi pour sa réactivité. On peut citer $\alpha_3\beta$ -Fe(ToCPP)-13G10 dans lequel la porphyrine tétracarboxylée est retenue au sein de l'anticorps grâce à des liaisons hydrogène entre les carboxylates ajoutés au ligand et les a.a. du polypeptide (Figure 20, gauche). Cet hybride possède en effet des propriétés de peroxydase envers des substrats comme l'ABTS mais aussi l'*o*-dianisidine ou le pyrogallol avec comme oxydant H_2O_2 et une large gamme

d'hydroperoxydes.^{49,50} L'hybride est cinq fois plus performant que le complexe inorganique seul car l'anticorps isole le complexe et le protège donc de la dégradation par oxydation liée à la présence d'un excès d'oxydant tout en laissant diffuser ledit oxydant petit à petit pour permettre à la réaction de se dérouler dans des conditions douces. Toutefois, l'hybride reste 3 à 5 fois moins performant que les peroxydases hémiques naturelles qui sont les catalyseurs les plus efficaces connus (k_{cat}/K_M valeur de $6.10^8 \text{ M}^{-1}.\text{min}^{-1}$).⁵¹ Les hémozymes sont une évolution des hémobzymes pour lesquelles la métalloporphyrine est insérée dans une protéine globulaire et non un anticorps. Les auteurs ont choisi d'employer la xylanase A (XlnA) de *Streptomyces lividans*, une protéine thermophile, commerciale et peu chère, dont les structures cristallographiques publiées montrent une cavité assez large pour accueillir un ligand de type porphyrine. Grâce à des substituants de type carboxylate et sulfonate, de nouveaux hybrides ont pu être obtenus (Figure 20, droite). Ils présentent une réactivité d'oxydation de substrats organiques, sulfoxydation en présence de fer et époxydation en présence de manganèse, qui sera présentée plus loin.^{52,53}

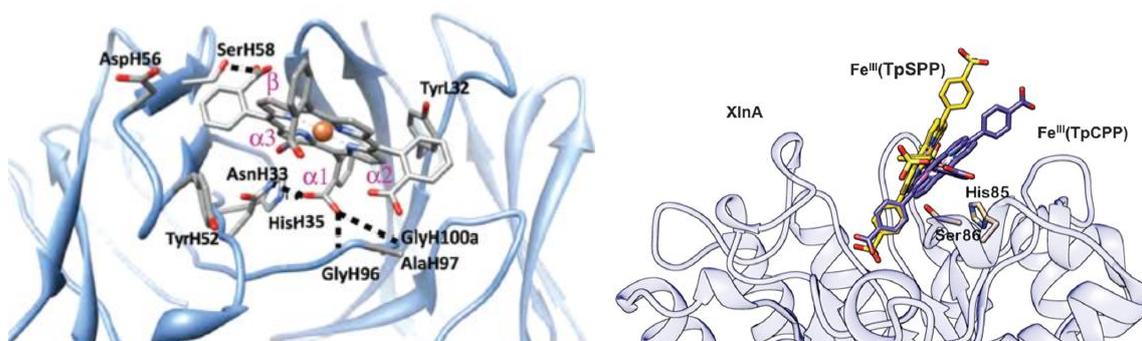


Figure 20. Gauche : Structure cristallographique de l'hémobzyme $\alpha_3\beta$ -Fe(ToCPP)-13G10. Droite : Structure des hémozymes Fe(TpCPP)-XlnA et Fe(TpSPP)-XlnA établies par modélisation moléculaire.

Manfred Reetz est très connu pour ses travaux concernant l'optimisation de réactions enzymatiques grâce à l'évolution dirigée.⁵⁴⁻⁵⁶ Toutefois, il a lui aussi exploré le champs des hémozymes et réalisé une étude sur la réaction de Diels-Alder entre des chalcones et le cyclopentadiène avec comme catalyseurs des hémozymes artificielles à base de

sérum albumines naturelles comme plateforme protéique et d'un complexe de cuivre(II) et une phtalocyanine tétrasulfonaté.⁵⁷

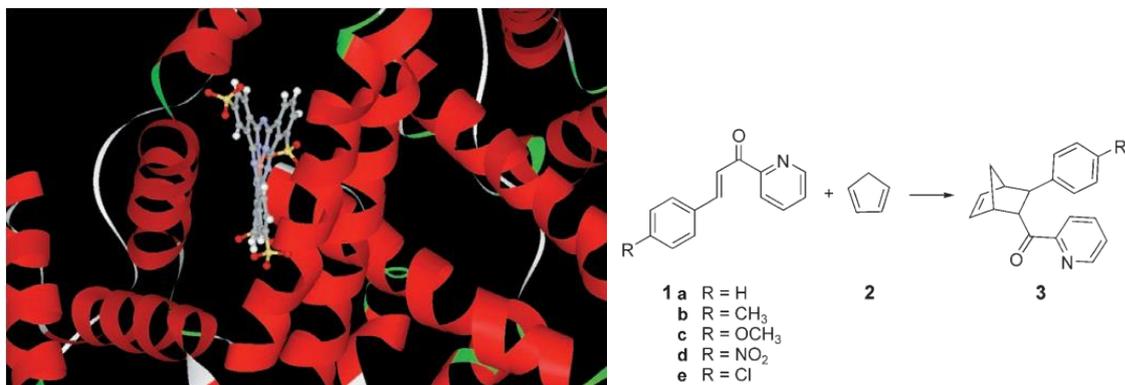


Figure 21. Proposition de structure du complexe Cu-phtalocyanine au sein du site de reconnaissance IB de HSA et réaction étudiée.

La présence de la protéine n'a pas d'effet sur la conversion (80%) ni sur le rapport endo/exo (environ 95 : 5 avec ou sans protéine), par contre, elle permet une réaction énantiosélective avec un e.e. de 93% dans les conditions optimisées avec la sérum albumine bovine (BSA, tampon formate pH 4,0, 3°C, 3 jours, 40 TON). Il n'existe pas de structure cristallographique qui puisse attester de la position du complexe inorganique au sein de la protéine, toutefois, par analogie structurale du ligand phtalocyanine avec l'hémine qui, elle, a été cristallisée dans HSA, Reetz propose que le complexe se trouve dans le site de fixation IB (Figure 21).

ii. Cheval de Troie.

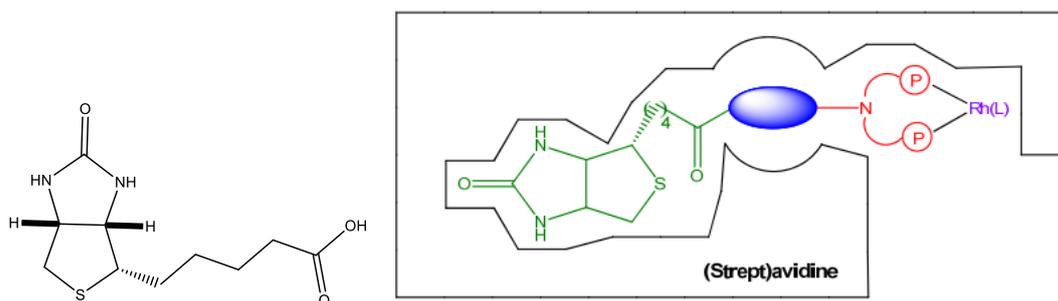


Figure 22. Gauche : représentation de la vitamine B8, communément appelée biotine, droite : schéma général d'ancrage d'un complexe métallique au sein de la (strept)avidine par biotinylation, ici un complexe de Rhodium au sein d'une streptavidine, avec en vert la biotine, en bleu un bras espaceur, en rouge l'ancrage du métal.

Nous avons introduit la stratégie du cheval de Troie en évoquant les travaux précurseurs de Wilson et Whitesides.²² Le couple utilisé était alors constitué d'une biotine, une vitamine (B8) hydrosoluble, et de son site de reconnaissance présent dans l'avidine, une protéine tétramérique d'environ 65 kDa. Cette reconnaissance est telle que l'interaction entre l'avidine et son ligand se fait avec une constante de dissociation de l'ordre de 10^{-14} moles.L⁻¹, se classant ainsi parmi une des plus fortes interactions non-covalentes connues dans la nature. On peut aussi noter que son homologue bactérien, la streptavidine, interagit de façon similaire avec la biotine. L'introduction d'un complexe organique au sein de ces deux protéines devient alors possible par biotinylation -couplage covalent- entre la biotine et le ligand du complexe (Figure 22).

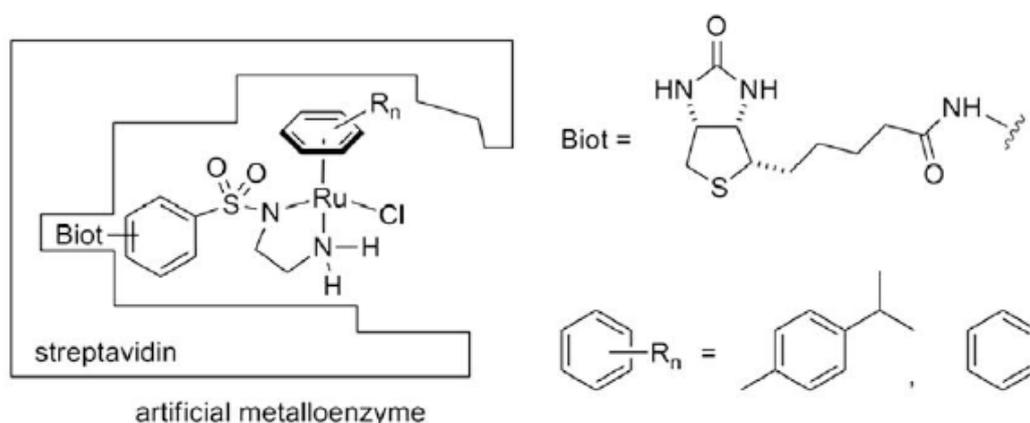


Figure 23. Représentation de l'hybride $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]\text{-Sav}(\text{Pro64Gly-Leu124Gly})$.

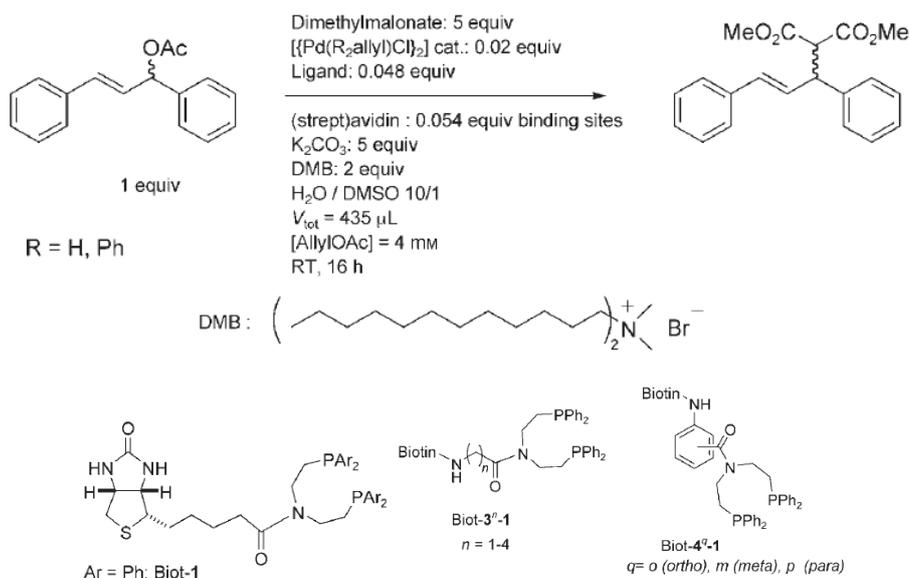


Figure 24. Conditions réactionnelles et ligands du palladium utilisés pour la réaction d'alkylation asymétrique catalysée par les hybrides à base de streptavidine.

Dès lors, de nombreux complexes inorganiques comportant divers centres métalliques (Rh, Pd, Ru, Os, V, etc..) ont pu être introduits dans ces deux protéines, notamment par le groupe de Thomas Ward.⁵⁸⁻⁷⁴ Les catalyseurs hybrides obtenus ont pu accomplir de nombreuses et diverses réactions. En voici quelques exemples.

Ainsi, lorsque le complexe inorganique est porté par un atome de rhodium, l'hybride permet de procéder à des réactions d'hydrogénation présentant jusqu'à 96% d'excès énantiomérique pour une conversion totale dans le cas de l'hydrogénation de la double liaison C=C de l'acide acétamidoacrylique, précurseur de la valine.^{58,61,75}

L'hybride $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]\text{-Sav}(\text{Pro64Gly-Leu124Gly})$ (Figure 23) catalyse quant à lui la réduction de cétones, notamment de la *p*-méthylacétophénone, avec 98% de rendement et 98% d'excès énantiomérique.⁶⁹

L'ancrage d'un complexe de palladium diphosphine dans la protéine Sav(Ser112Ala) a rendu possible l'alkylation asymétrique du 3-acétoxy-1,3-diphénylpropène par le malonate de méthyle avec un rendement de 95% accompagné d'un très bon excès énantiomérique de 90% (Figure 24).⁶⁶

Pour obtenir le meilleur résultat, les auteurs ont procédé à une optimisation systématique chimiogénétique combinant la recherche du meilleur ligand et du meilleur mutant. Les résultats se présentent sous la forme d'une empreinte (Figure 25).



Figure 25. Empreinte montrant les résultats de l'optimisation chimiogénétique de deux paramètres : nature du ligand du complexe de palladium et nature de(s) mutation(s) effectuées sur la streptavidine pour la réaction d'alkylation du 3-acétoxy-1,3-diphénylpropène par le malonate de méthyle.

Enfin, l'équipe de T. Ward a mis au point, grâce à la technologie biotine-(strept)avidine, la première version asymétrique de la réaction de benzannulation permettant la synthèse de dihydroisoquinolones (Figure 26).⁷⁴ Cette réaction de couplage entre le pivaloate de benzhydroxamyle et l'acrylate de méthyle étant catalysée par un complexe de rhodium (III) et de la streptavidine, elle peut, de plus, être réalisée en milieu aqueux, des conditions plus douces pour l'environnement que l'emploi du méthanol typiquement associé à cette réaction. Grâce à une étape de mutagenèse dirigée, les auteurs ont introduit dans la cavité protéique et à proximité du complexe de rhodium un aspartate qui de par la présence de sa deuxième fonction carboxylate joue le rôle de la base nécessaire à l'activation de la liaison C-H moteur de la réaction. L'hybride le plus performant conduit à une réaction 100 fois plus

rapide que lors de l'emploi du complexe de rhodium seul et surtout à un produit énantiomériquement enrichi (95% de rendement avec un e.e. de 82%).

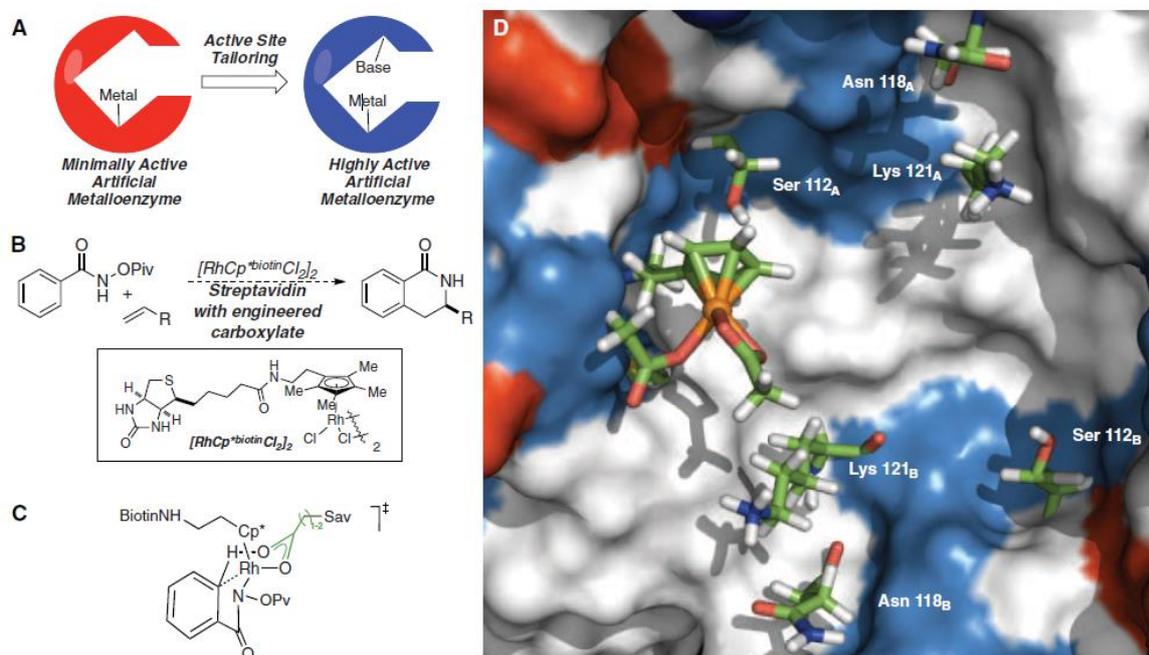


Figure 26. A) Modèle d'insertion d'un a.a. basique à proximité du site métallique afin d'obtenir une action synergique des deux sites actifs. B) Schéma de la réaction de benzannulation. C) Etat de transition postulé montrant l'activation de la liaison C-H par le carboxylate l'addition du rhodium sur le cycle aromatique activé. D) Modèle obtenu par Auto-Dock du complexe de rhodium au sein de son site de fixation postulé. Seuls les a.a. ayant un rôle clef sont présentés en sticks.

L'équipe de T. Ward n'a pas été la seule à mettre à profit la technique du «cheval de Troie». Mahy *and coll.* l'ont aussi employée pour créer une hémzyme à base de l'anticorps anti-œstradiol 7A3. En greffant leurs complexes porphyriniques sur une molécule d'œstradiol, ils ont obtenu un catalyseur d'oxydation des alcènes et des thioéthers (Figure 27).^{76,77}

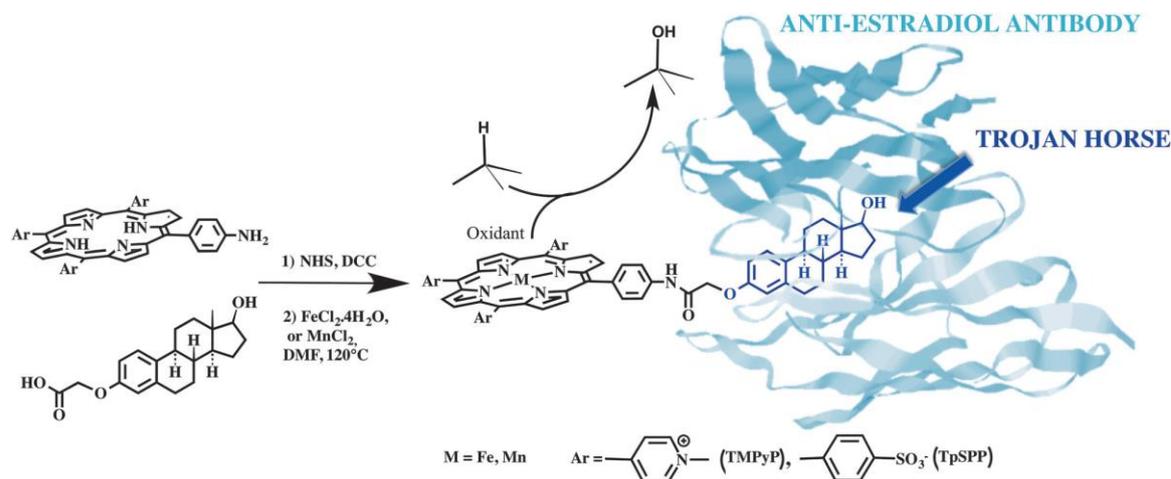


Figure 27. Stratégie de création d'une hémzyme par greffage de l'œstradiol sur un complexe de fer ou de manganèse et insertion dans l'anticorps anti-œstradiol 7A3.

III) Choix des deux acteurs.

Un second facteur clef du développement de ces hybrides catalytiques, concerne le choix des différents acteurs mis en jeu. La suite du chapitre abordera donc les caractéristiques particulières à prendre en compte concernant le complexe inorganique et la biomolécule.

(1) Choix du complexe métallique

Précédemment, nous avons détaillé le rôle de chacune des deux sphères de coordination présentes dans le site actif précisant la responsabilité du complexe inorganique quant à la réactivité catalytique de l'hybride. Son choix est donc principalement établi sur la réactivité que ce dernier développe en milieu organique. Par exemple, pour les réactions d'oxydation, nombreux sont les complexes à base de porphyrines de fer –en référence aux oxygénases naturelles-ou de Mn-salen– en référence aux travaux de Jacobsen.⁷⁸ Néanmoins, celui-ci n'a pas besoin de disposer d'une structure complexe et inductrice de chiralité puisque ce contrôle est à présent assuré par la biomolécule hôte. Même s'il ne présente qu'une faible réactivité dans l'eau sans sa structure biomoléculaire ce catalyseur doit être stable et tolérant au milieu aqueux pour permettre la synthèse de l'hybride. Il est aussi important de

comprendre que la réactivité qu'il dirige doit être bioorthogonale *i.e.* qu'il reste inerte envers les fonctionnalités présentes dans la cavité qui l'accueille. Par contre, le ligand doit être judicieusement choisi en fonction du mode d'ancrage choisi. Cela implique parfois de le modifier chimiquement afin de lui ajouter des motifs de reconnaissance/réactivité nécessaires. Par exemple, pour pouvoir réaliser un pont covalent entre le ligand et une cystéine, Lu *and coll.* ont ajouté à leur ligand de type salen des chaînes alkyles terminées par des fonctions thiosulfonates (**L1**, Figure 16).⁴² C'est sans doute la stratégie d'ancrage par interactions supramoléculaire qui a demandé le plus de modifications synthétiques des ligands avec ajout de fonctions carboxylates sur les protoporphyrines (Figure 20)⁵² ou sur les ligands de type N2Py2 (**L3**, Figure 18),⁴⁷ de chaînes alkyles en différentes positions sur les salophène (**L2**, Figure 17),⁴⁴ et bien sûr ajout de molécules entières dans le cas de la stratégie du «cheval de Troie».

(2) Choix de la biomolécule.

Au cours des précédents paragraphes, nous avons considéré la création de métalloenzymes artificielles impliquant différentes structures protéiques ou peptidiques. Cependant, bien qu'elles permettent toutes l'accès à des catalyseurs hybrides relativement efficaces, il est une fois encore important de mener une réflexion sur la bioorthogonalité de la réaction qu'elles vont catalyser. À titre d'exemple, on peut citer la forte sensibilité aux clivages des brins d'ADN en conditions oxydantes, faisant d'une enveloppe nucléique un mauvais candidat pour le développement d'oxygénases artificielles.

La biomolécule doit répondre à de nombreux critères pour assurer le succès du catalyseur nouvellement formé, à commencer par une grande stabilité face aux conditions réactionnelles. En effet, il est indispensable qu'elle conserve son état en

fonction d'un pH particulier ; de la température ; ou la présence d'un co-solvant organique qui, bien que présent en faible quantité, est parfois nécessaire à la solubilisation des substrats. Pour des raisons pratiques, il est aussi important que sa production et sa purification se fasse, sans difficulté, en quantité raisonnable.

Concernant le choix d'une structure protéique, nous avons vu que la présence d'un site actif natif s'avère d'une grande utilité. Néanmoins, celui-ci doit être suffisamment large puisqu'il s'agit d'y accueillir un substrat en plus d'un nouveau cofacteur métallique. La présence de résidus hydrophobes dans la poche protéique facilite aussi la solubilité de certains composés apolaires, et peut permettre par la même occasion une approche spécifique au sein du site actif. De plus, dans certaines conditions telles que la catalyse d'oxydation, la poche hydrophobe assure un contrôle de la réactivité en facilitant le rejet du produit oxydé, plus polaire que le substrat, dans le milieu réactionnel lui évitant ainsi de subir une sur-oxydation.

Il ne faut pas non plus oublier l'avantage que présentent les protéines de transport qui présentent une grande stabilité et qui sont facilement accessibles dans des échantillons sanguins. Il faut ajouter à cela le fait qu'elles possèdent naturellement une cavité comportant un site de reconnaissance qui offre, le plus souvent, de multiples possibilités de fixer un complexe inorganique de façon supramoléculaire.

Enfin, la capacité de la biomolécule à former des cristaux qui diffractent aux rayons X rend la caractérisation des hybrides plus aisée. En effet, cette propriété permet d'identifier le mode d'ancrage et spécifier la nature de la seconde sphère de coordination. Mais, plus intéressant encore, il devient alors possible de suivre la réactivité par cristallographie cinétique comme ont pu le montrer Cavazza *et al.*⁷⁹ Cette technique permet l'accès à des informations cruciales concernant la réactivité et les possibles optimisations du catalyseur.

B) Oxydation par les métalloenzymes artificielles.

La catalyse d'oxydation représente un défi pour la chimie durable. Bien que les réactions catalytiques soient largement employées depuis de nombreuses années, elles font souvent appel à des oxydants toxiques, comme les dérivés d'osmium, et/ou à des ligands synthétiquement coûteux dans le cas de réactions asymétriques.⁸⁰ Enfin, elles se déroulent très majoritairement en milieu organique. L'emploi de métalloenzymes artificielles répond donc en partie à cet enjeu sociétal qui nous pousse vers la chimie propre : emploi de métaux peu toxiques et peu onéreux (fer, manganèse, ...), réactions en milieu aqueux et limitation au minimum de la synthèse de ligands.

La partie suivante a pour but de présenter les quelques exemples de métalloenzymes artificielles développées pour des réactions d'oxydation.

Par souci de comparaison, les résultats seront centrés, lorsque cela sera possible, sur des catalyses d'oxydation de substrats références : thioanisole pour la sulfoxydation et styrène dans le cas des époxydations et hydroxylations.

1) Sulfoxydation

Les sulfoxydes sont des composés très utilisés dans la synthèse organique en tant qu'intermédiaires réactionnels. Ils sont aussi nombreux à posséder une activité biologique. On trouve d'ailleurs ce motif dans plusieurs principes actifs de médicaments (Figure 28) comme par exemple l'oméprazole (inhibiteur de la pompe à protons) employé sous sa forme racémique (Mopral® et génériques) et sous sa forme énantiopure *S* l'ésoméprazole (Nexium®) ou encore le modafinil (psychostimulant). On comprend donc aisément l'intérêt de disposer de méthodes de synthèse asymétrique de sulfoxydes. Et, si au cours des dernières décennies de nombreux travaux sur la sulfoxydation asymétrique catalysée par des complexes de coordination

ont été entrepris,^{81,82} les métalloenzymes artificielles n'en sont plus à leurs balbutiements dans ce domaine.

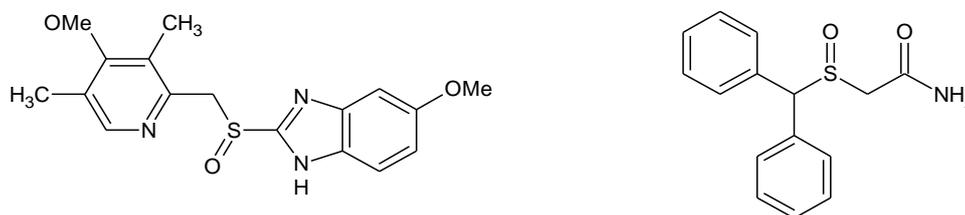


Figure 28. Oméprazole à gauche et modafinil à droite.

(1) Structures protéiques Myoglobine

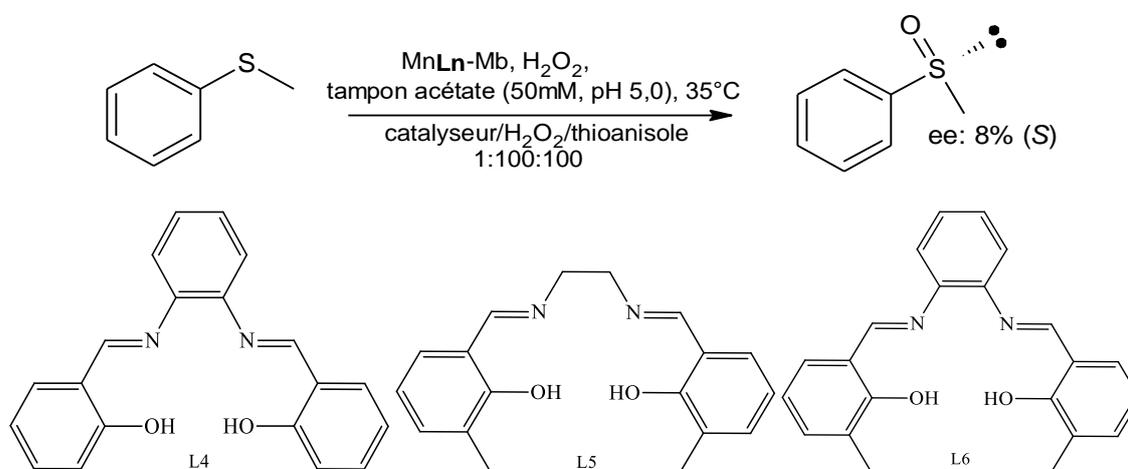


Figure 29. Réaction de sulfoxydation et ligands employés.

Watanabe *and coll.* ont poursuivi leurs recherches concernant le développement de catalyseurs hybrides par ancrage datif, réunissant une myoglobine mutante et un complexe de synthèse d'intérêt. Pour ce faire, ils se sont inspirés de complexes bases de Schiff (salen et salophène), tels que les complexes de Jacobsen et de Katsuki,⁸¹ connus pour leur efficacité en catalyse d'oxydation en milieu organique. Deux peroxygénases artificielles à centre chrome et manganèse ont été développées pour catalyser l'oxydation de thioéther (Figure 29, Tableau 1).^{44,83}

Tableau 1. Résultats de la réaction de sulfoxydation présentée Figure 29.

Catalyseur	TON	e.e. (%)
ApoMb	0	0
MnL5	62	0
MnL6	47	0
CrL4	0,3	0
MnL6-Mb(His64Asp/Ala71Gly)	0,5	23
MnL5-Mb(His64Asp/Ala71Gly)	1,5	32
CrL4-Mb(His64Asp/Ala71Gly)	2	8

Conditions : sulfoxydation du thioanisole (1 mM) en présence de H₂O₂ (1 mM) dans le tampon acétate (50 mM, pH 5,0) à 35°C par l'hybride catalytique correspondant (10 µM).

(a) Centre métallique chrome

L'hybride CrL4-Mb(His64Asp/Ala71Gly), dont la conception a été détaillée précédemment (Figure 17),⁴³ a été testé en catalyse d'oxydation asymétrique du thioanisole en présence de peroxyde d'hydrogène comme oxydant (H₂O₂).⁴⁴ Le catalyseur hybride montre une modeste activité de sulfoxydation (78.10⁻³ cycles.min⁻¹ soit 2 TON) avec un faible excès énantiomérique de 8% en faveur de l'énantiomère S. Toutefois, CrL4 libre testé dans les mêmes conditions ne permet aucune énantiosélectivité et se montre jusqu'à six fois moins réactif (13.10⁻³ cycles.min⁻¹) que le catalyseur hybride. L'ensemble de ces résultats met ainsi en évidence l'effet de synergie entre l'enveloppe protéique et sa sous unité inorganique. Concernant le mécanisme réactionnel, la formation d'une espèce oxochromium(V) a été confirmée par des études de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) à 5 K (pH 7,0) sur CrL4-Mb(His64Asp/Ala71Gly) en présence d'acide *m*-chlorobenzoïque qui montrent un signal caractéristique à $g = 1,97$.⁸⁴

(b) Centre métallique manganèse

De façon similaire à CrL4-Mb(His64Asp/Ala71Gly), de nouvelles métalloenzymes artificielles MnLn-Mb(His64Asp/Ala71Gly) ont été mises au point par l'incorporation de complexes de Manganèse dérivés de base de Schiff (motifs salen et salophène, respectivement 3,3'-Me₂-salen L5 et 3,3'-Me₂-salophène L6).⁴⁴

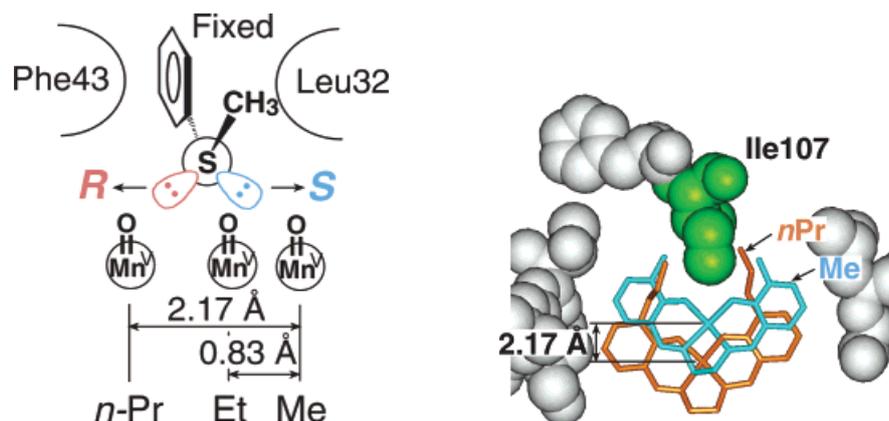


Figure 30. Gauche : Schématisation de la régulation de l'énantiosélectivité de la catalyse de sulfoxydation du thioanisole provoquée par un déplacement du métal en fonction de l'encombrement des substituants du ligand en position 3,3' : Me, Et ou n-Pr. Droite : Superposition des modèles de complexes de Mn-salen substitués en position 3,3' soit par des méthyles (bleu), soit par des propyles (orange). Modèles calculés grâce au programme InsightII/Discover 3 à l'aide du champ de force ESFF.⁴⁴

Si l'activité catalytique de MnL6-Mb(His64Asp/Ala71Gly) testé en catalyse d'oxydation du thioanisole reste toujours modeste ($158 \cdot 10^{-3}$ cycles.min⁻¹ pour un nombre de cycles catalytiques max = 2) celle-ci se montre légèrement supérieure à celle atteinte par son homologue à chrome. Le nouvel hybride MnL6-Mb(His64Asp/Ala71Gly) offre aussi la possibilité de tripler l'excès énantiomérique en sulfoxyde (S) (ee : 23% contre 8%). En effet, les études de la structure de l'hybride MnL6-Mb(Ala71Gly) simple mutant (MnL6-Mb(His64Asp/Ala71Gly) ne cristallise pas) montrent des interactions hydrophobes entre les groupements méthyles en position 3-3' de MnL6 et le résidu Ile107. Ces interactions permettent alors d'ancrer MnL6 dans la poche protéique un peu plus profondément qu'avec CrL4-Mb(His64Asp/Ala71Gly) ou même l'hème natif de la myoglobine. Cet effet semble amplifié par la présence de substituant plus encombrants que des groupements

méthyles en position 3-3' qui provoquent un léger déplacement du métal au sein de la cavité protéique tandis que grâce à de fortes interactions (groupement aromatique du thioanisole et les résidus Phe43 et Leu32) la position du substrat reste inchangée. La position relative entre l'atome de soufre et l'oxo-métal serait de ce fait altérée ce qui entraînerait un changement de l'énantiosélectivité de la catalyse de sulfoxydation (Figure 30). En effet, dans le cas de groupement éthyle ou propyle, on observe même une inversion d'énantiosélectivité en faveur de l'énantiomère *R* (jusqu'à *ee* : 13%).

Souhaitant poursuivre cette optimisation, les auteurs ont souhaité faciliter l'approche du substrat en augmentant l'espace libre dans la cavité du site actif. De nouveaux ligands ont alors été synthétisés en remplaçant le motif *o*-phénylènediamine par un motif éthylènediamine. L'hybride qui en résulte MnL5-Mb(His64Asp/Ala71Gly) présente un gain d'activité triplée (464 cycles.min⁻¹ contre 158 cycles.min⁻¹). Il est aussi intéressant de noter que le désencombrement de la cavité du site actif a permis d'augmenter l'énantiosélectivité de la catalyse avec un *ee* égal à 32 %.

Il est de plus intéressant de noter la chimiosélectivité dont font preuve ces métalloenzymes artificielles puisqu'il n'a pas été détecté de formation de sulfone. En effet, la présence de résidus apolaires dans la poche protéique empêche la suroxydation en favorisant l'éjection du sulfoxyde au profit du thioéther.

(2) Structures protéiques streptavidine

(a) Centre métallique manganese.

Suite aux travaux sur les hybrides myoglobines, Ward *et al* ont mis au point une nouvelle peroxygénase artificielle MnL7-Sav s'inspirant aussi du catalyseur de Jacobsen (Figure 31).⁶⁸ En premier lieu, MnL7-Sav a été élaborée par l'incorporation d'un complexe de Mnalen (L7) biotinylé dans la streptavidine. Si le catalyseur hybride a montré des aptitudes de sulfoxydation du thioanisole en présence de H₂O₂, son efficacité est à nuancer puisque le rendement reste inférieur à 21% avec un

modeste excès énantiomérique de 6% en faveur de l'énantiomère *R*. Les auteurs ont alors procédé à des mutations dirigées en portant une attention particulière aux résidus situés à proximité du complexe inorganique dont la Ser112. Dans le cas de l'hybride MnL7Sav(Ser112Gly) (remplacement de la sérine par une glycine) on observe une augmentation de l'activité catalytique jusqu'à 34% de rendement en sulfoxyde accompagnée d'une sensible amélioration de l'énantioselectivité (ee : 11%). Fait intéressant, la modification de la seconde sphère de coordination inverse l'énantioselectivité de la sulfoxydation puisque cette fois l'énantiomère *S* est le stéréoisomère préférentiellement formé.

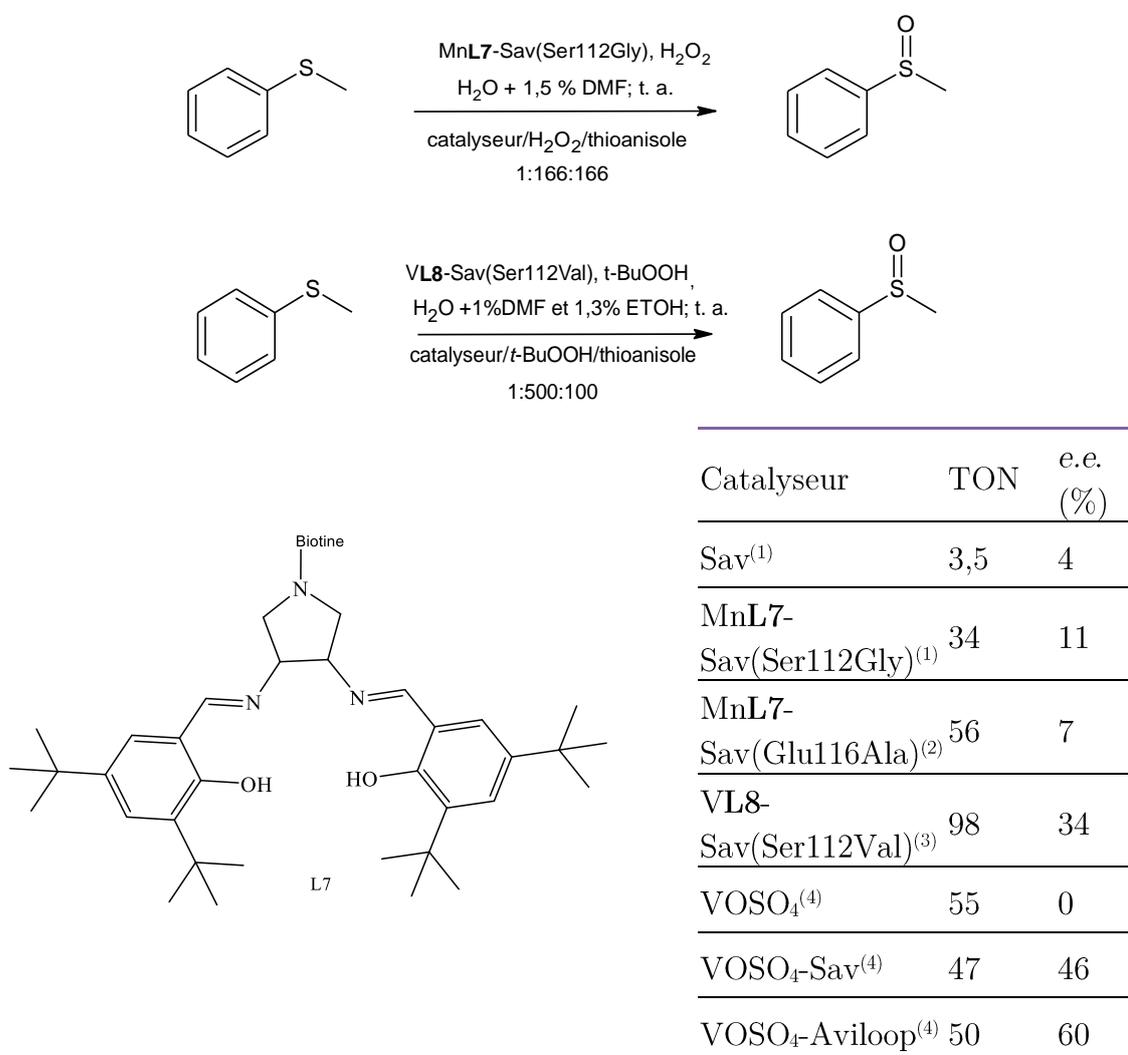


Figure 31. Réaction de sulfoxydation catalysée par des complexes de Mn et V en présence de Sav native ou mutée. Conditions : sulfoxydation par l'hybride catalytique correspondant du (1) thioanisole (1 mM) en présence de H₂O₂ (5 mM), de la protéine Sav(Ser112Gly) (30 μM) et du complexe MnL7 (100 μM) dans 1,5% DMF dans H₂O à température ambiante ; (2) thioanisole (10

mM) en présence de t-BuOOH (50 mM), de la protéine Sav(Glu116Ala) (100 μ M) et du complexe MnL7 (200 μ M) dans 1,5% DMF dans H₂O à température ambiante ; (3) thioanisole (10 mM) en présence de t-BuOOH (50 mM), de la protéine Sav(Ser112Val) (100 μ M) et du complexe VL8 (200 μ M) dans 1% DMF dans H₂O à température ambiante ; (4) thioanisole (0,1 M) en présence de t-BuOOH (50 mM), de la protéine Aviloop (Ser112Gly) (100 μ M) et du complexe VOSO₄ (200 μ M) dans 2,3% EtOH dans tampon HCl / KCl 0,05 M pH 2,2.

Une approche chimiogénétique a ensuite été réalisée en vue d'optimiser ces catalyseurs hybrides. Ainsi, de nouveaux ligands ont été synthétisés afin de diversifier l'emplacement de la liaison de biotinylation. MnL7-Sav(Glu116Ala) a d'ailleurs permis d'accéder à des rendements de l'ordre de 56%, soit 3,5 fois plus qu'avec MnL7-Sav. En revanche, aucune amélioration de l'énantiosélectivité n'a été observée (*ee* : 7% (*R*)).

La modeste activité des hybrides Mn-Sav en catalyse de sulfoxydation ainsi que les très faibles excès énantiomériques, en dépit des efforts d'optimisation, ont mené les auteurs à se tourner vers un métal de transition plus approprié.

(b) Centre métallique vanadium.

De nouvelles métalloenzymes V-Sav ont été mises au point en s'appuyant sur les travaux précédents et sur les connaissances de réactivité des complexes de vanadium en sulfoxydation asymétrique.^{67,85} En effet, les complexes de vanadium de types salen ou portant des ligands tridentates O-N-O en présence de peroxyde de cumyle ou de H₂O₂ ont montré leur capacité à catalyser efficacement le transfert d'oxygène.^{82,86}

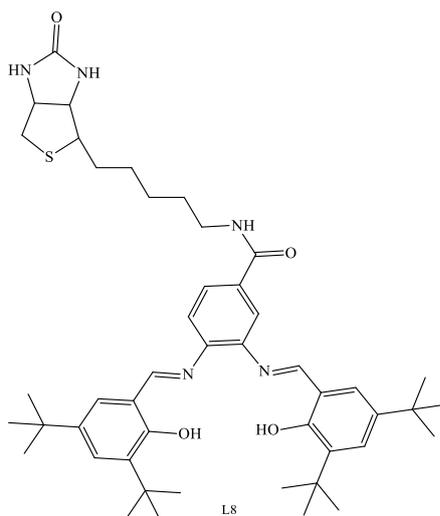


Figure 32. Structure du ligand **L8** employé par Ward and coll. comme ligand du vanadium en réaction de sulfoxydation.

Ainsi, avec VL8-Sav(Ser112Val) (Figure 32), un excès énantiomérique de 34% (*R*) et des rendements quantitatifs (98%) sont accessibles pour la catalyse de sulfoxydation du thioanisole en utilisant de l'hydroperoxyde de tert-butyle comme oxydant. Toutefois, malgré la diversité des mutants ou des sous-unités inorganiques impliqués dans la formation du catalyseur hybride les résultats obtenus restent très similaires (*cf* tableau, Figure 31).⁸⁵ Ces études ont finalement mis en évidence une dissociation du complexe inorganique aboutissant à la formation d'une seule et même espèce catalytique, atteignant le maximum de son efficacité à pH acide: $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$. Fait intéressant, en l'absence d'ancre biotine l'ion vanadyle se positionne au sein de la poche où se lie normalement la biotine (Figure 33). Les auteurs ont alors chargé la streptavidine directement avec des sels de vanadium.⁶⁷ De très bons rendements ont été obtenus avec un e.e. de 46% dans le cas de l'oxydation du thioanisole (Figure 31) qui augmente en fonction de la substitution du substrat, jusqu'à 93% dans le cas du méthylnaphtylsulfure.

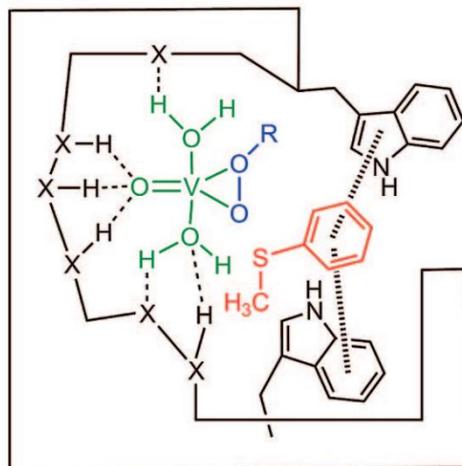


Figure 33. Illustration de l'insertion directe d'un sel de vanadium au sein de la streptavidine et reconnaissance du substrat.

Afin de renforcer la sélectivité de la catalyse de sulfoxydation obtenue par les catalyseurs hybrides précédemment décrits, Ward *and coll.* ont décidé de perturber l'environnement de l'ion vanadyle notamment au niveau de la boucle L-3,4.⁶⁷ En effet, si celle-ci maintient la biotine dans son site de fixation, des études de modélisations de l'ion vanadyle au sein de la streptavidine montre la boucle L-3,4 dans une conformation ouverte. Une streptavidine «chimérique» a alors été développée en remplaçant la boucle L-3,4 par celle de la protéine avidine (Figure 34). La nouvelle protéine, disposant d'une boucle L-3,4 plus longue de trois résidus, a ainsi été nommée Aviloop. $[\text{VO}]^{2+}$ -Aviloop conserve l'efficacité de ces prédécesseurs avec un rendement quantitatif (100%) en sulfoxyde de méthyle et phényle et présente l'avantage d'augmenter l'excès énantiomérique à 60%.

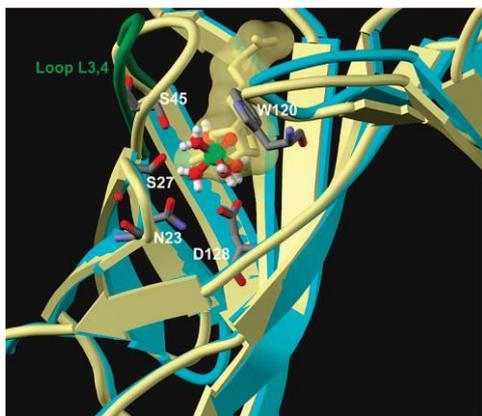
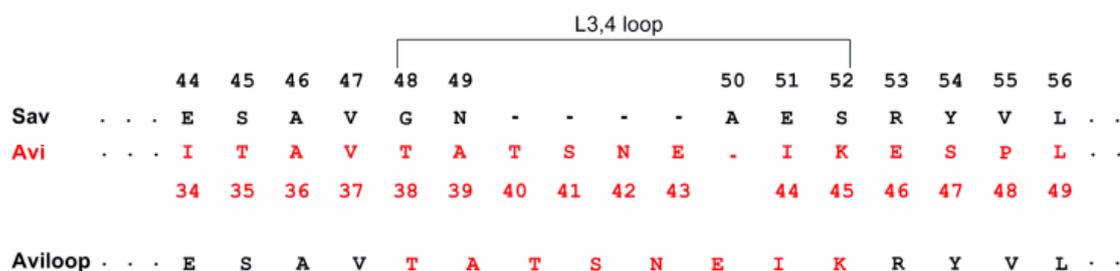


Figure 34. Conception d'Aviloop en incorporant un fragment de la séquence peptidique de la protéine avidine dans celle de la streptavidine au niveau de la boucle L-3,4.

Superposition de la structure $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ (représentée en Ball & sticks) dockée dans la streptavidine (en bleu) avec la structure obtenue par diffraction des rayons X de la biotine insérée dans la streptavidine (en jaune) (code PDB : 2IZG). En vert, on peut voir la boucle L3,4, mobile, qui ne se referme pas sur le complexe de vanadium alors que la même boucle (en jaune) se referme sur la biotine.

(3) Structures protéiques BSA/HSA

L'ancrage de complexes corroles au sein de diverses sérum albumine (de porc, de mouton, de lapin, etc...) Fe(III)/Mn(III)L9 a été rendu possible par la présence de substituants de type acide sulfonique ainsi que de chaînes perfluorées (Figure 35).⁸⁷ En effet, ces derniers interagissent fortement avec l'albumine par la présence d'interactions hydrophobes et hydrophiles. En présence d'iodosylbenzène, MnL9-BSA permet d'accéder à de très bons rendements en sulfoxyde de méthyle et phényle (92%) avec une énantiosélectivité de 32% en faveur de l'énantiomère *S*. Toutefois, des études UV-visible ont permis d'observer une dégradation de 20% du catalyseur après 1h30 de catalyse. L'hybride fer s'est, quant à lui, montré plus instable avec une dégradation beaucoup plus rapide. L'utilisation d'un autre oxydant comme H_2O_2 a toutefois permis d'augmenter la stabilité de ces catalyseurs. L'efficacité de la catalyse de sulfoxydation du thioanisole est alors plus faible avec des rendements en sulfoxydes inférieurs à 84%. Elle permet cependant d'accéder à des excès

énantiomériques plus élevés, atteignant jusqu'à 52% dans le cas de MnL9-BSA. Cette différence de réactivité est expliquée par la formation d'espèces oxydantes différentes. En effet, tandis que la présence de PhIO génère des espèces actives comme l'oxomanganèse (V), H₂O₂ se coordonne au métal pour former un intermédiaire M-(H₂O₂) capable d'oxyder le peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et en une molécule d'eau. Enfin, si H₂O₂ rentre en compétition avec le substrat, ce qui a pour effet de diminuer le rendement en sulfoxyde, plus particulièrement avec FeL9BSA, c'est précisément cette réactivité de catalase qui permet de prévenir la dégradation du catalyseur.

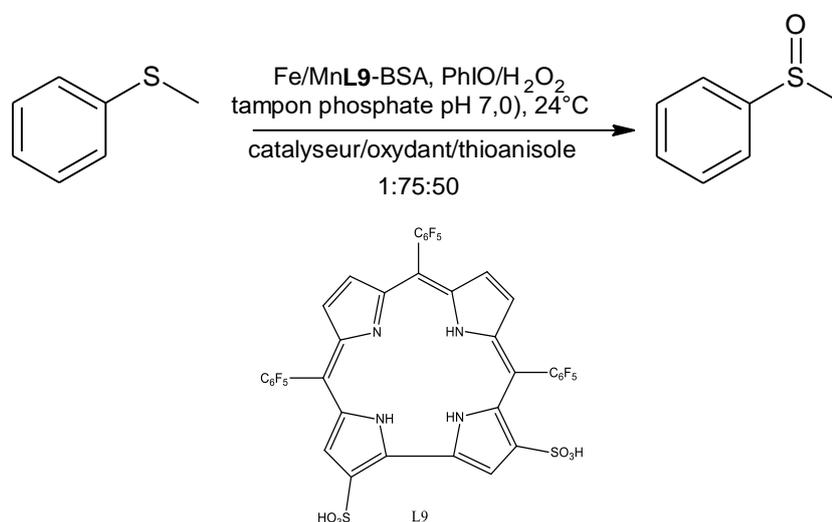


Figure 35. Hybrides à base d'albumine et de métal-corrole pour la réaction de sulfoxydation du thioanisole.

Plus récemment, Ménage *and coll.* ont rapporté le développement d'une oxydase artificielle par l'introduction d'un complexe manganèse salen MnL10 au sein de HSA (Figure 36).⁸⁸ Une étude par compétitions, faisant intervenir différents ligands connus de HSA, a montré qu'en dépit des nombreux sites de fixations existants dans la protéine, l'insertion du complexe se fait de manière très ciblée au sein de la crevasse centrale.

Concernant la réactivité de MnL10-HSA, les tests de catalyse d'oxydation du thioanisole en présence d'hypochlorite de sodium (NaOCl) ont permis d'atteindre des

rendements quantitatifs en sulfoxyde de méthyle et de phényle (97%). De plus, l'hybride montre une grande stabilité, puisqu'il fait preuve d'une efficacité notoire en effectuant plus de 1200 cycles catalytiques. Enfin, bien qu'aucune énantiosélectivité n'ait pu être observée, MnL10-HSA fait preuve d'une grande chimiosélectivité puisque lors de la catalyse d'oxydation du thioanisole aucune trace de sulfone n'a été détectée. Ce n'est qu'après 475 cycles catalytiques qu'une légère décroissance de cette sélectivité est observée. Lors des tests de contrôle le complexe libre s'est lui aussi montré actif (59% de rendement) mais présente une inversion de la sélectivité puisqu'il forme majoritairement le produit de suroxydation (rendement de 96% en faveur de la sulfone de méthyle et de phényle). Ces résultats montrent que l'environnement protéique, à la fois polaire et hydrophobe, de la seconde sphère de coordination de MnL10 s'avère être crucial pour la sélectivité de la catalyse.

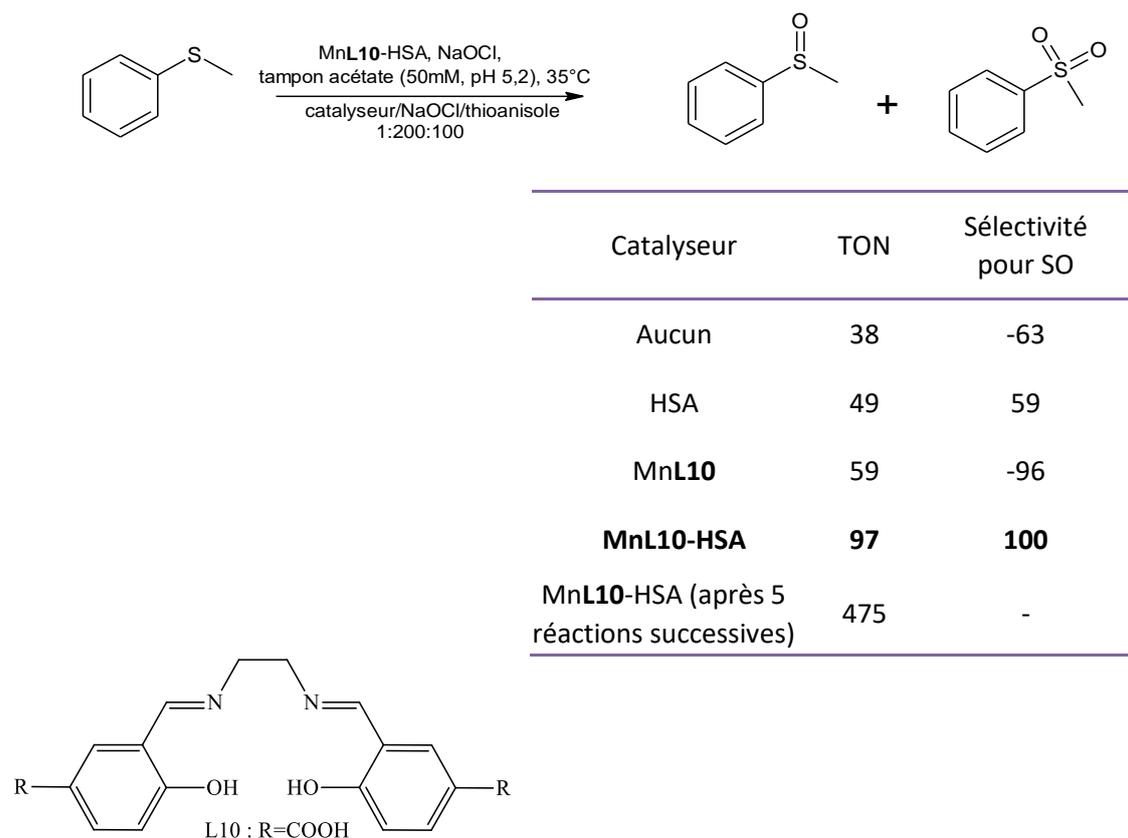


Figure 36. Réaction de sulfoxydation catalysée par l'hybride MnL10-HSA.

(4) Structure protéique Xylanase

Les hémozymes à base de la xylanase XlnA présentées au paragraphe II-2-c-i) (Figure 20) sont également des exemples probants de la coopérativité développée au sein des métalloenzymes artificielles afin d'améliorer la sélectivité des réactions d'oxydation. Le complexe FeL11 seul est, en effet, capable d'oxyder le thioanisole avec de très bons rendements (93% pour 162 TON en présence d'imidazole, Figure 37) et une très bonne chimiosélectivité puisque seul le sulfoxyde est observé.⁵² Toutefois, dans ces conditions, aucune énantiosélectivité n'est observée. Alors que lorsque le complexe est inséré dans la XlnA, les rendements restent constants (85% pour 145 TON en présence d'imidazole, Figure 37) mais la réaction devient énantiosélective. Un excès énantiomérique de 40% a pu être mesuré en faveur de l'énantiomère *S*. On observe que l'ajout d'imidazole dans le milieu réactionnel conduit à une augmentation drastique de l'efficacité du catalyseur comme souvent décrit pour la réactivité des métalloporphyrines. En effet, l'imidazole joue à la fois le rôle de ligand axial donneur pour le fer catalytique et de base favorisant la rupture de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène.

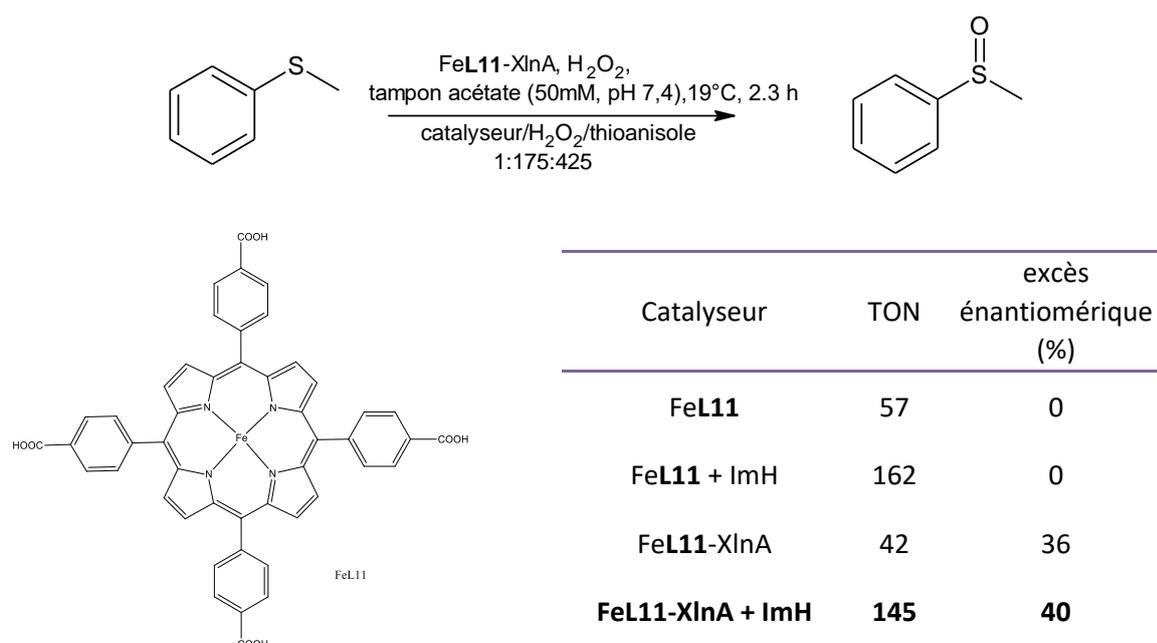


Figure 37. Réaction de sulfoxydation catalysée par l'hybride FeL11-XlnA.

(5) Structure protéique Nika

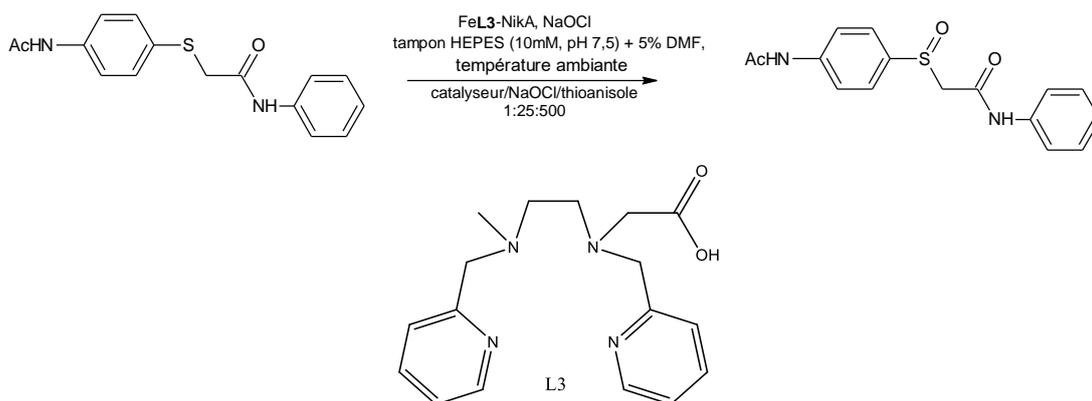


Figure 38. Catalyse de sulfoxydation asymétrique par FeL3-Nika en présence de NaOCl.

FeL3-Nika, dont la conception a été détaillée précédemment (II-2-c-i)), a été mis au point afin de procéder à de la catalyse de sulfoxydation de substrats d'intérêts pharmaceutiques.⁴⁵ Pour ce faire, des calculs d'accostages moléculaires ont été réalisés (Figure 39) à partir des structures de l'hybride et d'une base de données (Zinc).⁸⁹ La sélection de substrats thioéther contenant le motif thioanisole s'est faite en s'appuyant entre autres sur la taille du substrat, la distance entre le métal et l'atome de soufre. Une famille de molécules, comportant un motif thioglycolamide (R1-SCH₂CONH-R2), dont la structure est similaire à celle du principe actif de l'oméprazole, a alors pu être identifiée. Des tests de catalyse d'oxydation en présence de NaOCl ont alors été effectués sur les substrats S1-S6.

La catalyse d'oxydation de **S1** par FeL3-Nika en présence de NaOCl, se fait avec un bon rendement (près de 70%) en sulfoxyde correspondant. De plus, la catalyse menée par FeL3-Nika est chimiosélective puisqu'aucun autre produit d'oxydation n'a été observé. Une étude a ensuite été menée pour comprendre l'influence de divers substituants du substrat sur l'efficacité de la catalyse. Pour ce faire, FeL3-Nika a été testé sur les substrats **S2** à **S6**. Tandis que pour le substrat **S3** (le substrat le plus encombrant) le sulfoxyde correspondant est obtenu avec seulement 40% de rendement, **S2** (substitué par un méthyle en R1) permet d'atteindre jusqu'à 78% de

rendement. Si le sulfoxyde correspondant est formé à chaque fois, les contraintes stériques générées par les substituants modulent le rendement de catalyse.

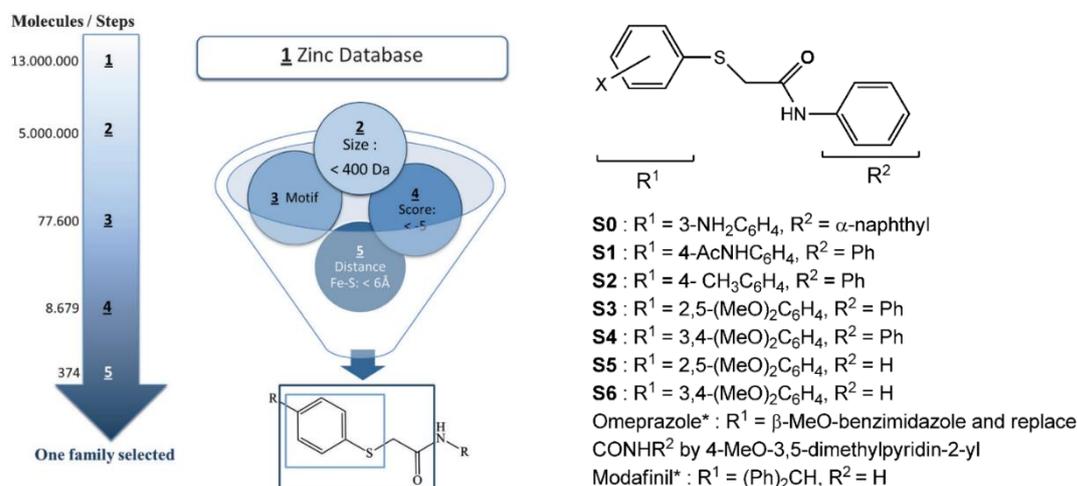


Figure 39. Représentation schématique de la procédure d'accostage moléculaire et substrats retenus et synthétisés pour les tests catalytiques.

La catalyse d'oxydation de **S5** et **S6** se démarque complètement puisque l'efficacité et la chimiosélectivité obtenue en absence ou en présence de FeL3-NikA sont très similaires. En effet, une étude d'accostage moléculaire plus approfondie a permis d'identifier le meilleur site de liaison des substrats au sein de la cavité de la protéine. Par exemple, la Figure 40 montre les positions préférentielles du substrat **S5** (en violet) loin de l'atome de fer et de la position du meilleur substrat identifié (en vert). En raison d'une taille plus petite et de l'absence du groupement phényle en R₂, **S5** et **S6** n'interagissent pas de la même façon avec NikA que leurs homologues phénylés. Cependant, malgré une très bonne activité de FeL3-NikA, l'énantiosélectivité reste faible puisque l'excès énantiomérique mesuré ne dépasse pas les 10%.

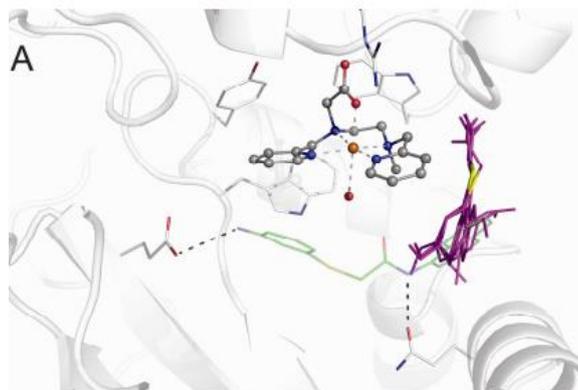


Figure 40. Illustration des résultats d'accostage moléculaire menés sur le substrat **S5**.

(6) Conclusion

La conception de métalloenzymes artificielles capables de catalyser des réactions de sulfoxydation à certainement été la plus étudiée dans le domaine des réactions d'oxydation. Ainsi, on dispose d'une diversité concernant le métal (Fe, Mn, Cr, Os, V), la protéine (Mb, Sav, Aviloop, HSA, NikA) et l'oxydant (H_2O_2 , tBuOOH, NaOCl) ce qui permet une fine comparaison. Un tableau récapitulatif de la réactivité est présenté en fin de chapitre (Tableau 2). En comparant les entrées 2 à 8, avec l'entrée 1, l'oxydant est à chaque fois H_2O_2 , on remarque l'importance du choix du métal, puisque seul le complexe de fer décrit par Katsuki *et al.* est capable de rivaliser avec la naphthalène dioxygénase (NDO) (fer non-héminique) en rendement, nombre de cycles catalytiques et excès énantiomérique. Tous les systèmes à centre manganèse se montrent bien moins performant que les systèmes à fer (<56% vs <91% de rendement, respectivement). De même, lorsque le manganèse est remplacé par un atome de chrome, le rendement est plus faible encore. Enfin, le complexe de fer de Katsuki permet d'atteindre d'excellents excès énantiomériques en raison de la structure 3D complexe de son ligand comparé aux ligands dérivés de salen qui sont plus plans. Pour finir, les entrées 9 à 12 concernent les systèmes utilisant t-BuOOH ou NaOCl comme oxydant, et qui permettent d'ailleurs d'atteindre des nombres de cycles catalytiques plus élevés. Aviloop montre l'intérêt d'un contrôle précis de la seconde sphère de coordination avec le meilleur excès énantiomérique obtenu par un

hybride. Bien que MnL9-HSA et FeL3-NikA ne conduisent qu'à des ee très faibles voire nul, ce sont les seuls à être aussi performant que NDO avec un nombre de TON élevé pour FeL3-NikA (173 TON), ou surpassant même NDO pour MnL9-HSA (475 TON).

II) Epoxydation

De par la tension portée par leurs cycles à trois chaînons, les époxydes sont des composés très réactifs face à divers nucléophiles. Cette propriété leur permet une conversion en composés 1,2-difonctionnels possédant 2 centres stéréogènes. Les époxydes sont donc des intermédiaires polyvalents en chimie organique et sont particulièrement intéressants pour la préparation de principes actifs. Des études de développement de systèmes catalytiques ont été menées par les travaux de Sharpless et Katsuki sur des complexes de manganèse de type salen en présence d'iodosylbenzene pouvant induire jusqu'à 91% d'excès énantiomériques.⁹⁰ Plus récemment, Costas *and coll.* ont proposé des complexes de manganèse dérivés de bipyrrolidinediamines. Ces derniers catalysent l'époxydation d'alcènes en présence d'oxydant doux comme l'acide peracétique généré *in situ* ($H_2O_2/AcOH$) avec 46% d'excès énantiomérique.⁹¹ C'est dans cette lignée que les premières métalloenzymes artificielles capables d'époxydation ont été conçues avec une sous-unité à centre manganèse.

(1) Structure protéique Xylanase

Suite à leurs travaux sur la conception de métalloenzymes artificielles catalysant la sulfoxydation Mahy *and coll.* ont étudié l'activité d'oxydation d'un nouvel hybride MnL11-XLnA. En remplaçant l'atome de fer catalytique par un atome de Mn, les auteurs ont pu obtenir une nouvelle réactivité. MnL11-XLnA a alors été testée en condition d'oxydation du styrène en présence de l'oxydant $KHSO_5$.⁵³

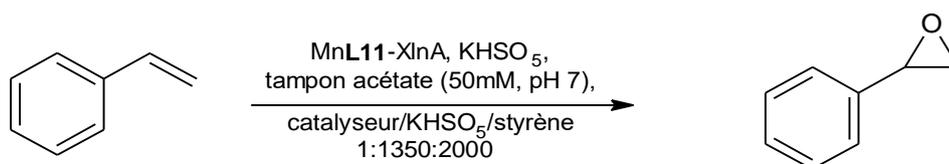


Figure 41. Réaction d'époxydation énantiosélective du styrène par l'hybride MnL11-XLnA.

L'époxyde correspondant est ainsi obtenu avec 17% de rendement bien qu'il soit accompagné de la formation de produits de suroxydation : phénylacétaldéhyde et benzaldéhyde et donc une chimiosélectivité de 60%. Une légère énantiosélectivité a été mesurée à 8,5% en faveur de l'énantiomère *S*. Afin d'optimiser la sélectivité et la productivité de la catalyse, d'autres oxydants ont été testés. Mais, H₂O₂, NaIO₄ ou tBuOOH n'ont pas permis d'observer la formation de produit d'oxydation. Bien que NaOCl permette la formation d'une espèce oxydante catalytiquement active, la conversion du substrat reste très faible (1%).

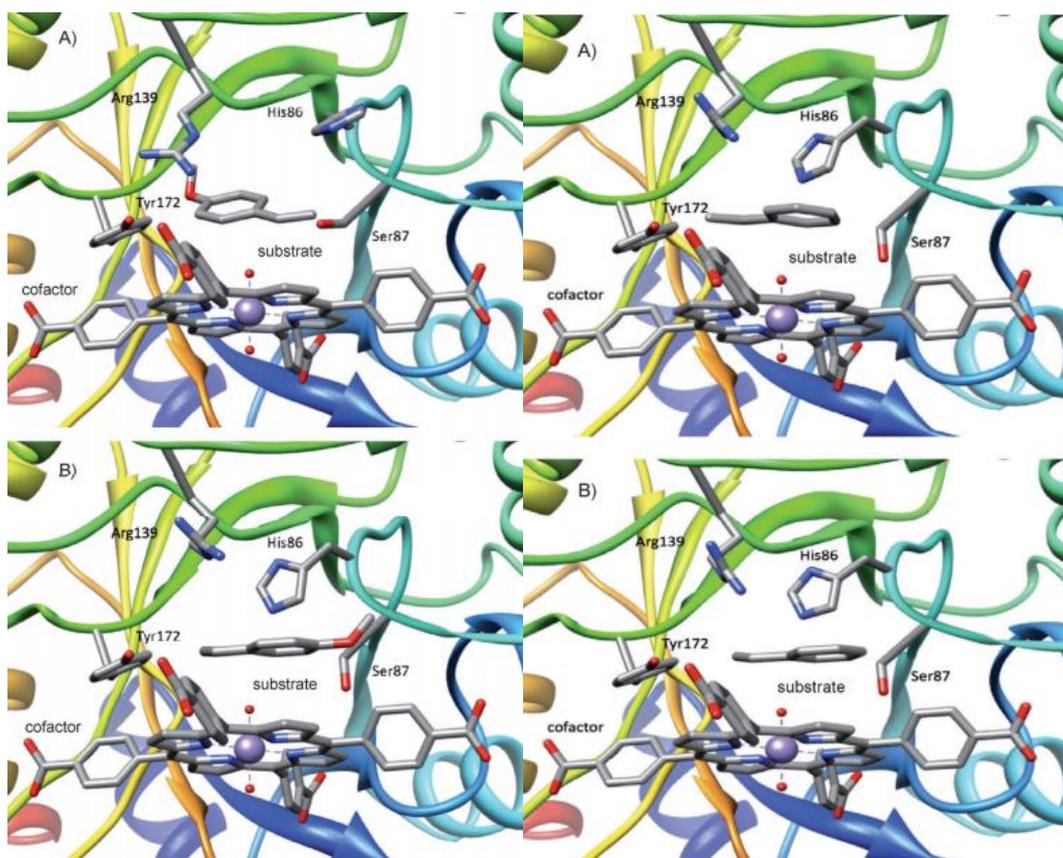


Figure 42. Gauche : Modèle de MnL11-XLnA montrant la position du 4-méthoxystyrène dans le site actif pour A) approche produisant l'énantiomère *R* et B) approche produisant l'énantiomère *S*. Droite : Modèle de MnL11-XLnA montrant la position du styrène dans le site actif pour A) approche produisant l'énantiomère *R* et B) approche produisant l'énantiomère *S*.

Si le complexe inorganique MnL11 libre en solution permet d'atteindre des rendements similaires à ceux obtenus par l'hybride (12% contre 17%), la cinétique de la catalyse est plus rapide avec MnL11-XLnA qu'avec sa sous-unité organique seule (1,05 cycles.min⁻¹ contre 0,79 cycles.min⁻¹). Ce suivi cinétique met en évidence le double apport de la structure protéique. Toutefois, c'est en changeant de substrat que les auteurs ont pu montrer plus clairement l'apport de la protéine à la catalyse. En effet, le 4-méthoxystyrène est oxydé à la fois par le complexe MnL11 et par l'hybride correspondant avec des rendements voisins de 12 et 16%, respectivement. Par contre, la présence de l'hybride permet d'obtenir un e.e. de 80% et, de façon surprenante, en faveur de l'énantiomère *R*. Cette nette amélioration de l'e.e. assortie d'une inversion de la sélectivité par rapport à la nature du substrat a pu être justifiée par les auteurs grâce à des expériences d'accostage moléculaire réalisées avec le programme Gold (version 5.0)⁹² (Figure 42) qui montrent des interactions favorables entre le groupement méthoxyle et la Tyr172 plus un carboxylate du ligand dans le cas d'une approche conduisant à l'énantiomère *R* pour le 4-méthoxystyrène, alors que le styrène, lui, ne présente pas vraiment d'approche préférentielle.

(2) Structure protéique Anhydrase carbonique

L'équipe de Kazlauskas et celle de Soumillion ont étudié les effets d'une métalloenzyme artificielle lors d'oxydation d'oléfines.^{93,94} Dans les deux études, l'atome de zinc natif de l'anhydrase carbonique humaine (hCA) a été remplacé par un atome de manganèse (Figure 43).

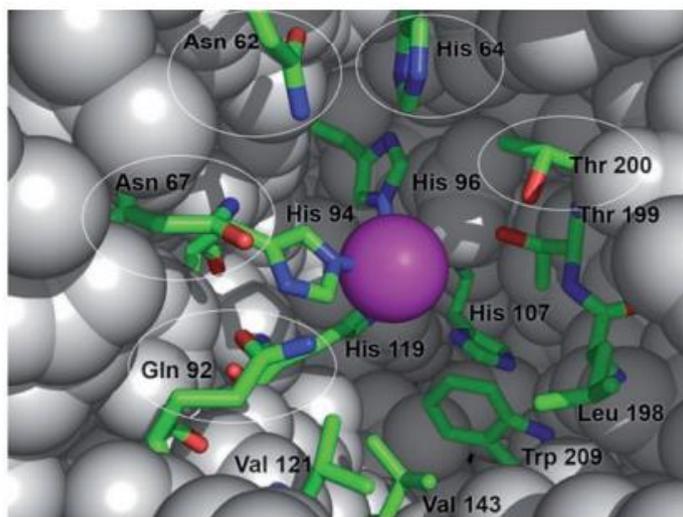


Figure 43. Modèle de la structure de l'anhydrase carbonique humaine dans laquelle l'atome de zinc a été substitué par un atome de manganèse (sphère violette).⁹³

Le catalyseur hybride correspondant a été testé en condition oxydante sur le styrène.⁹⁴ En présence de H_2O_2 et de bicarbonate de sodium, des analyses par chromatographie en phase gazeuse (CPG) montrent la formation de l'oxyde du styrène avec un rendement modéré de 29% (soit 0,54 TON). Cette faible réactivité s'explique par une dégradation de l'hybride démontrée par une expérience de cinétique suivie par spectrométrie de masse. Aux vues des conditions de catalyse, à savoir, un milieu tamponné par du carbonate d'hydrogène, les auteurs proposent la formation de peroxymonocarbonate (HCO_4^-) en tant qu'agent de transfert d'oxygène. Quant à la sélectivité, la catalyse d'époxydation du styrène par Mn-hCA favorise la formation de l'énantiomère *R* avec un excès énantiomérique de 40%. Des mutations dans la poche hydrophobe de Mn-hCA ont d'ailleurs montré l'implication du résidu Thr199 dans l'induction asymétrique puisque les mutants correspondants ne montrent pas d'excès énantiomérique. Devant ces résultats prometteurs, des études de remplacement de l'anhydrase carbonique humaine par son homologue bovin (bCA) ont permis d'augmenter l'e.e. jusqu'à 52% mais l'activité en est largement inhibée (9% contre 29%). Enfin, il faut noter l'existence d'un deuxième site de fixation métallique formé par la présence de cinq histidines périphériques (représentées en

bleue sur la Figure 44). Celui-ci entraîne une époxydation secondaire non asymétrique mise en exergue lors de l'augmentation de la concentration en H_2O_2 (57% de rendement mais 18% e.e.). Une façon de contrôler cette réactivité secondaire peut se faire par l'ajout de trois équivalents de diéthylpyrocarbonate (DEPC) particulièrement connu pour être sélectif des histidines. Mais si ces conditions permettent de retrouver un e.e. de 37%, elles inhibent alors grandement la réactivité de l'hydride (9% de rendement en présence de DEPC) probablement à cause de la gêne stérique engendrée.

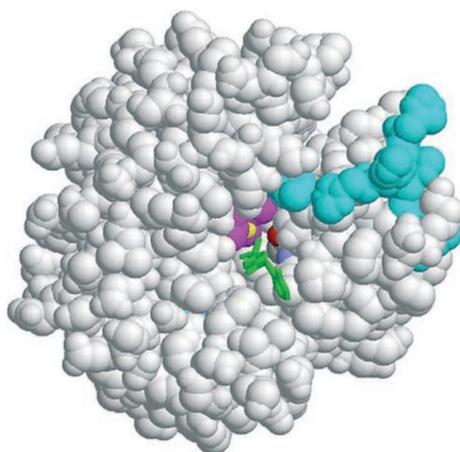


Figure 44. Structure de l'anhydrase carbonique (PDB 1G1D) montrant la présence des histidines périphériques en bleu.

(3) Conclusion

Les hybrides catalysant l'époxydation sont au nombre de deux et sont tous les deux composés d'un centre manganèse. Mn-hCA, comprenant seulement un ion métallique coordonné à la protéine, présente de meilleurs rendements que MnL11-XLnA (Tableau 2, entrées 16 et 15). Ceux-ci restent néanmoins largement inférieurs à ceux obtenus par leurs modèles biologiques et chimiques (Tableau 2, entrées 13 à 14). Cependant, la conception de métalloenzymes artificielles montre là tout son intérêt puisque les hybrides permettent de faire plus de cycles catalytiques que SMO.⁹⁵ Enfin, en ce qui concerne l'énantiosélectivité, le modèle biologique est encore le meilleur candidat grâce à l'environnement peptidique spécifique de son site actif.

III) Dihydroxylation

Le motif 1,2-diol est un motif courant dans de nombreuses molécules biologiques comme, à titre d'exemple, la famille des sucres ou certains alcaloïdes. Bien que de nombreux systèmes aient été développés avec un métal plus approprié que l'osmium le système le plus connu en matière de dihydroxylation reste le procédé développé par Sharpless avec le mélange ADmix/OSO₄.⁹⁶ Les deux hybrides conçus pour catalyser la dihydroxylation d'alcène s'inscrivent dans cette lignée.

(1) Structure protéique BSA

En 1983, Kokubo *and coll.* développèrent la première métalloenzyme artificielle à centre Osmium capable d'hydroxyler les oléfines.⁹⁷ Pour ce faire, la protéine BSA a été incubée en présence d'une solution aqueuse d'OSO₄. Bien qu'aucune structure cristalline de l'hybride n'ait été obtenue, celui-ci a pu être caractérisé par des études de spectroscopie UV-visible par la comparaison des signatures de l'hybride OsO₄-BSA et des complexes 2 et 3 (Figure 45). La similitude des bandes observées à 295 nm pour l'hybride et le complexe 3 mène à supposer que OsO₄ s'ancre dans BSA en coordonnant des amines tertiaires.

Après avoir proposé un mode d'ancrage, les auteurs ont testé la réactivité de ce système en oxydation d'alcène sur le styrène en présence de l'oxydant *t*BuOOH. Le substrat subit alors une *cis*-dihydroxylation avec un rendement de 7,6% (38 TON) et l'énantiomère *S* est obtenu avec un faible excès énantiomérique de 6%. Toutefois, si l'on retrouve la même performance sur le substrat α -méthylstyrène (40 TON) l'énantiosélectivité est considérablement augmentée jusqu'à 68%. Enfin, si ces résultats sont prometteurs, la chimiosélectivité reste néanmoins mauvaise car le produit majoritaire n'est pas le diol mais l'acétophénone, un produit de suroxydation.

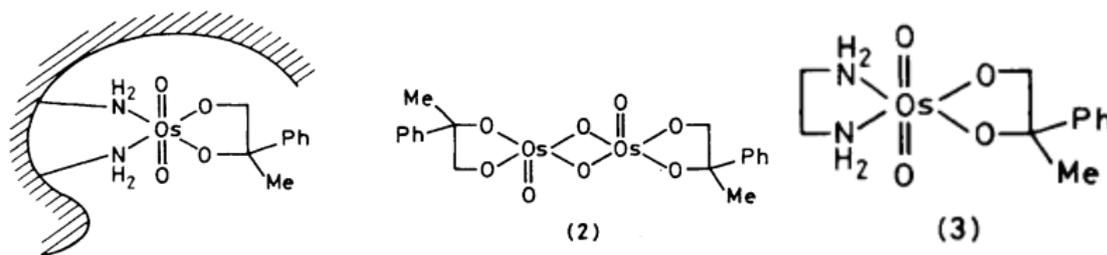


Figure 45. Modèle proposé pour le site actif d' OsO_4 -BSA mettant en évidence un ancrage d' OsO_4 par des amines tertiaires de la protéine présentes dans le site actif et complexes 2 et 3, complexes d'osmium synthétisés dans l'idée de spécifier le mode d'ancrage de l'osmium dans BSA.

(2) Structure protéique Streptavidine

Suite aux travaux de Kokubo, le groupe de T. Ward a approfondi la conception de dihydroxylases artificielles contenant un atome d'osmium en son centre.⁷¹ À ces fins, cinq charpentes protéiques ont été évaluées sur leur capacité à accueillir OsO_4 et, une fois hybridées, sur leurs performances en catalyse de dihydroxylation de l' α -méthylstyrène (le styrène n'a pas été testé). Ainsi les protéines hCA, lysozyme et BSA ne se sont montrées que très peu performantes avec 1, 6 et 4 TON, respectivement. Mais l'hybride OsO_4 -BSA permet quand même d'atteindre 77% d'excès énantiomérique (énantiomère *S*). Deux autres protéines ont été testées. L'hybride OsO_4 -avi peut effectuer 16 TON mais ne permet pas d'induction asymétrique. Cependant, son homologue OsO_4 -Sav se montre sans conteste le meilleur des cinq candidats pour diriger une catalyse de dihydroxylation avec 27 TON accompagnés d'un excellent *e.e.* de 95% en faveur de l'énantiomère *R*. On remarque toutefois une inversion de configuration par rapport à celle obtenue par OsO_4 -BSA (énantiomère *S* majoritaire). Une analyse structurale a été effectuée par diffraction des rayons X sur des cristaux de Sav préalablement trempés dans une solution de $\text{K}_2[\text{OsO}_2(\text{OH})_4]$. La structure montre la présence de plusieurs atomes d'Osmium par monomère suggérant que les TON sont faibles car tout l'Os ne se trouve pas dans un site de coordination adéquat pour effectuer la réaction. De plus, l'ajout de 1,05 équivalents de biotine par monomère de Sav, comme compétiteur du

métal, conduit à l'obtention d'un produit racémique. Cette observation permet de conclure quant à la position du métal actif au niveau du site de fixation de la biotine.

(3) conclusion

Dans la nature, la dihydroxylation asymétrique est supportée, entre autre, par la naphthalène dioxygénase (NDO) une enzyme à fer non-hémérique qui permet d'atteindre de très bon rendements et de bon excès énantiomériques (Tableau 2, entrée 16). Concernant les complexes de coordination de synthèse, des systèmes à centre manganèse et fer ont été décrits (porphyrines, BPMEN...) utilisant le peroxyde d'oxygène comme oxydant. Pourtant, la plupart des systèmes les plus performants en TON et en e.e. sont encore les complexes d'osmium. D'ailleurs, Kokubo *et al.*, tout comme Ward *and coll.*, ont ancré du OsO₄ dans BSA et Sav, respectivement, concevant deux nouvelles métalloenzymes artificielles. Entre les deux (Tableau 2, entrées 18 et 19), OsO₄-BSA est celle qui permet d'atteindre le plus haut nombre de TON bien que seul le réactif **AD-mix** β⁸⁰ (Tableau 2, entrée 17) soit compétitif avec NDO. Cependant, en termes d'e.e., OsO₄-Sav est alors le seul hybride à pouvoir rivaliser avec les modèles rappelant ainsi l'importance d'un contrôle spécifique de l'environnement du site actif.

IV) Hydroxylation aromatique

L'ultime défi dans la conception de métalloenzymes artificielles pour la catalyse de réaction d'oxydation reste le développement d'oxygénases artificielles faisant intervenir l'oxygène moléculaire comme seul oxydant. En effet, le dioxygène est un oxydant de choix puisqu'il est naturellement abondant et non-toxique pour l'environnement (H₂O comme sous-produit). O₂ étant toutefois un gaz inerte, il nécessite une activation afin d'être réactif vis-à-vis des molécules organiques.

Pour ce faire, la nature implique des métalloenzymes (oxygénases), capables de générer une forme réduite de l'oxygène moléculaire telle que superoxo, peroxy et oxo

avant de les transférer à un substrat d'intérêt (Figure 46). Les plus étudiées sont sans contestes les oxygénases à fer. On trouve ainsi dans cette famille les oxygénases à fer héminique dont les plus connues sont les cytochromes P450 à centre mononucléaire de fer III coordonné à une protoporphyrine. La seconde classe de cette famille, les oxygénases à fer non-hémiques, comprend quant à elle des oxygénases possédant un motif structural commun appelé la triade faciale 2-His-1-carboxylate. En effet, le fer est alors coordonné à deux His et à un Asp (ou Glu) de la protéine. La famille des oxygénases à fer non-hémiques est constituée, entre autres, des oxygénases de Rieske et des oxygénases α -cétoglutamates dépendantes.

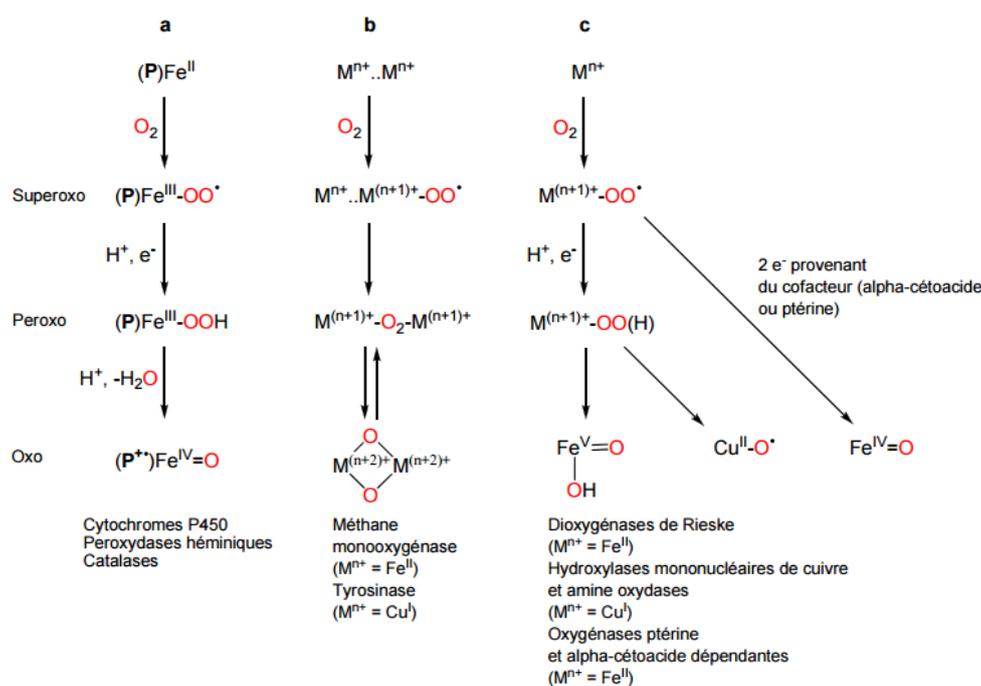


Figure 46. Différents mécanismes d'activation de l'oxygène moléculaire par des métalloenzymes **a** : à centre héminique, **b** : à centre métallique dinucléaire non-héminique, **c** : à centre métallique mononucléaire non-héminique. e⁻ = électron, M= métal, et P= porphyrine.

Ménage *and coll.* ont proposé le développement de la première oxygénase artificielle créée par l'insertion d'un complexe de coordination d'intérêt FeL12 (L12 : N-benzyl-N'-(2-hydroxybenzyl)-N,N'-ethylenediaminediacetic acid) dans la protéine Nika.⁷⁹ Pour cela, le complexe de fer(III) a, dans un premier temps, été synthétisé en s'appuyant sur des modèles inspiré d'arènes hydroxylases. Comme le montre la

structure cristalline de FeL12-NikA, le complexe est ancré dans la protéine par des interactions supramoléculaires comme mentionné dans le paragraphe A-II-2-c-i). La réactivité catalytique de l'hybride vis-à-vis de l'oxygène moléculaire a ensuite été suivie par des études de cristallographie cinétique (Figure 47). Des cristaux incolores de FeEDTA-NikA ont été trempés dans une solution du complexe FeL12 conduisant à l'obtention de cristaux de couleur pourpre. En effet, le profil d'absorption UV-visible des cristaux FeL12-NikA présente une bande d'absorption relative à un transfert de charge ligand-métal, attribué à la coordination du phénolate au fer (III). De plus, la structure cristalline de FeL12-NikA, obtenue avec une résolution de 1,8 Å, montre la substitution du FeEDTA par FeL12 dans le site de fixation.

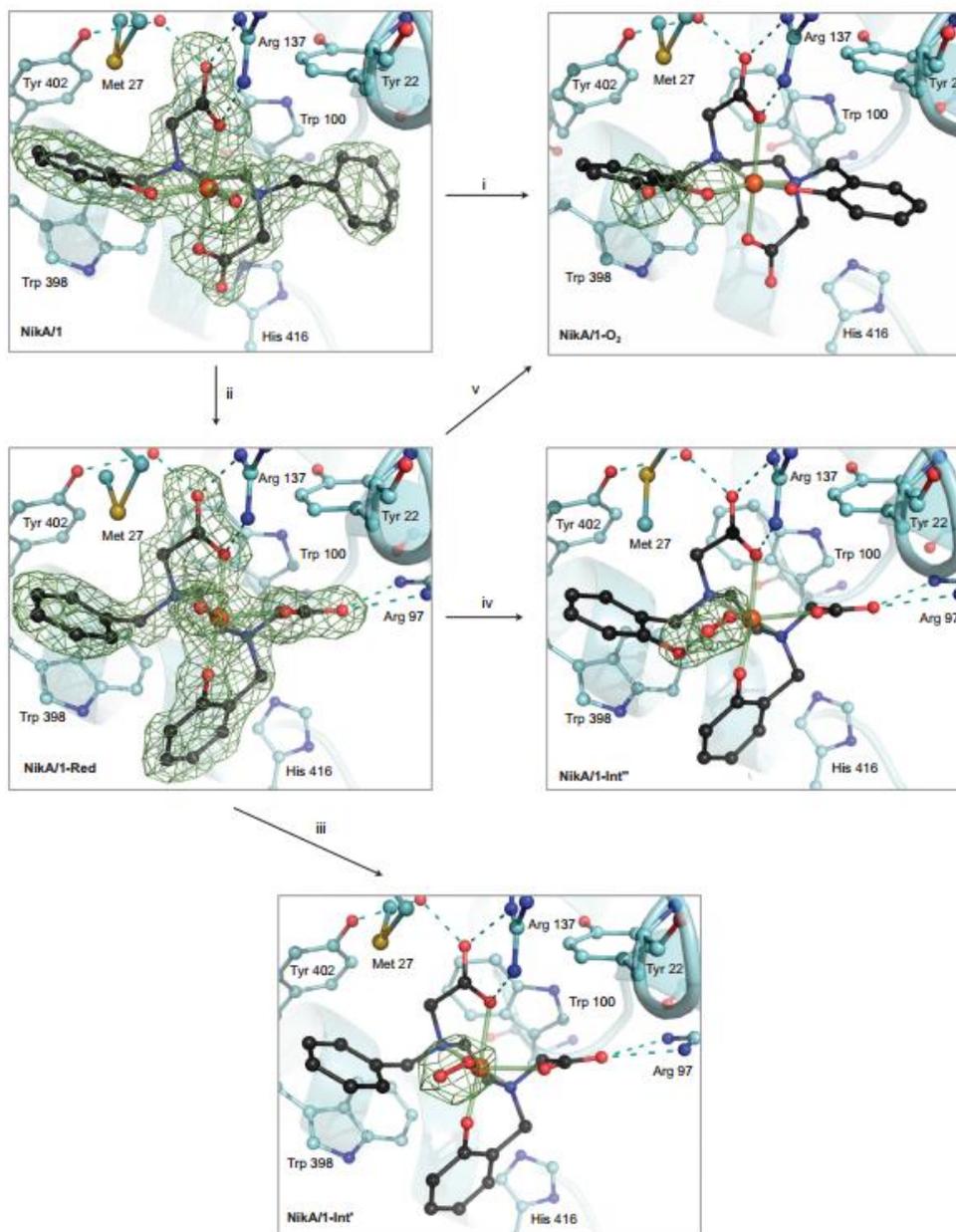


Figure 47. Résultats de l'étude cristallographique menée sur des cristaux de l'hybride **FeL12-NikA** montrant le mécanisme de dihydroxylation aromatique par O_2 .

Afin d'activer l'oxygène moléculaire, le fer doit ensuite être réduit à l'état $Fe(II)$ et nécessite donc l'emploi d'un partenaire réducteur. Pour ce faire, les cristaux ont été trempés dans une solution de dithiothreitol (DTT). Pour cette étude, l'activation de l'oxygène moléculaire a été effectuée en deux étapes, premièrement par la réduction du fer en présence de DTT en condition anaérobie afin de piéger l'intermédiaire réduit, puis par l'exposition des cristaux à l'air libre. Le traitement au DTT provoque un changement de couleur des cristaux et la structure montre un changement

conformationnel du complexe dans la cavité protéique où le phénolate et le groupement benzyle échangent leur position. De plus, le passage de l'état ferrique à l'état ferreux provoque une modification de la sphère de coordination puisqu'un des bras carboxylate s'oriente vers l'Arg97 pour former un pont salin avec cette dernière. L'ancrage grâce à l'interaction de l'Arg137 et du second carboxylate demeure conservé. L'exposition des cristaux à l'air libre entraîne une recoloration rouge de ces derniers. Les spectres UV-visibles s'avèrent alors être similaire à ceux de l'hybride FeL12-NikA mais présente un déplacement hypsochrome. Cette observation s'explique au regard de la structure obtenue pour FeL12-NikA/O₂ qui montre la présence de deux densités électroniques supplémentaires au niveau du groupement benzyle correspondant à un catéchol. Cette métalloenzyme montre donc son aptitude à activer O₂ puis à le transférer à un substrat par un mécanisme intramoléculaire. De nouvelles études cristallographiques ont d'ailleurs mis en évidence que la formation du catéchol se faisait par deux étapes d'hydroxylation aromatiques successives et ont permis de déterminer un mécanisme impliquant la formation d'un intermédiaire hydroperoxo.

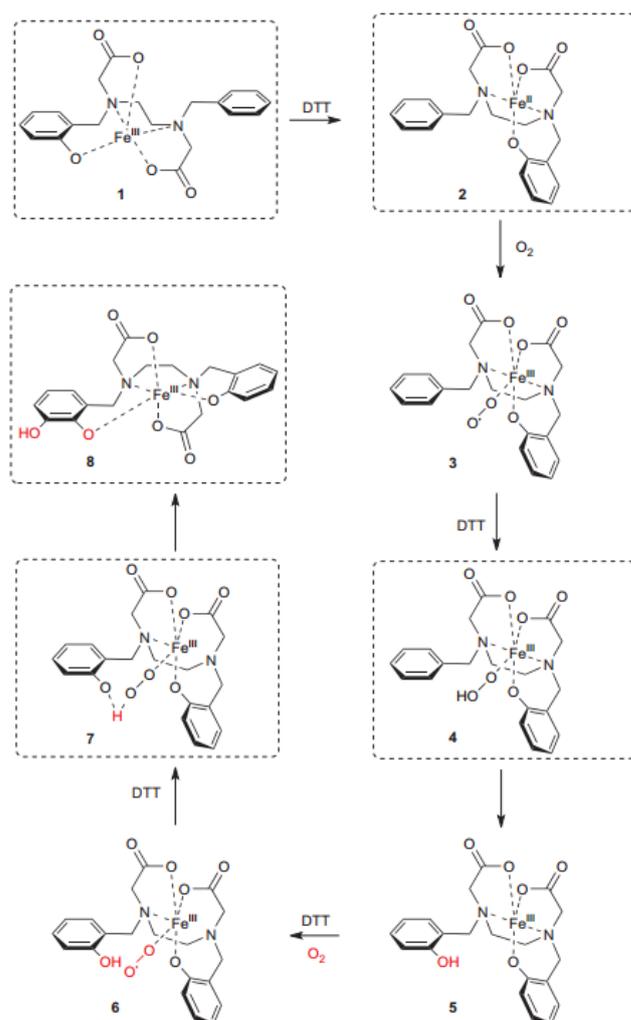


Figure 48. Mécanisme réactionnel proposé pour la catalyse de dihydroxylation du ligand **L12** en s'appuyant sur les structures cristallines ici entouré en pointillés.

Toutefois, la présence du catéchol nouvellement formé sature la sphère de coordination du fer et bloque son activité à seulement deux cycles catalytiques.

VI) Conclusion

Tableau 2. Tableau récapitulatif de la réactivité en catalyse d'oxydation des métalloenzymes artificielles.

Entrée	Biocatalyseur	Complexe modèle	Hybride	Rendement (%) (TON)	e.e. (%) (conf. Abs.)	Ref.
sulfoxydation						
1	NDO			100 (142)	63 (S)	98
2		FeL14		91 (91)	96 (S)	99
3		FeL15		15(1,5)	25 (R)	100
4			MnL5-Mb(H64D/A71G)	<0,15 (1,5)	32 (S)	44
5			MnL6-Mb(H64D/A71G)	<0,05 (0,5)	23 (S)	44
6			MnL7-Sav(S112G)	34 (14)	11 (S)	68
7			MnL7-Sav(E116A)	56 (28)	7 (R)	101
8			CrL4-Mb(H64D/A71G)	<0,02 (2)	8 (S)	44
9			VOSO ₄ -Aviloop	Quant. (50)	60 (R)	67
10			MnL10-HSA	97 (97)	-	88
11			MnL10-HSA ^{a)}	92 (475)	-	88
12			FeL3-NikA ^{b)}	78 (199)	10 (-)	45
Epoxydation						
13	SMO			100 (1)	100 (S)	95
14		Mn(R,R,R)-BPBPP		95 (9,5)	46 (S)	91
15			MnL11-XLnA	17 (23)	85 (S)	53
16			Mn-hCA	29 (5)	40 (R)	94
Hydroxylation						
16	NDO			100 (142)	79 (R)	102
17		Fe (OsO ₄ (AD-mix β))		Quant. (100)	97 (R)	80
18			OsO ₄ -BSA	7,6 (38)	6 (S)	97
19			OSO ₄ -Sav ^{c)}	68 (27)	95 (R)	71

a) Après 5 additions successive de substrat et d'oxydant. b) Substrat : N-phényl-S-toluythioglycolamide. c) Substrat : α -méthylstyrène. Avec SMO = Styrène MonoOxygénase, hCA = human Carbonic Anhydrase, NDO = Naphtalène DiOxygénase, Mb = Myoglobine, Sav = Streptavidine, Aviloop = streptavidin modifiée par l'insertion de la boucle L3,4 de l'avidine (résidus 38-45), HSA = Human Serum Albumin.

Il existe donc plusieurs exemples de métalloenzymes artificielles capables d'oxyder des substrats de nature variable avec des rendements, TON et e.e. modérés à élevés. Les métalloenzymes artificielles ne peuvent pas toujours entrer en compétition avec les enzymes naturelles en termes d'efficacité ou d'e.e. (Tableau 2), toutefois elles ont

le grand avantage de pouvoir effectuer des réactions inaccessibles aux enzymes naturelles que ce soit en termes de nature de réaction ou nature de substrat.

C) Bibliographie

- (1) *National Research Council - Catalysis for Energy*; National Academies Press: Washington DC, 2009.
- (2) Hartwig, J. F. *Organotransition Metal Chemistry : from Bonding to Catalysis*; University Science Books: Sausalito, CA, 2010.
- (3) Bäckvall, J. E. *Modern Oxidation Methods*; Wiley-VCH, 2004.
- (4) Houde, A.; Kademi, A.; Leblanc, D. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2004**, *118*, 155.
- (5) Polaina, J.; McCabe, A. P. *Industrial enzymes structure, function and applications*; Springer: Berlin, 2007.
- (6) Faber, K. *Biotransformations in organic chemistry 4th Ed.*; Springer: Berlin, 2000.
- (7) Lu, Y.; Berry, S. M.; Pfister, T. D. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3047.
- (8) Thomas, C. M.; Ward, T. R. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 337.
- (9) Letondor, C.; Ward, T. R. *ChemBiochem* **2006**, *7*, 1845.
- (10) Creus, M.; Ward, T. R. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1835.
- (11) Rosati, F.; Roelfes, G. *ChemCatChem* **2010**, *2*, 916.
- (12) Ringenberg, M. R.; Ward, T. R. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8470.
- (13) Deuss, P. J.; den Heeten, R.; Laan, W.; Kamer, P. C. J. *Chemistry-a European Journal* **2011**, *17*, 4680.
- (14) Lewis, J. C. *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2954.
- (15) Bos, J.; Roelfes, G. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 135.
- (16) Valdez, C. E.; Smith, Q. A.; Nechay, M. R.; Alexandrova, A. N. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 3110.
- (17) 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*, 3495.
- (18) Marchi-Delapierre, C.; Rondot, L.; Cavazza, C.; Ménage, S. *Isr. J. Chem.* **2015**, *55*, 61.
- (19) Pàmies, O.; Diéguez, M.; Bäckvall, J.-E. *Adv. Synth. Cat.* **2015**, *357*, 1567.
- (20) Akabori, S.; Sakurai, S.; Izumi, Y.; Fujii, Y. *Nature* **1956**, *178*, 323.
- (21) Yamamura, K.; Kaiser, E. T. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, 830.
- (22) Wilson, M. E.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306.
- (23) McLaughlin, M. P.; Retegan, M.; Bill, E.; Payne, T. M.; Shafaat, H. S.; Peña, S.; Sudhamsu, J.; Ensign, A. A.; Crane, B. R.; Neese, F.; Holland, P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 19746.

- (24) Liu, J.; Meier, K. K.; Tian, S.; Zhang, J.-l.; Guo, H.; Schulz, C. E.; Robinson, H.; Nilges, M. J.; Münck, E.; Lu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12337.
- (25) Zhao, X.; Yeung, N.; Russell, B. S.; Garner, D. K.; Lu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6766.
- (26) Sigman, J. A.; Kwok, B. C.; Lu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8192.
- (27) Yeung, N.; Lin, Y.-W.; Gao, Y.-G.; Zhao, X.; Russell, B. S.; Lei, L.; Miner, K. D.; Robinson, H.; Lu, Y. *Nature* **2009**, *462*, 1079.
- (28) Lewis, J. C. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *25*, 27.
- (29) Davis, L.; Chin, J. W. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2012**, *13*, 168.
- (30) Drienovska, I.; Rios-Martinez, A.; Draksharapu, A.; Roelfes, G. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 770.
- (31) Yang, H.; Srivastava, P.; Zhang, C.; Lewis, J. C. *Chembiochem* **2014**, *15*, 223.
- (32) Srivastava, P.; Yang, H.; Ellis-Guardiola, K.; Lewis, J. C. *Nat Commun* **2015**, *6*.
- (33) Moffet, D. A.; Hecht, M. H. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3191.
- (34) Lombardi, A.; Nastri, F.; Pavone, V. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3165.
- (35) William F. DeGrado, a.; Summa, C. M.; Vincenzo Pavone; Flavia Nastri, a.; Lombardi, A. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 779.
- (36) Kaplan, J.; DeGrado, W. F. *PNAS* **2004**, *101*, 11566.
- (37) Di Costanzo, L.; Geremia, S.; Randaccio, L.; Nastri, F.; Maglio, O.; Lombardi, A.; Pavone, V. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 1017.
- (38) Zastrow, M. L.; PeacockAnna, F. A.; Stuckey, J. A.; Pecoraro, V. L. *Nat Chem* **2012**, *4*, 118.
- (39) Wright, J. G.; Tsang, H. T.; Penner-Hahn, J. E.; O'Halloran, T. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2434.
- (40) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2009**, *48*, 6974.
- (41) Davies, R. R.; Distefano, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11643.
- (42) Carey, J. R.; Ma, S. K.; Pfister, T. D.; Garner, D. K.; Kim, H. K.; Abramite, J. A.; Wang, Z. L.; Guo, Z. J.; Lu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10812.
- (43) Ohashi, M.; Koshiyama, T.; Ueno, T.; Yanase, M.; Fujii, H.; Watanabe, Y. *Angew. Chem, Int. Ed.* **2003**, *42*, 1005.
- (44) Ueno, T.; Koshiyama, T.; Ohashi, M.; Kondo, K.; Kono, M.; Suzuki, A.; Yamane, T.; Watanabe, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6556.
- (45) Esmieu, C.; Cherrier, M. V.; Amara, P.; Girgenti, E.; Marchi-Delapierre, C.; Odon, F.; Iannello, M.; Jorge-Robin, A.; Cavazza, C.; Ménage, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 3922.
- (46) Cherrier, M. V.; Martin, L.; Cavazza, C.; Jacquamet, L.; Lemaire, D.; Gaillard, J.; Fontecilla-Camps, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10075.

- (47) Cherrier, M. V.; Girgenti, E.; Amara, P.; Iannello, M.; Marchi-Delapierre, C.; Fontecilla-Camps, J. C.; Menage, S.; Cavazza, C. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, *17*, 817.
- (48) Mahy, J. P.; Marechal, J. D.; Ricoux, R. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2476.
- (49) Quilez, R.; de Lauzon, S.; Desfosses, B.; Mansuy, D.; Mahy, J.-P. *Febs Letters* **1996**, *395*, 73.
- (50) de Lauzon, S.; Desfosses, B.; Mansuy, D.; Mahy, J.-P. *Febs Letters* **1999**, *443*, 229.
- (51) Kawamura-Konishi, Y.; Asano, A.; Yamazaki, M.; Tashiro, H.; Suzuki, H. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **1998**, *4*, 181.
- (52) Ricoux, R.; Allard, M.; Dubuc, R.; Dupont, C.; Marechal, J. D.; Mahy, J. P. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3208.
- (53) Allard, M.; Dupont, C.; Robles, V. M.; Doucet, N.; Lledos, A.; Marechal, J. D.; Urvoas, A.; Mahy, J. P.; Ricoux, R. *Chembiochem* **2012**, *13*, 240.
- (54) Reetz, M. T.; Rentzsch, M.; Pletsch, A.; Maywald, M.; Maiwald, P.; Peyralans, J. J. P.; Maichele, A.; Fu, Y.; Jiao, N.; Hollmann, F.; Mondiere, R.; Taglieber, A. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6404.
- (55) Reetz, M. T.; Rentzsch, M.; Pletsch, A.; Maywald, M. *Chimia* **2002**, *56*, 721.
- (56) Reetz, M. T. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 6595.
- (57) Reetz, M. T.; Jiao, N. *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2476.
- (58) Collot, J.; Gradinaru, J.; Humbert, N.; Skander, M.; Zocchi, A.; Ward, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9030.
- (59) Zocchi, A.; Humbert, N.; Berta, T.; Ward, T. R. *Chimia* **2003**, *57*, 589.
- (60) Collot, J.; Humbert, N.; Skander, M.; Klein, G.; Ward, T. R. *J. Organomet. Chem.* **2004**, *689*, 4868.
- (61) Skander, M.; Humbert, N.; Collot, J.; Gradinaru, J.; Klein, G.; Loosli, A.; Sauser, J.; Zocchi, A.; Gilardoni, F.; Ward, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14411.
- (62) Letondor, C.; Humbert, N.; Ward, T. R. *PNAS* **2005**, *102*, 4683.
- (63) Skander, M.; Malan, C.; Ivanova, A.; Ward, T. R. *Chem. Commun.* **2005**, 4815.
- (64) Thomas, C. M.; Letondor, C.; Humbert, N.; Ward, T. R. *J. Organomet. Chem.* **2005**, *690*, 4488.
- (65) Humbert, N.; Zocchi, A.; Ward, T. R. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 47.
- (66) Pierron, J.; Malan, C.; Creus, M.; Gradinaru, J.; Hafner, I.; Ivanova, A.; Sardo, A.; Ward, T. R. *Angew. Chem, Int. Ed.* **2008**, *47*, 701.
- (67) Pordea, A.; Creus, M.; Panek, J.; Duboc, C.; Mathis, D.; Novic, M.; Ward, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8085.

- (68) Pordea, A.; Mathis, D.; Ward, T. R. *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 930.
- (69) Pordea, A.; Creus, M.; Letondor, C.; Ivanova, A.; Ward, T. R. *Inorg. Chim. Acta* **2010**, *363*, 601.
- (70) Ward, T. R. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *44*, 47.
- (71) Kohler, V.; Mao, J. C.; Heinisch, T.; Pordea, A.; Sardo, A.; Wilson, Y. M.; Knorr, L.; Creus, M.; Prost, J. C.; Schirmer, T.; Ward, T. R. *Angew. Chem, Int. Ed.* **2011**, *50*, 10863.
- (72) Lo, C.; Ringenberg, M. R.; Gnanndt, D.; Wilson, Y.; Ward, T. R. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12065.
- (73) Mayer, C.; Gillingham, D. G.; Ward, T. R.; Hilvert, D. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12068.
- (74) Hyster, T. K.; Knorr, L.; Ward, T. R.; Rovis, T. *Science* **2012**, *338*, 500.
- (75) Klein, G.; Humbert, N.; Gradinaru, J.; Ivanova, A.; Gilardoni, F.; Rusbandi, U. E.; Ward, T. R. *Angew. Chem, Int. Ed.* **2005**, *44*, 7764.
- (76) Raffy, Q.; Ricoux, R.; Sansiaume, E.; Pethe, S.; Mahy, J.-P. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2010**, *326*, 141.
- (77) Sansiaume, E.; Ricoux, R.; Gori, D.; Mahy, J.-P. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 1593.
- (78) Larrow, J. F.; Jacobsen, E. N. *Organic Syntheses, Vol 75* **1998**, *75*, 1.
- (79) Cavazza, C.; Bochet, C.; Rousselot-Pailley, P.; Carpentier, P.; Cherrier, M. V.; Martin, L.; Marchi-Delapierre, C.; Fontecilla-Camps, J. C.; Menage, S. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 1069.
- (80) Sharpless, K. B.; Amberg, W.; Bennani, Y. L.; Crispino, G. A.; Hartung, J.; Jeong, K. S.; Kwong, H. L.; Morikawa, K.; Wang, Z. M. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768.
- (81) Katsuki, T. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 437.
- (82) Legros, J.; Dehli, J. R.; Bolm, C. *Adv. Synth. Cat.* **2005**, *347*, 19.
- (83) Ueno, T.; Koshiyama, T.; Ohashi, M.; Kono, M.; Yamane, T.; Watanabe, Y. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *96*, 243.
- (84) Srinivasan, K.; Kochi, J. K. *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 4671.
- (85) Pordea, A., Université de Neuchatel, 2008.
- (86) van de Velde, F.; Arends, I.; Sheldon, R. A. *Topics in Catalysis* **2000**, *13*, 259.
- (87) Mahammed, A.; Gross, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2883.
- (88) Rousselot-Pailley, P.; Bochet, C.; Marchi-Delapierre, C.; Jorge-Robin, A.; Martin, L.; Fontecilla-Camps, J. C.; Cavazza, C.; Menage, S. *Chembiochem* **2009**, *10*, 545.
- (89) Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 177.

- (90) Heravi, M. M.; Lashaki, T. B.; Poorahmad, N. *Tetrahedron: Asymmetry* **2015**, *26*, 405.
- (91) Garcia-Bosch, I.; Gómez, L.; Polo, A.; Ribas, X.; Costas, M. *Adv. Synth. Cat.* **2012**, *354*, 65.
- (92) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43.
- (93) Okrasa, K.; Kazlauskas, R. J. *Chemistry-a European Journal* **2006**, *12*, 1587.
- (94) Fernandez-Gacio, A.; Codina, A.; Fastrez, J.; Riant, O.; Soumillion, P. *ChemBiochem* **2006**, *7*, 1013.
- (95) Kantz, A.; Gassner, G. T. *Biochemistry* **2010**, *50*, 523.
- (96) Kolb, H. C.; VanNieuwenhze, M. S.; Sharpless, K. B. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2483.
- (97) Kokubo, T.; Sugimoto, T.; Uchida, T.; Tanimoto, S.; Okano, M. *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* **1983**, 769.
- (98) Lee, K.; Brand, J. M.; Gibson, D. T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *212*, 9.
- (99) Egami, H.; Katsuki, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8940.
- (100) Schoumacker, S.; Hamelin, O.; Pécaut, J.; Fontecave, M. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 8110.
- (101) Pordea, A.; Ward, T. R. *Synlett* **2009**, *2009*, 3225.
- (102) Lee, K.; Gibson, D. T. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 3353.

Chapitre 2

A) Introduction

La catalyse asymétrique d'oxydation d'alcène par des oxygénases artificielles a fait l'objet, comme décrit au chapitre 1, de nombreuses études. On peut notamment rappeler le développement de métalloenzymes artificielles actives en catalyses d'époxydation comme MnL11-XLnA et Mn-hCA ou en catalyse de dihydroxylation avec OsO₄-BSA et OsO₄-Sav.^{53,71,94,97} Cependant, à ce jour il n'y a pas, à notre connaissance, de métalloenzyme artificielle capable de générer des espèces actives capables d'insérer deux atomes différents de façon asymétrique sur un alcène. Pourtant, certains produits qui en découlent, tels que ceux appartenant à la famille des halogénohydrines, ne sont pas sans intérêt dans le milieu industriel. C'est le cas notamment de plusieurs composés de la famille des chlorhydrines. On peut, entre autre, citer l'exemple de synthons chiraux impliqués dans la synthèse de Paal-Knorr¹⁰³ (épichlorhydrine) du principe actif de l'Atazanavir¹⁰⁴ un antiviral (anti VIH-1, VIH-2) ou encore dans la synthèse de principes actifs anticholestérol (Fluvastatine et Atorvastatin).^{105,106}

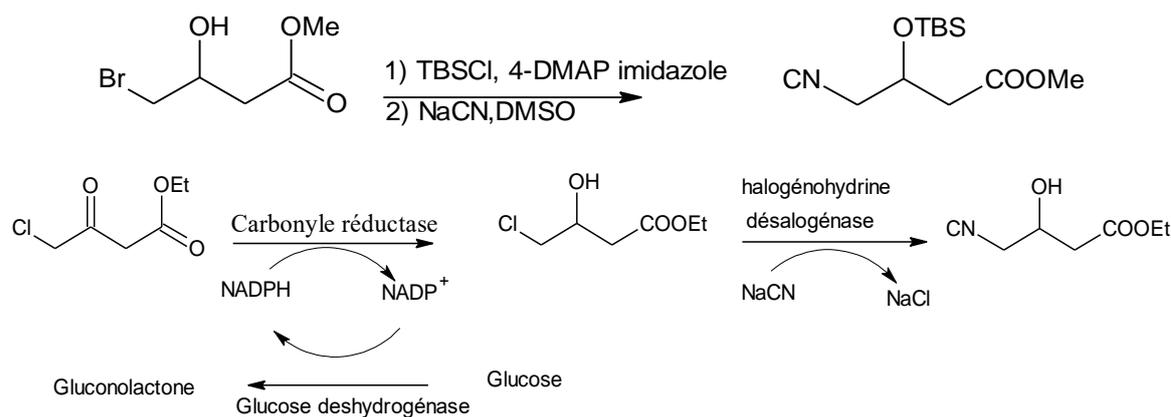


Figure 49. Synthèse d'un précurseur de l'Atorvastatin par voie chimique (en haut) ou biocatalyse (en bas) avec passage par un intermédiaire halogénohydrine.

La synthèse de chlorhydrines est usuellement supportée en catalyse homogène. Ainsi le groupe de P.M. Henry a développé un catalyseur bimétallique de palladium (II) qui catalyse l'oxydation d'alcènes en chlorhydrines correspondantes en présence de

chlorure de cuivre (II) et de chlorure de lithium avec un excès énantiomérique de 94% dans le cas du propène mais avec une faible régiosélectivité.¹⁰⁷

Toutefois, la biocatalyse peut, elle aussi, être impliquée dans la synthèse de chlorhydrines, notamment par réduction de cétones α -chlorées.¹⁰⁸ On peut citer les travaux de Patel and coll. qui ont proposé d'utiliser des cultures microbiennes. La réduction diastéréosélective de l'ester diméthyle de l'acide (1*S*)-[3-chloro-2-oxo-1-(phénylméthyl)propyl]-carbamique, un intermédiaire dans la synthèse de l'atazanavir, par trois lignées de *Rhodococcus* a conduit à l'obtention de la chlorhydrine correspondante avec des rendements >90%, un excès diastéréomérique (*e.d.*) >98% et un *e.e.* >99,3%.¹⁰⁹

Lors de ce projet nous nous sommes appliqués à concevoir la première métalloenzyme artificielle active en catalyse de difonctionnalisation asymétrique d'alcènes dans des conditions plus douces que celles des systèmes déjà mis en place.

La première exigence fut d'éviter l'emploi d'OsO₄, trop toxique. Pour cela, des espèces oxydantes comme H₂O₂, PhIO ... ont été envisagées. Il a ensuite fallu s'arrêter sur le choix des deux partenaires impliqués dans la création de cette métalloenzyme artificielle : le complexe inorganique et la biomolécule.

1) Choix de la biomolécule

La première étape de ce projet a été d'ancrer le complexe inorganique *via* la stratégie d'insertion supramoléculaire, orientant le choix de la biomolécule vers une protéine globulaire comportant une cavité protéique ou un site de fixation connu. Cette stratégie d'insertion est usuelle dans l'une des thématiques de recherche de l'équipe BioCE qui consiste à développer des oxygénases artificielles au laboratoire CBM. La protéine NikA est alors devenue un partenaire de choix pour la conception récente de métalloenzymes artificielles du laboratoire. On peut citer en exemple l'hybride FeL3-NikA.⁴⁵ En effet, la protéine NikA est une protéine périplasmique de transport

de Nickel chez *Escherichia coli* qui possède une cavité où se trouve le site de fixation natif du nickel. De plus, la cristallisation de la protéine NikA permet d'en connaître la structure par diffraction des rayons X (Figure 50). Cela a permis d'identifier deux domaines distincts de la protéine composés tous les deux de feuillets β et d'hélices α . C'est d'ailleurs précisément dans la cavité créée à l'interface de ces deux domaines que le site de fixation du Ni^{2+} s'établit. Ménage *and coll.* ont déjà montré l'aptitude de la protéine à fixer des complexes inorganiques de fer non physiologiques à la place de l'atome de nickel.⁴⁷ Dans tous les cas, la présence d'un groupement carboxylate sur le ligand semble être une des conditions requises pour un bon ancrage.

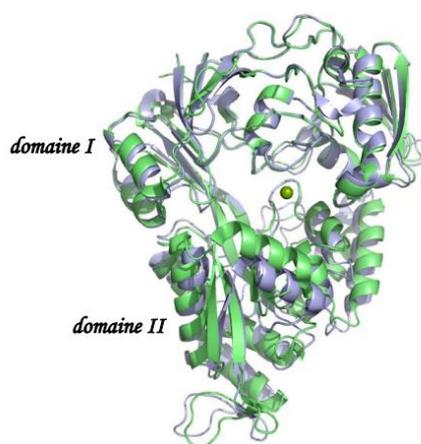


Figure 50. Superposition des structures de NikA apo (en bleu, code PDB : IUIU) et NikA ayant fixé le nickel (en vert, code PDB : IUIV). Le nickel est représenté par une sphère verte.

Ce degré de connaissance structurale de la protéine NikA permet ainsi d'envisager un ancrage dirigé du complexe inorganique de choix dans la cavité. De même, l'expertise de notre collaborateur -Christine Cavazza (CBM)- à maîtriser sa cristallisation permet d'envisager une caractérisation de l'hybride à l'échelle atomique. Toutes ces données en ont fait un candidat de choix pour la conception d'une nouvelle métalloenzyme artificielle.

II) Choix du complexe inorganique

Le complexe $\text{Ru(II)bpza}(\text{CO})_2(\text{Cl})$ (**bpza** = acide bis-(pyrazol-1-yl)acétique) appartient à la famille des complexes à ligand scorpionate.¹¹⁰ Il a été conçu dans l'idée

de mimer les oxygénases comprenant le motif triade faciale 2-His-1-carboxylate essentiel pour une activité catalytique.¹¹¹ De plus, la présence d'un bras carboxylate sur le ligand **bpza** permet d'envisager un ancrage de ce complexe dans la protéine NikA. Cependant, contrairement au fer, la propriété bas spin du ruthénium ne lui permet pas d'activer l'oxygène moléculaire (spin interdit). Toutefois à l'image de l'osmium, il est possible, d'atteindre des espèces actives du genre $\text{Ru}^{\text{IV}}=\text{O}$ ou $\text{Ru}^{\text{VI}}(=\text{O})_2$ en présence d'oxydants tels que des peroxydes ou des dérivés d'iode hypervalents.^{112,113} D'ailleurs, la famille dont il est issu s'est montrée réactive en catalyse d'époxydation d'alcènes tel que le cyclohexène en présence d'iodosylbenzène dans l'acétonitrile atteignant un maximum de 20 TON avec le complexe **Rubdmpza** (**bdmpza** = équivalent diméthylé sur les pyrazoles de **bpza**).¹¹⁴ Si ces résultats se sont révélés prometteurs, ces complexes de ruthénium scorpionates tendent toutefois vers une rapide dégradation qui limite le nombre de cycles catalytiques en milieu organique. Cependant, la conception d'hybride **Rubpza-NikA** permettrait des conditions plus douces et une compartimentation des différents acteurs de la catalyse par la protéine serait autant d'atouts majeurs pour une protection de **Rubpza**.

B) Synthèse et caractérisation de l'hybride **Rubpza-NikA**

I) Synthèse et caractérisation du complexe **Rubpza**

Le complexe $[\text{Rubpza}(\text{CO})_2\text{Cl}]$ (**Rubpza.**) a été synthétisé par le groupe de Nicolai Burzlaff, Erlangen, Allemagne, à partir de son précurseur $[\text{Ru}(\text{Cl})_2(\text{CO})_2]$ suivant le protocole décrit pour la famille des ruthénium scorpionates $[\text{RuL}(\text{CO})_2\text{Cl}]$ (**L** = **bdmpza**, **bdmvpza**, **Cp**, **Cp*** ou **Tp**).¹¹⁴

(1) Diffraction des rayons X

La structure atomique du complexe de ruthénium (II) scorpionate a été caractérisée par diffraction des rayons X sur des cristaux obtenus par évaporation lente d'une solution chloroformique (groupe d'espace $(C2/C)$).

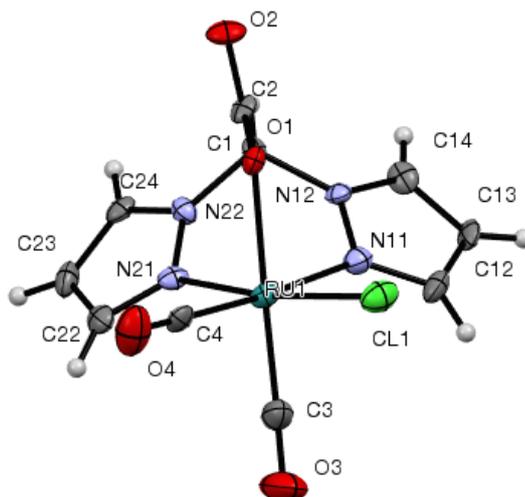


Figure 51. Structure cristallographique du complexe *Rubpza*.

La structure est représentée sur le diagramme ORTEP en Figure 51. Certaines données structurales, comme des longueurs de liaison et des valeurs d'angles, sont présentées dans le Tableau 3. La structure moléculaire du complexe *Rubpza* représente un polyèdre de coordination octaédrique. La sphère de coordination est formée par : deux atomes d'azote donneurs provenant des pyrazoles (N11 et N21), un atome d'oxygène (O1) provenant d'un groupement carboxylate, deux atomes de carbone (C4 et C3) avec la présence de deux carbonyles et d'un atome de chlore (Cl1). De cette façon, le plan équatorial est occupé par un carbonyle et un atome de chlore, respectivement en position *trans* des azotes N11 et N21. Le plan apical est quant à lui occupé par le deuxième carbonyle et par le carboxylate. Par ailleurs, il existe deux formes énantiomériques de ce complexe. Toutefois, ces deux énantiomères ont leurs liaisons respectives de longueurs équivalentes. Les liaisons Ru-N11 et Ru-N21 mesurent 2,105(8) Å et 2,077(7) Å. Les différences de longueur entre ces deux liaisons s'expliquent par un effet *trans* induit par le ligand chloro qui appauvrit le métal. Ainsi Ru-N21 est plus courte que Ru-N11. Ce même phénomène se retrouve en ce qui concerne les deux liaisons Ru-CO (1,941(10) Å et 1,877(11) Å). En effet, l'atome d'oxygène O1 en position *trans* de Ru-C3O3 appauvrit cette liaison. Cet effet *trans* inductif a d'ailleurs déjà été discuté avec les calculs DFT concernant de

nombreux ligands N, N, O.¹¹⁵ Pour finir, Ru-Cl est la liaison la plus faible de cette sphère de coordination avec une longueur de 2,369 Å. Enfin, notons que l'ensemble de ces distances observées restent du même ordre de grandeur que celles observées sur des structures de composés de la même famille [Ru(L)(CO)₂(Cl)], L correspondant à un ligand scorpionate avec des cycles pyrazoles substitués.

Tableau 3. Sélection de longueurs et angles de liaisons caractéristiques du complexe **Rubpza**.

Distance Å		Angles °	
Ru1-N11	2,105(8)	N11-Ru1-N21	85,5(3)
Ru1-N21	2,077(7)	O1-Ru1-N11	83,4(3)
Ru1-O1	2,108(6)	O1-Ru1-N21	84,6(3)
Ru1-Cl1	2,369(3)	O1-Ru1-C3	177,5(4)
Ru1-C3	1,877(11)	N11-Ru1-Cl1	88,3(2)
Ru1-C4	1,941(10)	N21-Ru1-Cl1	171,5(2)
O1-C2	1,272(10)	Cl1-Ru1-C3	91,5(3)
O2-C2	1,213(11)	Cl1-Ru1-C4	90,4(3)
C3-O3	1,131(13)	C3-Ru1-C4	90,0(4)
C4-O4	1,074(12)		

En ce qui concerne les angles, on mesure des angles de liaisons entre le ligand **bpza** et l'ion métallique compris entre 83 et 91°, ce qui est cohérent avec les angles idéaux de 90° dans les structures octaédriques. Les angles mesurés sur des complexes scorpionates comportant d'autres ligands sont également proches de 90°.

Le complexe **Rubpza** étant destiné à être ancré dans la protéine NikA afin de former un hybride catalytique actif dans l'eau, la seconde partie de la caractérisation de ce complexe de ruthénium est centrée sur une étude en solution aqueuse.

(2) Spectroscopie infrarouge

Dans un premier temps, le complexe de ruthénium (II) a été caractérisé par des études de spectroscopie infrarouge ATR-FTIR (Figure 52).

Pour ce faire, les acquisitions ont été réalisées par dépôt d'un échantillon de **Rubpza** sous forme de poudre.

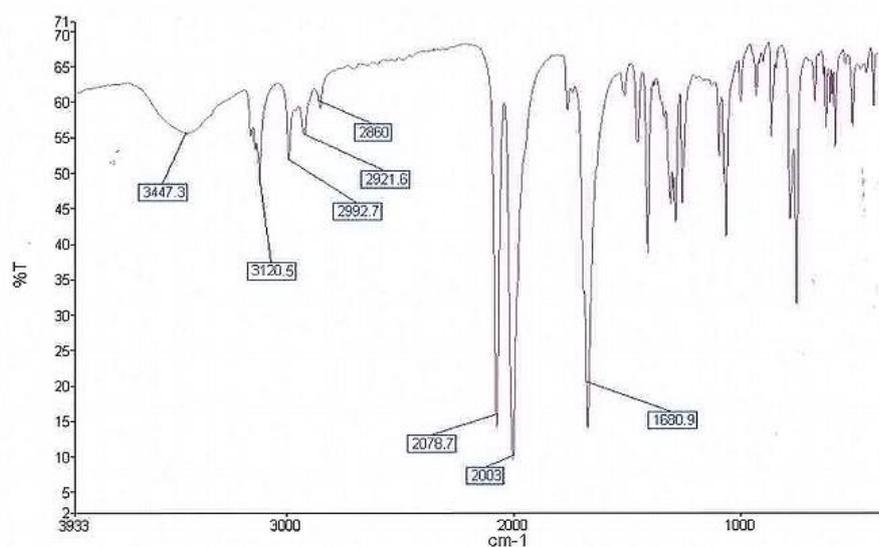


Figure 52. Spectre infrarouge ATR-FTIR du complexe $\text{Ru}^{\text{II}}\text{bpza}(\text{CO})_2\text{Cl}$.

Le spectre infrarouge obtenu (Figure 52) montre trois bandes de vibration qui se démarquent dans la zone entre 2100 et 1600 cm^{-1} . Les deux premières à 2078 et 2003 cm^{-1} sont fines et intenses et ont été attribuées à la présence de vibrations ν_s et ν_{as} des deux ligands carbonyles en interaction. Ces valeurs sont en accord avec celles observées sur de nombreux autres complexes de ruthénium $[\text{Ru}(\text{L})\text{Cl}(\text{CO})_2]$ comportant un ligand $\text{L} = \text{bdmpza}$, bdmvpza , Cp , Cp^* ou Tp . La troisième bande à 1680 cm^{-1} est attribuée à une vibration asymétrique (CO_2) correspondant au bras carboxylate. Enfin, on observe une bande $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ autour des 1500 cm^{-1} .

(3) Spectroscopie infrarouge en solution aqueuse

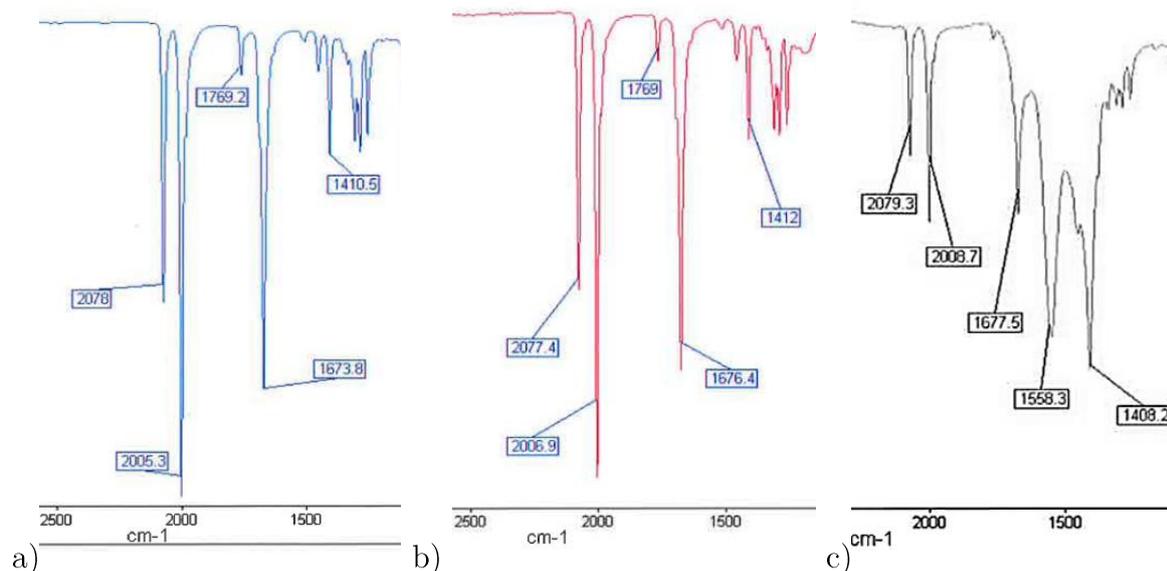


Figure 53. Spectre infrarouge ATR-FTIR du complexe $[Ru^{II}bpza(CO)_2Cl]$ a) en solution dans de l'eau milli-Q, b) en solution dans le tampon HEPES et c) en solution dans le tampon acétate.

Afin d'observer le comportement du complexe et en particulier de ces deux ligands diatomiques (CO) en milieu aqueux, $Rubpza$ est tour à tour dissous dans de l'eau milli-Q, dans du tampon HEPES pH 7 ou dans du tampon acétate pH 5,2. Un échantillon de chacune de ces solutions a ensuite été déposé sur le cristal pour une acquisition de 1500 scans (Figure 53). Au premier abord, les trois spectres présentent une paire de bandes d'absorption fines et intenses entre 2100 et 2000 cm^{-1} : à 2078 et 2005 cm^{-1} lorsque le complexe est en solution dans l'eau milli-Q, à 2077 et 2006 cm^{-1} lorsqu'il est en solution dans le tampon HEPES, enfin à 2079 et 2008 cm^{-1} quand il est dissout dans le tampon acétate. Ces signaux sont fortement similaires en longueur d'onde et en intensité à ceux obtenus lors de l'étude du complexe $Rubpza$ solide.

Ces données indiquent qu'en milieu aqueux et dans différents milieux tamponnés, le complexe de ruthénium conserve les deux ligands carbonyles dans sa sphère de coordination. En revanche, l'empreinte digitale des spectres obtenus ne permet pas de conclure quant à la conservation de l'ion chlorure dans la sphère de coordination.

(4) Étude en spectrométrie de masse de Rubpza en solution aqueuse

Afin de préciser la composition du complexe inorganique en ce qui concerne la présence des ligands mono et diatomiques dans sa sphère de coordination, une étude en spectrométrie de masse a été réalisée. Le complexe de ruthénium en solution dans l'eau a alors été caractérisé en mode positif. Le spectre montre la présence de deux espèces de $m/z = 384$ et $m/z = 367$. Les ions moléculaires, et les fragmentations ont permis d'attribuer ces deux masses au complexe **Rubpza** sous deux formes : $[\text{Rubpza}(\text{CO})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ et $[\text{Rubpza}(\text{CO})_2\text{Cl} + \text{H}]^+$. Ainsi, on note la perte d'un ion chlorure dans l'une des deux formes. La présence de ces deux formes différentes peut être interprétée de deux façons :

- soit une position apicale échangeable de l'ion chlorure par une molécule d'eau, lors de la dissolution du complexe $[\text{Rubpza}(\text{CO})_2\text{Cl}]$ en solution aqueuse.
- Soit une perte de l'ion chlorure au profit d'une molécule d'eau lors de la formation d'une espèce cationique dans la chambre d'ionisation.

Si l'analyse infrarouge de **Rubpza** en solution aqueuse ne met pas en évidence la formation d'une espèce secondaire, il reste toutefois difficile de conclure quant à la présence de l'ion chlorure à ce niveau de caractérisation.

II) Synthèse et caractérisation de l'hybride **Rubpza-NikA**

(1) Préparation

L'hybride **Rubpza-NikA** a été préparé par incubation entre les deux partenaires. Pour se faire la protéine NikA en solution dans le tampon tris.HCl (40 mM, pH 7,4) a été mise en présence de 10 équivalents de complexe de ruthénium préalablement dissous dans le diméthylsulfoxyde. La solution d'hybride est laissée en incubation toute la nuit à quatre degrés puis centrifugée afin d'éliminer le complexe resté insoluble. Enfin, après avoir concentré la solution par centricon (cut off 30 kDa), **Rubpza-NikA** est déposé sur une colonne de dessalage (PD-10, GE Healthcare) afin de retirer l'excès

de complexe resté en solution. Une fois préparé, plusieurs vérifications ont été faites concernant l'ancrage du complexe dans la protéine.

(2) Dosages

Afin de vérifier la présence du ruthénium dans la protéine et de spécifier le taux de succès d'ancrage du complexe, un dosage de chaque sous-unité a été réalisé. A ces fins, la protéine a été dosée par colorimétrie au Rose Bengale (Figure 54), composé chimique dérivé de la fluorescéine qui est utilisé comme colorant et qui est connu pour sa capacité à se lier aux protéines. En effet, le Rose Bengale est moins sensible aux ions métalliques que le Bleu de Coomassie utilisé dans la méthode classique de dosage Bradford.

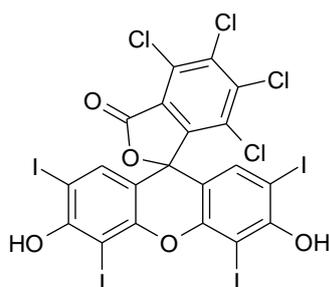


Figure 54. 4,5,6,7-tétrachloro-2',4',5',7'-tétraiodofluorescéine ou Rose Bengale.

Une courbe d'étalonnage a alors été réalisée à partir d'une protéine référence l'albumine sérique bovine (BSA) par une lecture de l'absorbance à 560 nm (Figure 55).

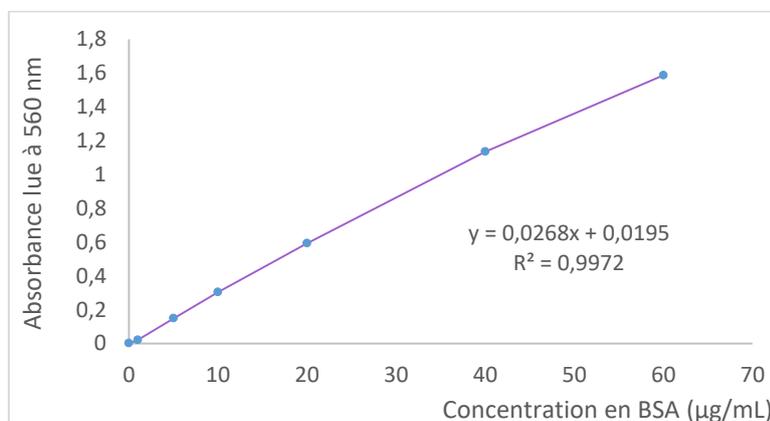


Figure 55. Courbe d'étalonnage pour un dosage au Rose Bengale réalisé sur la protéine BSA.

Le même mode opératoire a ensuite été répété sur un échantillon d'hybride où la concentration en NikA a ensuite été mesurée pour une valeur d'absorbance à 0,8 soit 28 mg.mL^{-1} (soit 5.10^{-4} M).

Le dosage en ruthénium a quant à lui été fait par spectrométrie à torche de plasma (ICP-AES).

(3) ICP-AES spectrométrie par torche à plasma

La spectrométrie par torche à plasma à spectre d'émission atomique est une méthode de dosage physique qui permet de doser la quasi-totalité des éléments. Cette méthode présente l'avantage d'une détection extrêmement sensible de l'ordre du $\mu\text{g.L}^{-1}$ en seulement quelques minutes.

L'échantillon préalablement dosé au Rose Bengale a donc été analysé en ICP-AES et une valeur de concentration de $(4,8 \pm 0,5).10^{-4} \text{ M}$ en ruthénium a été mesurée.

La concentration mesurée en ruthénium et en protéine nous permet de conclure à un rapport de 0,96 ruthénium par protéine dans l'échantillon dosé de Rubpza-NikA. Ce rapport de 1 pour 1 entre la protéine et le complexe est donc le premier résultat permettant de mettre en évidence la formation de l'hybride.

(4) Dichroïsme circulaire

Afin de prouver l'insertion du complexe de ruthénium au sein de la protéine, nous avons recherché les perturbations éventuelles créées par le complexe sur la structure de la protéine. Des analyses de dichroïsme circulaire ont été réalisées sur un échantillon d'hybride. Le dichroïsme circulaire intervient pour chaque molécule optiquement active comme c'est le cas pour les protéines. Dans ce cas, il faut comprendre que la structure secondaire influe sur le dichroïsme circulaire. Les feuillets β et les hélices α présentent ainsi des signaux caractéristiques qui permettent entre autre d'observer une dynamique dans la structure des protéines. Ainsi une

lecture attentive entre 200 et 240 nm permet d'observer une tendance dans le repliement de la protéine (Figure 56).

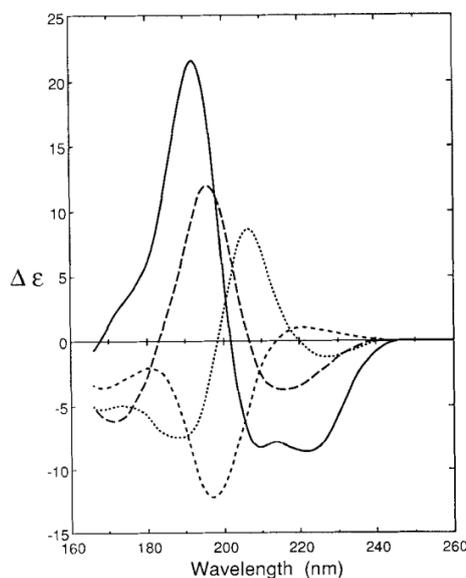


Figure 56. Spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques des hélices α (trait plein), des feuillets β (---), des coudes β (...) et des pelotes aléatoires (- - -).

Dans un souci de comparaison, l'étude a d'abord été initiée sur la protéine apo-NikA dont on peut observer le spectre en trait plein sur la Figure 57. On note une présence d'hélices α , dominante sur les feuillets β , par la présence de deux vagues rapprochées entre 205 et 225 nm. Ces données sont en adéquation avec les structures atomiques de la protéine NikA décrites dans la littérature. Dans un second temps, l'hybride Rubpza-NikA est à son tour étudié par dichroïsme circulaire. Le spectre obtenu pour Rubpza-NikA est représenté en pointillés sur la Figure 57.

Une première observation montre un spectre d'une allure similaire à celle obtenue pour la protéine NikA. En effet, on retrouve cette forme toute particulière entre 200 et 240 nm caractéristiques aux hélices α . Ces résultats nous renseignent alors sur le fait que la protéine ne subit visiblement pas de changement conformationnel majeur après l'ancrage du complexe.

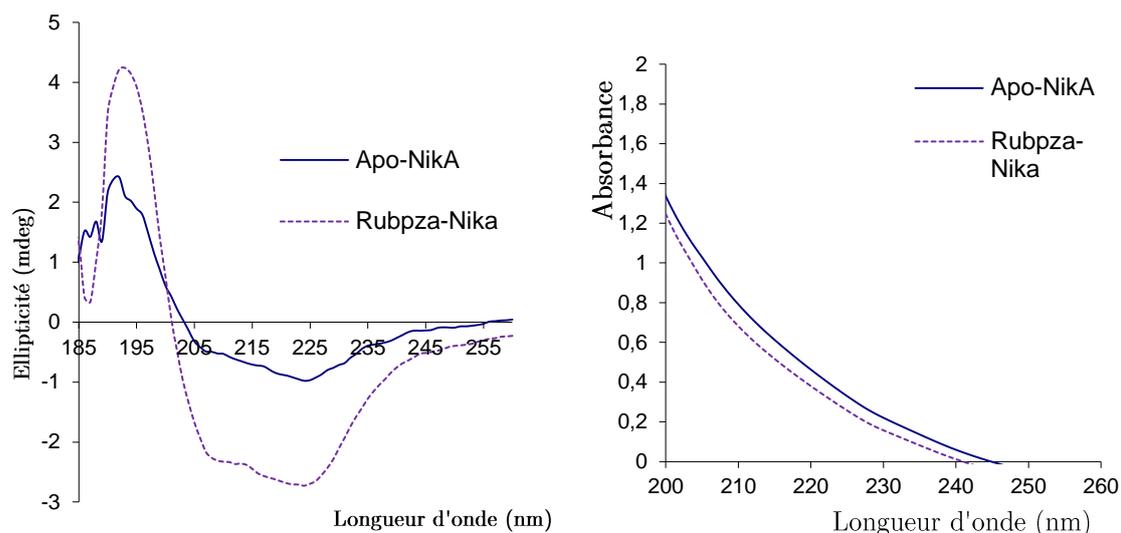


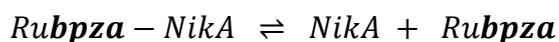
Figure 57. Gauche : Spectre de dichroïsme circulaire d'une solution de NikA apo en solution dans le tampon Tris.HCl 40 mM pH 6 en bleu et d'une solution Rubpza-NikA en solution dans le tampon Tris.HCl 40 mM pH 6 en violet. Droite : Absorbance comparative entre les deux échantillons.

(5) Constante d'affinité

Afin de spécifier la stabilité de Rubpza-NikA, une mesure de la constante de dissociation (K_d) de l'hybride du complexe Rubpza pour la protéine NikA a été effectuée par quenching de la fluorescence. Le principe de la spectroscopie de fluorescence repose sur l'irradiation d'une molécule à une longueur d'onde spécifique. L'absorption d'un photon génère alors le passage des électrons d'un état fondamental à un état excité (singulet). Il s'ensuit alors un transfert d'énergie aux différents atomes de molécules provoquant une relaxation vers leur dernier sous état vibrationnel excité. Ce phénomène peut être suivi d'un rapide retour à l'état fondamental avec une émission (non radiative) de photons d'une longueur d'onde plus longue que celle absorbée. Certains acides aminés dont le tryptophane et la tyrosine, qui sont des résidus aromatiques, sont de bons marqueurs de fluorescence. Toutefois, la fluorescence étant très dépendante de l'environnement de la molécule (pH, polarité, tampon, etc.), il est alors possible d'étudier l'environnement de ces résidus au sein de la protéine. Cette technique prend tout son sens concernant l'étude de l'hybride Rubpza-NikA puisque la protéine NikA possède un tryptophane (Trp398) au sein du site de fixation. Ainsi, l'ancrage du complexe dans la protéine à

proximité du Trp398 provoque un changement environnemental de ce résidu qui se répercute sur la fluorescence. À cet effet, des mesures de spectroscopie de fluorescence ont été effectuées à une longueur d'onde d'excitation de 280 nm sur une solution de NikA à concentration fixe mais à différentes concentrations croissantes en complexe Rubpza. La fluorescence est mesurée à son absorbance maximale pour une longueur d'onde de 338 nm.

En reportant la fluorescence en fonction de la concentration de Rubpza on trace alors un graphe (Figure 58) où l'on constate une décroissance de la fluorescence à mesure que la concentration en Rubpza augmente. Cette extinction de la fluorescence émise par le Trp398 s'explique par une interaction entre ce résidu et le complexe de ruthénium. Considérant le fait que la formation de l'hybride Rubpza-NikA suit le modèle de Michaëlis-Menten, la courbe a ensuite été ajustée en fonction de l'équation de Hill (Équation 1).



Équation 1.
$$y = y_0 + \frac{ax^b}{c^b + x^b}$$

Avec y_0 : le bruit de fond (fluorescence), a : le V_{max} , b : le coefficient de Hill, x : la concentration en Rubpza et c : la constante d'équilibre de dissociation (K_d).

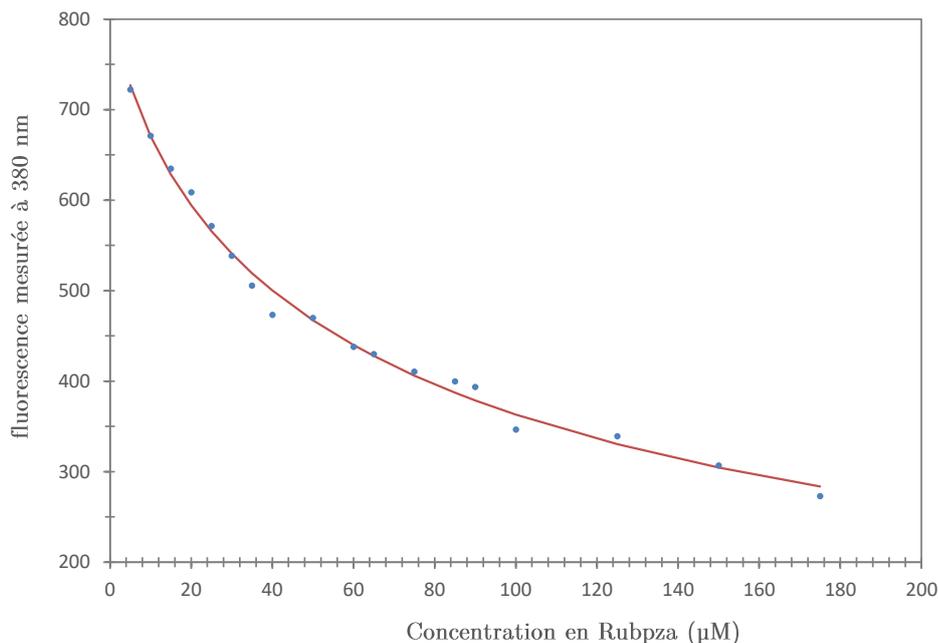


Figure 58. Points (en bleu) représentant l'intensité de fluorescence mesurée en fonction de la concentration en Rubpza superposés à la courbe (en rouge) ajustée en fonction de l'équation de Hill.

On détermine ainsi une valeur pour b voisine de $-1 \pm 0,1$, caractéristique d'un seul site de fixation pour le complexe. L'expérience présentée sur la Figure 58 permet de déterminer une constante de dissociation de $68 \mu\text{M}$. Plusieurs essais ont été réalisés qui conduisent à des valeurs peu reproductibles variant de 70 à $120 \mu\text{M}$, suggérant un biais dans la mesure. Après plusieurs expériences, la faible solubilité du complexe dans le milieu de mesure a été jugée responsable des fluctuations observées. Néanmoins, on peut conclure que bien que le K_d soit supérieur à celui de FeEDTA-NikA ($3,1 \mu\text{M}$), il reste toutefois de l'ordre du micromolaire, donc compatible avec les conditions expérimentales usuellement appliquées pour l'étude des propriétés catalytiques de nos hybrides.

(6) Spectroscopie infrarouge

À ce niveau de caractérisation il devient nécessaire de préciser la composition de la première sphère de coordination de l'hybride Rubpza. Une étude de spectroscopie Infrarouge a alors été réalisée sur Rubpza-NikA (Figure 59). Le but en était de

comprendre l'influence de l'ancrage du complexe dans la protéine sur la présence ou l'absence des deux ligands carbonyles dans la sphère de coordination du ruthénium. Une première observation des spectres ATR-FTIR permet de visualiser des bandes d'absorption particulièrement identifiables car non superposées aux vibrations du polypeptide. Dans un premier temps, on remarque trois bandes larges à 2082 cm^{-1} , 2017 cm^{-1} et une plus faible à 2005 cm^{-1} qui sont alors attribuées aux vibrations $\nu(\text{CO})$. Les deux vibrations, à 2005 cm^{-1} et à 2082 cm^{-1} , sont similaires à celles présentes sur le spectre du complexe **Rubpza** seul. On note toutefois une différence de ratio entre ces deux signaux par rapport à ceux observés sur les spectres de **Rubpza** solide et en solution aqueuse. Cette différence pourrait s'expliquer par la présence d'une seconde espèce $\text{Ru}(\text{CO})_2$ caractérisée par les deux vibrations $\nu(\text{CO})$ à 2082 et 2017 cm^{-1} . La première correspond probablement au complexe de ruthénium libre, qui s'explique par un K_d élevé, et la seconde au complexe de ruthénium ancré dans la protéine. Toutefois, la lecture seule du spectre infrarouge **Rubpza-NikA** ne permet pas de distinguer si le décalage $\nu(\text{CO})$ de la seconde espèce est causé par l'environnement protéique dans la seconde sphère de coordination, ou par un changement dans la première sphère de coordination comme par exemple une perte d'ion chlorure.

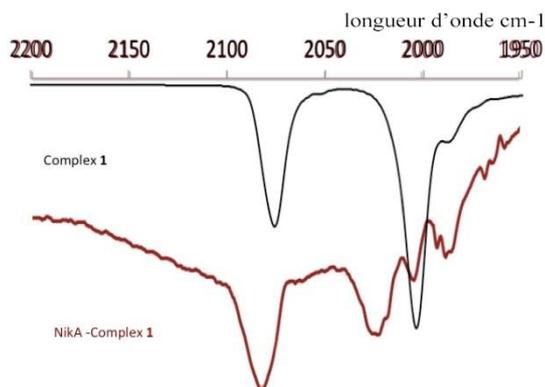


Figure 59. Spectre infrarouge ATR-FTIR du complexe $[Ru^{II}bpza(CO)_2Cl]$ solide (noir) superposé à celui de Rubpza-NikA (rouge).

(7) Spectrométrie de masse

Pour mieux comprendre la structure de l'hybride, des études de spectrométrie de masse ESI (ESI-MS) en conditions natives ont été réalisées sur NikA. Ceci a été possible grâce à une collaboration avec le Dr Elisabetta Boeri-Erba de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble.

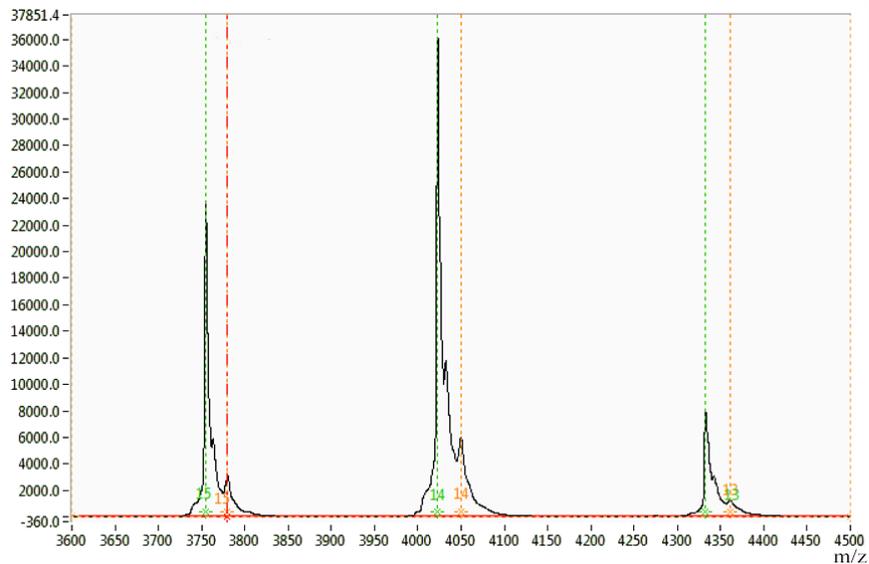


Figure 60. Spectre de masse ESI de l'hybride Rubpza-NikA en conditions natives.

L'ESI-MS native fait appel à des conditions d'ionisation spécifiques et appropriées permettant de conserver les liaisons non covalentes de l'entité analysée,¹¹⁶ et donc d'éviter ainsi la dissociation d'une holoprotéine en assurant le maintien de l'ancrage de la sous-unité inorganique (Rubpza) au sein de NikA tout au long de l'acquisition.

De ce fait, il est alors possible d'accéder à la masse de l'hybride et d'avoir une seconde approche quant à la stœchiométrie complexe/protéine. Cependant, les analyses de masse en conditions natives requièrent l'utilisation de solutions tampon suffisamment volatiles comme l'acétate d'ammonium ou encore le diacétate d'éthyle diammonium. Pour ce faire, tous les échantillons ont donc préalablement été dialysés au tampon acétate d'ammonium 250 mM. Une analyse d'un échantillon de Rubpza-NikA à 16 μM a alors permis d'observer deux pics distincts l'un de l'autre pour un m/z (+14) de 4025 et 4050 (Figure 60). Ces deux masses ont respectivement été attribuées à l'apoprotéine et à l'holoprotéine Rubpza-NikA. En effet, une fois multipliée par la charge (+14) de l'échantillon, la différence de masse entre les deux pics, équivaut à 367 ± 10 m/z et est attribuée au complexe de ruthénium sous une forme $[\text{Rubpza}(\text{CO})_2(\text{Cl})]$ ou $[\text{Rubpza}(\text{CO})(\text{H}_2\text{O})(\text{Cl})]$. Cependant, il est impossible à ce stade de discriminer l'une de ces deux espèces en raison d'une imprécision relative aux petites masses sur un tel spectromètre.

Enfin, on remarque que l'intensité du pic représentant l'holoprotéine est estimée 15% de celle de l'apoprotéine en lien avec la valeur haute mesurée pour le K_d . En augmentant la puissance d'ionisation, il a été possible d'observer à faible masse un fragment attribué à $[\text{RubpzaCl} + \text{K}^+]^+$ à $m/z = 425$. On voit aussi un pic intermédiaire qui pourrait être attribué à la présence de ruthénium libre. Nous verrons plus tard que ce n'est pas le cas.

(8) Cristallogénèse

A ce stade, il fallait encore spécifier le mode d'ancrage du complexe inorganique dans la protéine mais aussi préciser la forme du complexe de ruthénium : $\text{Rubpza}(\text{CO})_2(\text{Cl})$ ou $\text{Rubpza}(\text{CO})(\text{H}_2\text{O})(\text{Cl})$. Pour ce faire, l'étude par diffraction des rayons X sur des cristaux de Rubpza-NikA s'est avérée être une solution de choix. La cristallogénèse consiste à trouver les conditions thermodynamiques pour favoriser le passage de la protéine d'un état liquide vers un état solide ordonné. Pour

ce faire, il peut être nécessaire d'utiliser un agent de précipitation. Ainsi, à température donnée, les conditions de cristallisation sont influencées par la nature et la concentration de l'agent précipitant, ainsi que par la nature, la pureté et la concentration de la protéine ou de la solution tampon et de son pH. Ces conditions sont en partie résumées dans un diagramme de phases qui représente l'état de la protéine en fonction de sa concentration et de celle de l'agent précipitant (Figure 61). Pour une solution tamponnée définie et à une température constante, on distingue deux zones majeures séparées par une courbe de saturation : une zone de solubilité où la protéine est stable à l'état liquide dans un milieu dit « sous saturé » et une zone de « sur saturation » elle-même divisée en deux parties :

- La zone de précipitation, où la protéine passe à un état solide en formant des germes cristallins.
- La zone métastable, qui marque l'apparition de germes cristallins sans toutefois permettre l'observation de cristaux en raison d'une cinétique très lente.

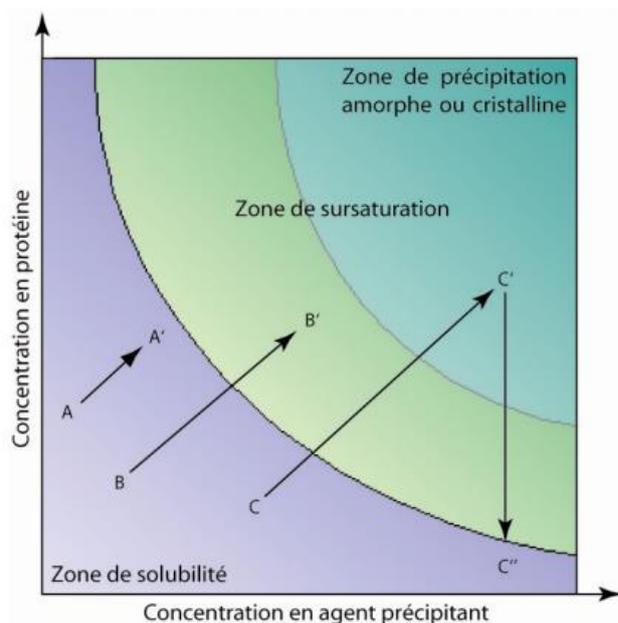


Figure 61. Diagramme de phases : chemins expérimentaux en technique de goutte suspendue à partir des conditions initiales A, B et C.

Lors de la cristallisation, de la protéine on cherche donc les meilleures conditions permettant de générer des cristaux en un minimum de temps en empruntant le chemin $C \rightarrow C' \rightarrow C''$.

Différentes méthodologies permettent d'obtenir des cristaux de métalloenzymes artificielles. On peut par exemple citer la co-cristallisation, où les cristaux sont obtenus en une seule étape à partir d'une solution contenant la protéine et le complexe inorganique. Il existe aussi le trempage qui se fait en deux étapes, à commencer par la cristallisation de la protéine suivie d'un trempage de ces cristaux dans une solution du complexe inorganique qui diffusent alors jusqu'au site actif. Les cristaux Rubpza-NikA ont été obtenus suivant cette deuxième méthode. Pour ce faire NikA a été cristallisée en suivant la technique de diffusion de vapeur en goutte suspendues (Figure 62).

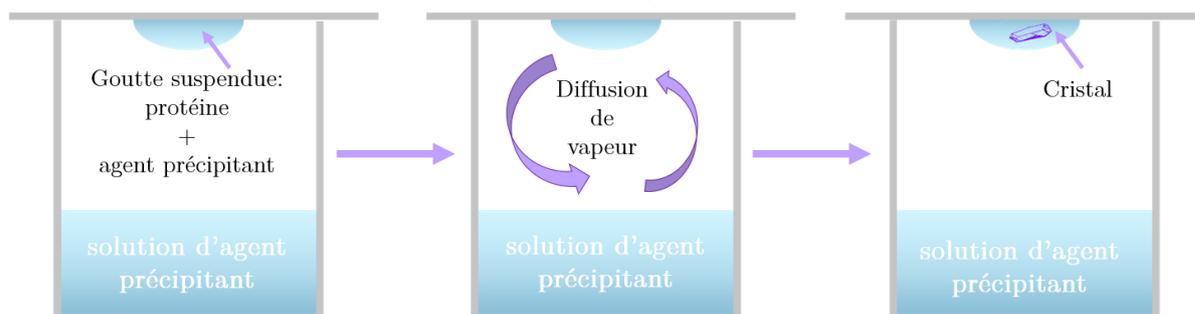


Figure 62. Principe de la cristallisation par diffusion de vapeur en goutte suspendue.

(9) Étude de la structure cristallographique

Les cristaux ont ensuite été étudiés par diffraction des rayons X à l'ESRF sur la ligne bm30A (Figure 63). Les premières données nous montrent une structure cristalline dans un groupe d'espace $P2_12_12_1$ (orthorhombique). De plus, la très bonne résolution (1,8 Å) de cette structure nous permet de confirmer l'ancrage du complexe de ruthénium dans des cristaux de la protéine NikA et d'en spécifier sa nature. En effet, l'ancrage du complexe de ruthénium se fait au niveau du site de fixation du nickel comme c'est le cas pour FeEDTA *via* des liaisons supramoléculaires entre l'Arg137 et le carboxylate du ligand. Une seconde interaction vient stabiliser cet ancrage en impliquant le carboxylate et une molécule d'eau reliée à la Tyr402 par une liaison hydrogène comme souvent observé. La position de Rubpza confiné dans la poche protéique lui permet tout de même de bénéficier d'une exposition au solvant ce qui facilitera le contact avec l'oxydant et les substrats potentiels lors des tests catalytiques.

Cependant, alors que les cristaux de NikA possèdent deux molécules différentes (A et B) dans l'unité asymétrique une seule comporte le complexe ruthénium. En effet, le complexe FeEDTA n'a pas été échangé par Rubpza dans la seconde molécule. Il est possible qu'une position différente des lobes de NikA ou qu'une faible solubilité du complexe accompagné d'un $Kd_{\text{Rubpza-NikA}}$ supérieur au $Kd_{\text{FeEDTA-NikA}}$ puisse favoriser cette différenciation. Il faut également mentionner l'existence de deux structures

distinctes qui diffèrent par leur première sphère de coordination (structure 1 et structure 2).

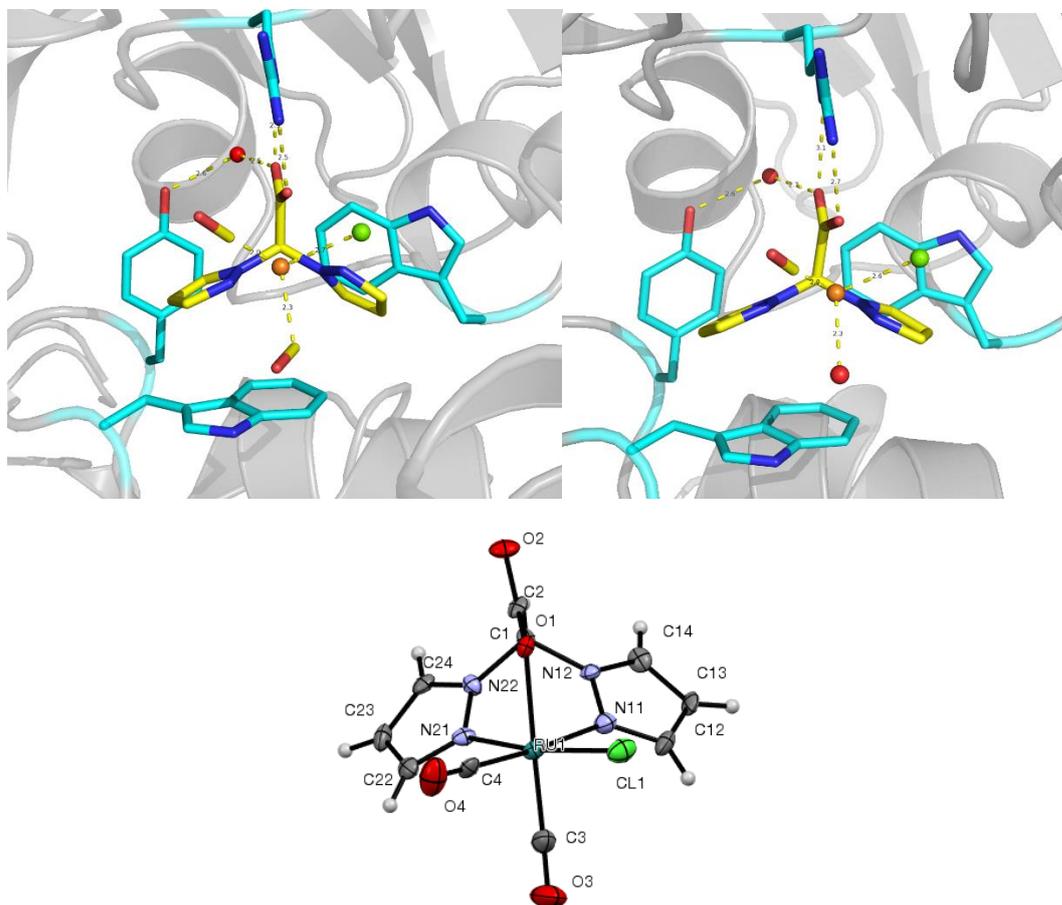


Figure 63. Haut : Structures de l'hybride *Rubpza*-NikA avec la structure 1 (résolution 1,8 Å) : $[\text{Rubpza}(\text{CO})_2(\text{Cl})]$ -NikA et la structure 2 (résolution 2 Å) : $[\text{Rubpza}(\text{CO})(\text{H}_2\text{O})(\text{Cl})]$ -NikA. Bas : Rappel de la structure cristallographique du complexe $[\text{Rubpza}(\text{CO})_2(\text{Cl})]$ libre.

À l'image du complexe *Rubpza* libre, les deux structures du complexe de ruthénium présentent un polyèdre de coordination octaédrique, comprenant deux azotes pyrazoliques, un atome d'oxygène provenant du carboxylate et l'atome de chlore. Cependant si la structure 1 conserve les deux carbonyles, de la même façon que dans la structure *Rubpza*, seul un carbonyle est présent en *trans* d'un azote pyrazolique dans la seconde structure. Le second carbonyle est en effet remplacé par une molécule d'eau dans le plan apical. Les longueurs de liaison de la structure 1 et 2 sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour la structure du complexe ruthénium seul. Cependant, le carbonyle en *trans* du carboxylate (structure 1) se lie dans une

position différente de sorte que l'angle Ru-C3-O3 dévie de l'angle théorique de 180 degrés observé sur la structure Rubpza libre. Ce phénomène a déjà été observé pour des complexes de ruthénium (II) dicarbonyle alors liés à un lysozyme et peut-être dû à une adaptation du complexe afin de permettre la liaison entre l'Arg137 et le carboxylate. Cette singularité fragilise alors la liaison Ru-C3, qui devient plus longue que Ru-C4 (2,3 Å contre 2,0 Å), ce qui entraîne un caractère échangeable du ligand carbonyle C3O3. La structure 2 illustre d'ailleurs tout à fait cette propriété.

Enfin, il est intéressant de noter que la protéine n'incorpore qu'une seule forme énantiomérique (Δ) du complexe Rubpza.

(10) Conclusion

Ainsi, que ce soit dans le complexe Rubpza libre ou dans l'hybride Rubpza-NikA, l'atome de ruthénium présente un polyèdre de coordination très similaire. Cependant, une comparaison plus fine met en évidence une différence au niveau du caractère échangeable de ses ligands mono et diatomiques. En effet, il semble que le complexe de ruthénium (II) scorpionate tend à échanger son ligand chloro contre une molécule d'eau lorsqu'il est en solution aqueuse. À contrario, au sein de l'hybride, c'est un échange du carbonyle en position *trans* du carboxylate qui a lieu. Ces propriétés impliquent une différence de la configuration électronique du ruthénium selon qu'il se trouve ancré dans la protéine NikA ou libre en solution aqueuse. Cette différence pourrait être l'origine d'une réactivité différente entre l'hybride et le complexe seul.

C) Réactivité de l'hybride Rubpza-NikA

I) Définition des conditions catalytiques

Après avoir caractérisé Rubpza-NikA, son activité a été étudiée en catalyse d'oxydation d'alcènes. Cependant, avant cela, il a été nécessaire de définir des

conditions standards de réactivité. Dans un premier temps, une réflexion a été menée afin de définir les différents acteurs de la catalyse ; le substrat, l'oxydant et le solvant. Le choix du premier a été arrêté sur le styrène (substrat **1**) qui est un substrat référence en catalyse d'oxydation d'alcènes comme décrit dans le premier chapitre de ce manuscrit. Le choix du deuxième repose, quant à lui, sur la réactivité d'époxydation supportée par la famille des ruthénium (II) scorpionates en milieu organique en présence d'Iode hypervalent.¹¹⁷ De ce fait, le diacétate d'iodobenzène a été retenu tant pour son pouvoir oxydant proche de celui de son homologue l'iodosobenzène que par la présence de groupements acétate qui lui confère une meilleure solubilité en milieu aqueux. Enfin, afin de stabiliser la protéine NikA lors des tests catalytiques, le solvant aqueux est constitué de tampon HEPES 10 mM, pH 7.

Dans un second temps, les équivalents de chaque acteur de la catalyse ont été définis d'après des conditions établies au laboratoire CBM au cours de précédents travaux sur des métalloenzymes artificielles ayant NikA comme charpente protéique. Les *ratios* retenus étaient les suivants: catalyseur / substrat / oxydant à 1/500/600 éq.. En effet, ces conditions ont permis, en présence d'hybride constitué d'une sous unité NikA, d'exploiter au mieux les fonctionnalités apportées par la protéine sans induire d'inhibition par le substrat. Cependant, dans le cas présent, la nature des réactifs employés a engendré un réajustement de ces conditions. En effet, la présence de tampon HEPES, entre autre, rend la solubilisation de $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ en milieu aqueux plus difficile. Malgré plusieurs tentatives de préparation de solution mère, aucun solvant organique miscible à l'eau n'a permis la solubilisation de l'oxydant. C'est donc un ajout brut de l'oxydant sous forme de poudre qui a été privilégié. Il est aussi important de noter qu'afin de respecter des critères de précision, la quantité minimale de pesée de $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ a été définie à 1 mg. De ce fait, 5 nmol de Rubpza-NikA sont alors nécessaires pour rester dans des conditions d'équivalence de 1 / 500 / 600 éq..

Cependant, bien que l'expression de NikA donne lieu à une production avec des quantités élevées en protéines (de l'ordre de 200 mg de protéine par litre de culture après purification) par rapport à d'autres, sa production n'en est pas moins coûteuse en temps. Le stock en protéine NikA (et donc en Rubpza-NikA) reste ainsi limité, et ne permet pas d'utiliser une telle quantité d'hybride à chaque catalyse. Les conditions standards de catalyse ont alors été réajustées à 1 / 500 / 1200 éq. (catalyseur / substrat / oxydant) pour une concentration finale en catalyseur de $3,73 \cdot 10^{-5}$ moles.L⁻¹.

En résumé, les premières catalyses d'oxydation sont réalisées en présence de 2,5 nmoles (37 μ M) de Rubpza-NikA, $1,25 \cdot 10^{-6}$ moles (18 mM) de substrat dans 67 μ L de tampon HEPES 10 mM pH 7. L'ajout d'oxydant ($3 \cdot 10^{-6}$ moles, 43 mM) marque le début du test catalytique. Après 30 minutes de catalyse, le milieu réactionnel est extrait par du dichlorométhane puis analysé par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Les quantifications en produits et en réactifs sont faites par étalonnage interne *via* l'ajout de benzophénone 0,1 M en tant que référence interne.

Comme substrat, le styrène (substrat 1 - S1) a été choisi car c'est le substrat le plus couramment utilisé en catalyse d'oxydation d'alcène, ce qui nous permettra de faire des comparaisons de nos résultats face à ceux de la littérature.

Enfin, en dernier, vient la mise au point des conditions catalytiques concernant la façon de préparer l'hybride Rubpza-NikA. En effet, afin de s'affranchir des contraintes de temps liées à la préparation des hybrides, les premiers tests catalytiques ont été effectués en présence de Rubpza-NikA préparé *in situ*. Cette méthode consiste à générer l'hybride directement dans le mélange réactionnel. Ce procédé permet notamment de s'affranchir des différentes étapes de purification. À cet effet, cinq équivalents de [Rubpza(CO)₂Cl], en solution dans le tampon HEPES 10 mM pH 7, sont incubés à température ambiante en présence d'un équivalent de

NikA sous forme apo en solution dans le tampon tris.HCl 40 mM, pH 7,5. L'excès de complexe de ruthénium permet de déplacer rapidement l'équilibre en faveur de la formation de Rubpza-NikA, et d'assurer tout au long de la réactivité le maintien d'un maximum de complexe inorganique dans la protéine. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, l'hybride est dilué dans le tampon HEPES 10 mM pH 7. Cette préparation est répétée pour chaque test catalytique et sert de milieu réactionnel auquel sont directement ajoutés le substrat et l'oxydant pour un volume final de 67 μ L.

Pour finir, toutes les réactions répertoriées dans le cadre de ce projet ont été effectuées à température ambiante, en milieu aqueux et exposées à l'air, sauf cas mentionnés.

L'ensemble de ces conditions est répertorié sur le Schéma 1 ci-dessous :

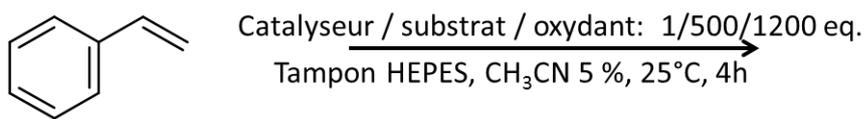


Schéma 1. Condition standard de la catalyse d'oxydation du styrène par Rubpza-NikA.

II) Premiers résultats

Dans le Tableau 4 sont représentés les résultats de 4h de catalyse d'oxydation du styrène avec l'hybride Rubpza-NikA, le complexe de ruthénium libre la protéine libre, ou en absence de tout catalyseur en utilisant le diacétate d'iodobenzène comme oxydant.

Tableau 4. Résultats de la catalyse d'oxydation du styrène (19mM) avec la protéine NikA, le complexe Rubpza et l'hybride Rubpza-NikA (37 μ M) dans le tampon HEPES (10 mM, pH 7) avec $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ comme oxydant. Condition : cat / substrat / oxydant = 1 / 500 / 1200 μ eq. dans du tampon HEPES (10 mM, pH 7). Temps réactionnel = 4 heures. Conditions **A** : Substrat 1 + oxydant + Rubpza-NikA (**conditions standard de catalyse**), **B** : Substrat 1 + oxydant + Rubpza, **C** : Substrat 1 + oxydant + Apo-NikA, **D** : Substrat 1 + oxydant, **E** : Substrat 1.

	Conversion du styrène	Rendement en chlorhydrine / substrat	Rendement en benzaldéhyde
Catalyse (A)	Non mesurable	15%	6%
Contrôle (B)	Non mesurable	/	14%
Contrôle (C)	Non mesurable	4%	
Contrôle (D)	Non mesurable	/	8%
Contrôle (E)	80%	/	/

Avec un rendement de 15% (soit 75 TON), la catalyse d'oxydation du styrène en conditions standards (A) montre la formation d'un produit majoritaire, une chlorhydrine avec l'atome de chlore porté par le carbone β / groupement phényle. L'addition d'un atome de chlore sur le substrat est liée à l'utilisation de tampon Tris.HCl provenant de la solution mère de NikA. La concentration finale en ion chlorure est estimée à 5 mM soit 3,6 fois moins que le substrat, ce qui limite forcément le rendement de la réaction. Le facteur limitant de la réaction étant la concentration en ions chlorures, le rendement réel de la réaction est donc de 54% (toujours 75 TON). Bien que les rendements soient faibles, ces premiers résultats restent prometteurs puisqu'ils mettent en évidence la formation d'un produit unique, difonctionnalisé. Toutefois, il paraît judicieux de comparer la réactivité observée à celle de chaque sous unité libre avant d'en attribuer pleinement le mérite à l'hybride. Pour ce faire, quatre contrôles permettant de vérifier le rôle de chaque partenaire

catalytique dans l'activité précédemment observée ont été effectués comme décrit ci-dessous.

- Substrat 1 + oxydant + Rubpza (B)
- Substrat 1 + oxydant + Apo-NikA (C)
- Substrat 1 + oxydant (D)
- Substrat 1 (E).

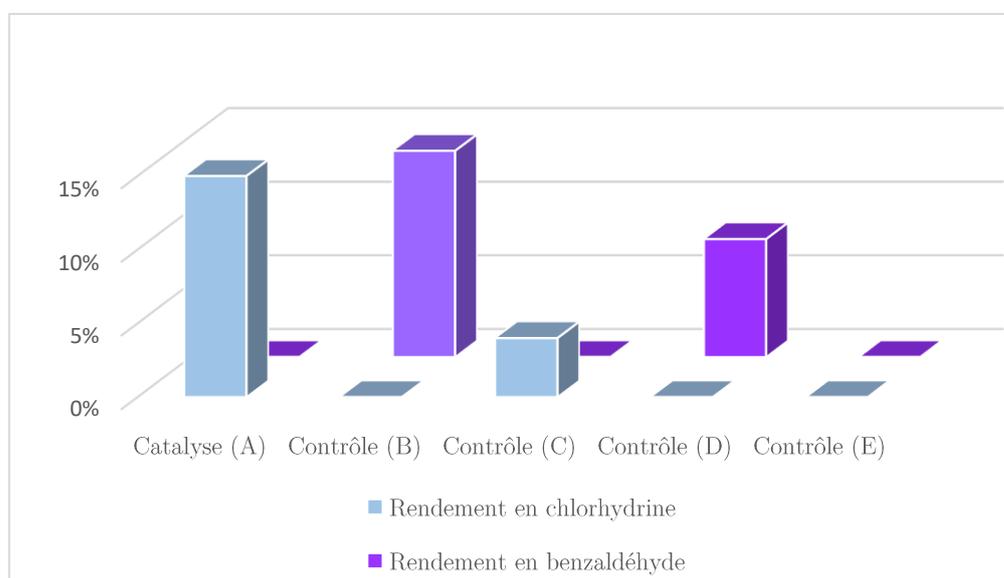


Figure 64. Représentation graphique des rendements obtenus en chlorhydrine et en benzaldéhyde par oxydation catalytique du styrène en fonction du catalyseur utilisé.

En premier lieu, le contrôle (E) réalisé en absence totale de catalyseur et d'oxydant, révèle l'absence, en fin de réaction, de plus de 80% de styrène. Sous ces conditions, aucune réactivité ne peut expliquer cette observation. L'hypothèse d'une formation de polystyrène a pu être éliminée par des analyses RMN. De cette façon, il faut prendre en compte le caractère volatil du styrène qui possède une tension de vapeur de 0,7 kPa. Les catalyses de ce projet, qui impliquent le styrène en tant que substrat, verront donc leurs rendements fortement limités. Dans un second temps, afin de comprendre l'implication de chaque partenaire de l'hybride Rubpza-NikA dans

l'oxydation du styrène, les contrôles (B) et (C) ont été réalisés en remplaçant l'hybride par le complexe de ruthénium libre ou par la protéine NikA apo, respectivement. Le chromatogramme obtenu lors du contrôle (B) présente un unique produit, le benzaldéhyde, avec 14% de rendement tandis que celui du contrôle (C) montre une légère formation de chlorhydrine (4%). Cette première observation met en évidence une divergence de réactivité entre l'hybride et le complexe libre. La différence structurale de ces deux entités, mise en évidence lors de la caractérisation des espèces catalytiques, pourrait en être l'origine. En effet, la libération d'un ligand carbonyle dans le cas de Rubpza-NikA où le complexe libre libère un ion chlorure provoque une différence de configuration électronique du ruthénium. Contrairement à la catalyse en milieu organique, le complexe inorganique semble nécessiter, en milieu aqueux, une activation par la protéine. Ces constatations confirment le fait que même s'il montre une légère activité, l'excès de complexe de ruthénium libre (ajouté afin de former l'hybride *in situ*) ne peut altérer la réactivité de Rubpza-NikA. En effet, Rubpza ne forme qu'une faible quantité de benzaldéhyde avec une cinétique d'oxydation du styrène bien inférieure à celle de l'hybride.

Contrairement à Rubpza, la réactivité de la protéine apo présente la sélectivité de l'hybride mais n'est en rien comparable en termes de rendement (4% contre 15%). Cette faible réactivité pourrait impliquer l'intervention des acides aminés présents dans le site actif, fait qui a déjà été montré lors de travaux préliminaires.⁸⁸ L'ensemble de ces résultats permet de constater que les propriétés catalytiques de Rubpza-NikA ne résultent pas d'une simple addition de celle du complexe libre à celle de la protéine apo. En effet, la réactivité observée semble au contraire être due à une synergie entre les deux partenaires de l'hybride. Rubpza-NikA est donc le seul responsable de la catalyse d'oxydation du styrène en chlorhydrine.

Concernant la sélectivité de la catalyse, le suivi par GC équipé d'une colonne chirale (Optima-17 MN) ne montre aucune énantiosélectivité. La poche protéique ne semble

donc pas conférer des propriétés énantiosélectives au complexe inorganique. Néanmoins, la formation d'une unique chlorhydrine par l'hybride révèle une très bonne chimiosélectivité et une très bonne régiosélectivité.

Bien que la catalyse d'oxydation du styrène par Rubpza-NikA ne soit pas énantiosélective, l'ensemble de ces données en fait la première métalloenzyme artificielle de difonctionnalisation d'alcène, ce qui valide ainsi sa conception.

Néanmoins quelques points restent à définir.

- 1- Si la formation de chlorhydrine est attestée, la position de l'atome de chlore reste à définir. Une analyse par spectrométrie de masse permettrait de déterminer quel est le produit formé entre le 2-chloro-2-phényléthanol ou le 2-chloro-1-phényléthanol.
- 2- L'activité catalytique de Rubpza-NikA en oxydation d'alcène n'est plus à démontrer. Toutefois, l'efficacité encore modérée de ce dernier (75 TON) nécessite une amélioration du système catalytique afin d'augmenter son nombre de cycles catalytiques. Un contrôle de la quantité en ion chlorure et en oxydant dans le milieu actif ainsi que la substitution du styrène par d'autres substrats moins volatiles sont les premières voies à explorer.
- 3- Une autre voie concernant l'optimisation du système catalytique pourrait résider dans la nature de l'oxydant. À cet effet, des tests catalytiques impliquant un large panel d'oxydants représente une des stratégies pour la suite des travaux de ce projet.
- 4- La stabilité de cette nouvelle métalloenzyme est encore inconnue. Le comportement de l'hybride ainsi que celui de ses deux sous-unités sur deux cycles réactionnels successifs sera approfondi.

- 5- L'absence totale d'énantiosélectivité est un point qui mérite là aussi une optimisation. Pour ce faire, une mutagenèse de la protéine NikA pourrait être une option de choix. Néanmoins, l'étude catalytique d'oxydation d'alcènes par hybrides Rubpza impliquant des homologues protéiques naturels en serait une première approche. L'essai d'autres substrats pourra aussi conduire à des informations au cours de la quête à l'énantiosélectivité.
- 6- Enfin, le mécanisme catalytique ainsi que l'espèce oxydante restent à identifier. La difonctionnalisation d'alcènes régie par l'hybride catalytique réfute la formation d'un tétraoxyde de ruthénium qui conduirait à la formation exclusive d'un diol. Toutefois, une catalyse en deux étapes passant par la formation d'une espèce intermédiaire pontée reste une possibilité. Dans ce cas, en raison des 4 équivalents du complexe de ruthénium libre, il devient important de pouvoir déterminer qui, de l'hybride ou du complexe libre, réaliserait l'ouverture de l'espèce pontée. Pour vérifier cette hypothèse, des tests catalytiques d'ouverture d'époxydes seront réalisés.

III) Régiosélectivité

Après avoir défini la nature de la réactivité de Rubpza-NikA ainsi que son efficacité, il était important de discriminer la position de l'atome de chlore au sein du produit, à savoir : en α ou β du phényle. Le produit pouvant être soit le 2-chloro-1-phényléthanol soit le 2-chloro-2-phényléthanol. Pour ce faire, les analyses GC ont été couplées à des analyses en spectrométrie de masse grâce à un appareil CPG-MS ESI. Les deux chromatogrammes (GC et MS) présentent une allure similaire avec trois signaux disposés de façon équivalente dans le temps. Le chromatogramme MS montre une distribution des trois pics pour des ions de $m/z = 106$, 204 et 155 ($Z=1$) correspondant respectivement au benzaldéhyde, à de l'iodobenzène (sous-produit de décomposition du $\text{PhI}(\text{OAc})_2$), et à la chlorhydrine formée. Une étude du profil de

fragmentation concernant le signal M^+ à $m/z = 155$ (Figure 65) montre un fragment d'une masse $m/z = 107$ ($Z=1$). Ce fragment est attribué au radical cation hydroxybenzylique qui comporte un groupement hydroxyle en position α du phényle. Aucun fragment $m/z = 124$ ($Z=1$) correspondant au radical cation chlorobenzylique avec un atome de chlore en α n'a été observé.

Si aucune énantiosélectivité n'est observée, la catalyse d'oxydation du styrène est cependant 100% régiosélective en faveur de la formation du 2-chloro-1-phényléthanol.

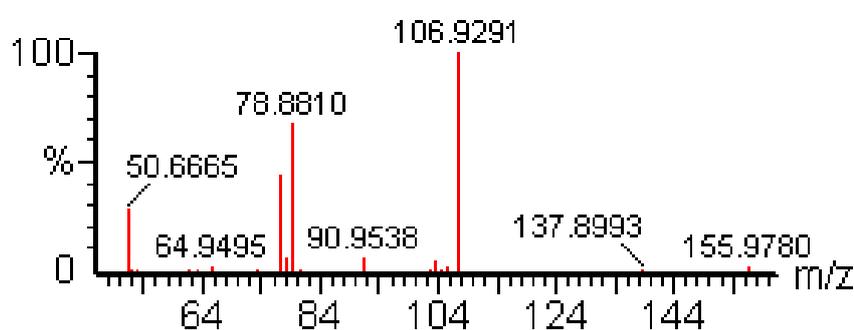


Figure 65. Spectre de masse du 2-chloro-1-phényléthanol, produit d'oxydation du styrène par *Rubpza-Nika* en conditions standards.

IV) Optimisation de l'oxydant

Des études concernant la nature de l'oxydant ont ensuite été réalisées. En utilisant les mêmes conditions que précédemment, un large panel d'oxydants a été testé en substitution de $\text{PhI}(\text{OAc})_2$. Les données qui en résultent sont présentées dans le Tableau 5.

Tableau 5. Catalyse d'oxydation du styrène par Rubpza-NikA en présence de divers oxydants dans les conditions 1 / 500 / 1200 éq..

Entrée	Oxydant	Présence de réactivité	Produits formés (rendements)
1	PhI(OAc) ₂	Oui	2-chloro-1-phényléthanol (15%)
2	PhIO	Non	/
3	(PhIO.SO ₃) ₃	Non	/
4	Oxone	Non	/
5	CAN	Non	/
6	TBHP	Non	/
7	KIO ₄	Oui	Benzaldéhyde + acide benzoïque
8	H ₂ O ₂	Non	/
9	NaOCl	Oui	2-chloro-1-phényléthanol (22%)

L'entrée n°1 correspond à la catalyse d'oxydation standard du styrène quand PhI(OAc)₂ est utilisé en tant qu'oxydant et sert de comparatif dans cette étude. Dans un premier temps, d'autres oxydants appartenant à la famille de l'iode hypervalent ont été testés (entrées 2 et 3). Lorsque l'iodosylbenzène est impliqué en tant qu'agent oxydant, aucune réactivité n'est observée. Ces résultats sont contraires à ceux observés en milieu organique lors de la catalyse d'oxydation d'alcène impliquant des complexes ruthénium (II) scorpionates en présence de PhIO (jusqu'à 20 TON pour [Rubdmpza(CO)₂Cl]).¹¹⁴ Cette inactivité peut être expliquée par la très faible solubilité de cet oxydant en milieu aqueux ou encore par la stabilité de sa forme polymérique native empêchant sa dissociation en sa forme monomérique active. En raison de ses groupements SO₃ hydrophiles, (PhIO.SO₃)₃ a alors été choisi en tant qu'oxydant. Cette fois encore, aucune activité n'a été observée. D'autres oxydants comme l'oxone, le CAN (cérium ammonium nitrate) et le TBHP (hydroperoxyde de

tertio-butyle) (entrées 4,5 et 6) connus pour générer des espèces ruthéniums (IV) oxo ont été à leurs tours testés.^{118,119} Les chromatogrammes ne montrent toujours pas de formation de produit d'oxydation. L'utilisation de KIO_4 (periodate de potassium) en tant que donneur d'oxygène a aussi été envisagée (entrée 7). Cependant, les catalyses d'oxydation du styrène se sont avérées fort peu chimiosélectives avec la formation de produits de suroxydation tels que le benzaldéhyde et l'acide benzoïque. Enfin, en réponse à des considérations environnementales, $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ a été substitué par des oxydants tels que H_2O_2 et NaOCl (entrées 8 et 9) pour leur capacité à former des sous-produits non toxiques (H_2O , NaCl) en catalyse d'oxydation d'alcène en milieu aqueux. Toutefois, à l'image de la réactivité en milieu organique, aucune activité catalytique n'a été observée lors de l'utilisation de H_2O_2 . Quant aux catalyses en présence de NaOCl , bien que le chromatogramme montre la formation d'une quantité modérée de chlorhydrine, une quantité équivalente a été observée lors des réactions de contrôle sans catalyseur. Les résultats du screening d'oxydants montrent que seul le diacétate d'iodobenzène permet une oxydation d'alcène efficace et chimiosélective. À partir de ces résultats, la seule amélioration possible de l'utilisation de l'oxydant ne peut concerner que la façon dont il est délivré dans le milieu réactionnel ainsi qu'un réajustement de son excès par rapport au catalyseur.

V) Optimisation du rapport catalyseur / substrat / oxydant / chlorure

Afin d'améliorer l'efficacité du système catalytique, les conditions standards de catalyse ont été d'optimisées. Ces travaux ayant été réalisés par Mlle Sarah Lopez, doctorante dans l'équipe BioCE, ils seront détaillés comme il se doit dans son manuscrit de thèse. Toutefois, pour la bonne compréhension de ce chapitre, il est essentiel de détailler ici les conditions retenues après optimisation.

Premièrement, plusieurs propositions ont été faite concernant la quantité d'oxydant délivrée dans le milieu réactionnel. L'arrivée d'une technicienne de recherche au

laboratoire (Mlle Marina Iannello) a permis une production de la protéine NikA en continu et donc d'en obtenir des quantités nettement supérieures qu'auparavant. Il a alors été possible de doubler la quantité de protéine, de complexe inorganique, de substrat et de tampon sans modifier la quantité de $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ définie à 1 mg. Ceci a permis de diminuer l'excès d'oxydant avec de nouvelles conditions standards de catalyse : 1 / 500 / 600 éq. (catalyseur / substrat / oxydant). Deuxièmement, il faut comprendre que la quantité de chlore peut sensiblement varier en fonction des préparations de NikA, c'est-à-dire de sa concentration après purification dans le tampon Tris.HCl. Il a alors été décidé de concentrer la solution de NikA sur centricon de façon à augmenter au maximum sa concentration, donc réduire le volume de solution chlorée à ajouter au milieu réactionnel et de ce fait réduire au maximum la quantité d'ion chlorure apportée lors de l'ajout de la protéine au milieu réactionnel. Une quantité fixe de tampon Tris.HCl 40 mM pH 7,5 est alors ajoutée au milieu réactionnel de chaque catalyse portant ainsi les équivalences à 1 / 500 / 600 / 150 éq. (catalyseur / substrat / oxydant / chlorure). La quantité de chlore étant limitante, les rendements seront calculés en conséquence.

Enfin, ces nouvelles conditions ont permis de réduire la durée de la catalyse à 30 minutes.

Les nouvelles conditions standards de catalyses sont répertoriées dans la Figure 66.

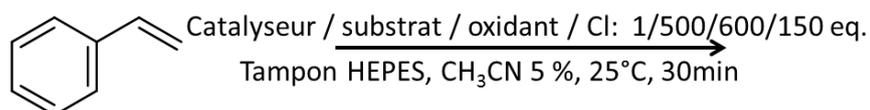


Figure 66. Nouvelles conditions standards de la catalyse d'oxydation du styrène par Rubpza-NikA.

VI) Catalyse d'oxydation du *trans* et *Cis*- β -méthylstyrène

L'activité catalytique de Rubpza-NikA a ensuite été testée sur deux différents substrats : le *trans*- β -méthylstyrène (**S2** ou substrat **2**) et le *cis*- β -méthylstyrène (**S3** ou substrat **3**) (Figure 67). Dans le tableau X sont représentés les résultats de 30

minutes de catalyse d'oxydation du substrat **2** avec l'hybride Rubpza-NikA, le complexe de ruthénium libre, la protéine libre, ou en absence de tout catalyseur, en utilisant le diacétate d'iodobenzène comme oxydant en présence de 150 équivalents d'ion chlorure.



Figure 67. *trans*-β-méthylstyrène (**S2**) et le *cis*-β-méthylstyrène (**S3**).

En effet, bien que les conditions catalytiques aient été modifiées par rapport aux catalyses d'oxydation du substrat **1**, les mêmes expériences ont été répétées (Figure 68, Tableau 6).

Tableau 6. Résultats de la catalyse d'oxydation du *trans*-β-méthylstyrène avec la protéine NikA, le complexe Rubpza et l'hybride Rubpza-NikA dans le tampon HEPES (10 mM, pH 7) avec PhI(OAc)₂ comme oxydant. Conditions : catalyseur / substrat / oxydant / Cl⁻ = 1 / 500 / 600 / 150 éq. Temps réactionnel = 30 minutes.

	Rendement en chlorhydrine	Rendement en benzaldéhyde	TON
Catalyse (F) Cat = hybride	54%	1%	81
Contrôle (B) Cat = Rubpza	4%	3%	/
Contrôle (C) Cat = NikA apo	9%	2%	/
Contrôle (D) Cat = -	9%	1%	/

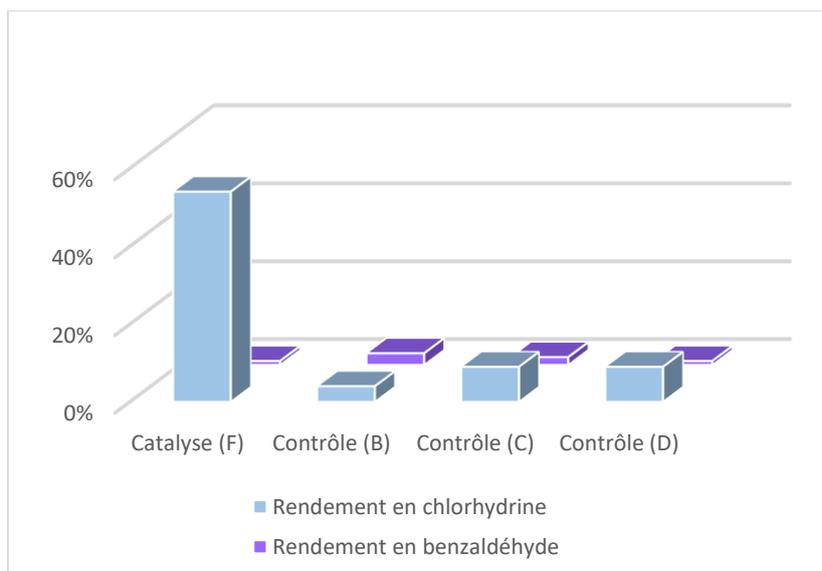


Figure 68. Représentation graphique des rendements obtenus en chlorhydrate et en benzaldéhyde par oxydation catalytique du *trans*- β -méthylstyrène en fonction du catalyseur utilisé.

Dans ce cas, les rendements en chlorhydrate ont été calculés par rapport à la quantité de chlore présent dans le milieu réactionnel tandis que les rendements en benzaldéhyde ont été calculés par rapport à la quantité de substrat.

La catalyse d'oxydation du substrat **2** permet d'accéder à la formation de la chlorhydrate correspondante avec 54% de rendement soit 81 cycles catalytiques. On note un gain d'activité catalytique bien qu'elle reste très proche de celle précédemment observée à partir du substrat **1**. De plus, avec seulement 1% de rendement en benzaldéhyde, le système catalytique se montre d'autant plus chimiosélectif. De nouveau, la quasi absence de chlororalcool lors des contrôles B et C (9% contre 54 dans le cas de l'hybride) montrent le caractère unique de l'hybride. **Rubpza**-NikA est bien le seul responsable de la réactivité observée.

Les mêmes études catalytiques ont été menées sur le *cis*- β -méthylstyrène (Tableau 7).

Tableau 7. Résultats de la catalyse d'oxydation du *cis*- β -méthylstyrène avec l'hybride *Rubpza-Nika* dans le tampon HEPES (10 mM, pH 7) en utilisant $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ comme oxydant. Conditions : catalyseur / substrat / oxydant / Ct = 1 / 500 / 600 / 150 éq. Temps réactionnel = 30 minutes.

	Chlorhydrine	benzaldéhyde	TON
Catalyse (G)	49%	0%	73
Contrôle (D) Cat = -	3%	2%	/

De la même façon qu'avec les substrats **1** et **2**, seul l'hybride produit la chlorhydrine correspondante dans un rendement de 49% soit 73 cycles catalytiques. Aucun produit secondaire n'a été détecté lors de cette catalyse. Bien que légèrement inférieure à l'activité observée sur l'alcène en configuration *trans*, l'efficacité reste relativement correcte. Il est aussi important de noter que le changement de configuration du substrat n'affecte pas la réactivité observée.

Les chromatogramme MS des catalyses (F) et (G) montrent tous les deux une distribution de trois pics pour des ions moléculaires de $m/z = 106, 204$ et 172 ($Z=1$) correspondant respectivement au benzaldéhyde, à de l'iodobenzène (sous-produit de $\text{PhI}(\text{OAc})_2$), et à la chlorhydrine formée. Une étude du profil de fragmentation concernant le signal $\text{M}^{\cdot+}$ à $m/z = 172$ (Figure 69) montre un fragment d'une masse $m/z = 107$ ($Z=1$).

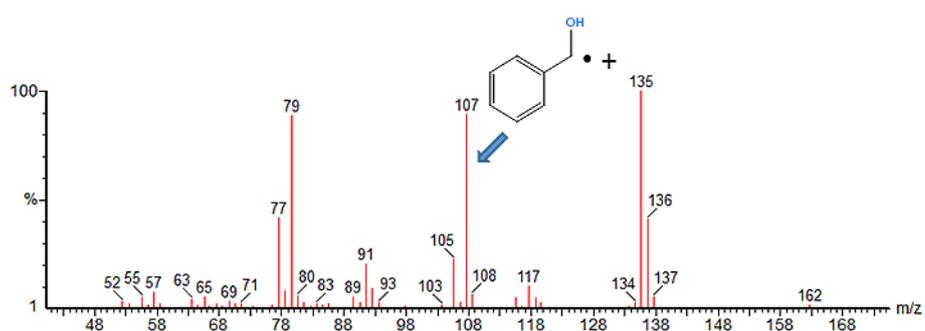


Figure 69. Spectre de masse du produit d'oxydation des substrats **2** et **3** par *Rubpza-Nika*.

Une fois encore, ce fragment est attribué au radical cation hydroxybenzyle qui comporte le groupement hydroxyle en position α du phényle. Que ce soit pour la

catalyse d'oxydation du *trans*- β -méthylstyrène ou du *cis*- β -méthylstyrène, aucun fragment $m/z = 124$ ($Z=1$) correspondant au radical cation chlorobenzyle avec un atome de chlore en α n'a été observé. Le produit formé est donc dans les deux cas du 2-chlorophénylpropanol.

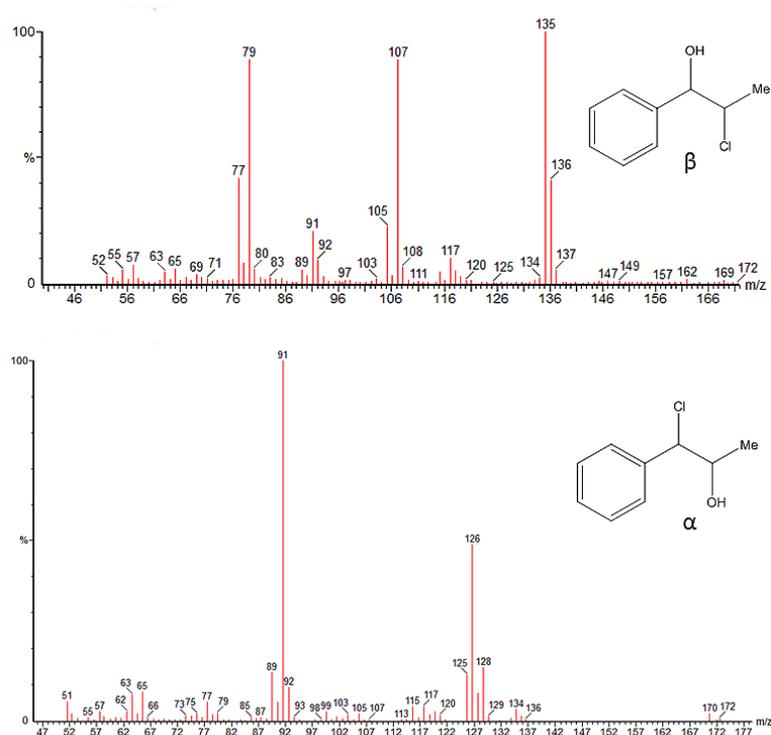


Figure 70. Spectres de masse du 2-chlorophénylpropanol et du 1-chloro-1-phénylpropan-2-ol synthétisés comme références.

Cette conclusion est confirmée par la comparaison du spectre du produit obtenu après catalyse à ceux des deux régioisomères synthétisés chimiquement (Figure 70). Cette fois encore, la catalyse d'oxydation d'alcène par Rubpza-NikA est 100% régiosélective en faveur de la formation du 2-chlorophénylpropanol.

Toutefois, aucun excès énantiomérique n'a été observé avec Rubpza-NikA sur le *trans* ou le *cis*- β -méthylstyrène. La substitution d'un proton par un groupement méthyle, et ce quelle que soit la configuration de l'alcène, ne semble pas influencer l'énantiosélectivité par une approche spécifique.

VII) Stabilité et efficacité

Dans l'idée d'apprécier la stabilité de Rubpza-NikA, une nouvelle série de catalyses a été entreprise sur deux réactions catalytiques consécutives. Un run est alors défini comme une réaction de catalyse standard stoppée après 10 minutes de réaction. 7 catalyses ont été lancées dans des conditions identiques (Figure 71). Une de ces catalyses est arrêtée, puis injectée en GC après un run et permettra une comparaison avec les expériences de stabilité réalisées sur deux runs. Six autres catalyses sont poursuivies pour dix minutes supplémentaires, mais bénéficient séparément de l'ajout d'un des acteurs de la catalyse. Enfin, pour pouvoir comparer l'effet de l'excès de chlorure, un témoin avec 500 éq. de chlorure ajoutés (tampon Tris.HCl) dès le début de la réaction a été réalisé sur un run.

Précisément, afin de vérifier l'intégrité et de comprendre le comportement de chaque acteur impliqué dans la stabilité de l'hybride, les catalyses et les contrôles suivants ont été entrepris :

Témoins sur un run :

(H) Rubpza-NikA en conditions standards,

(I) Rubpza-NikA + 500 éq. Cl⁻.

Réactions sur deux runs :

(J) 1 run + Cl⁻ (150 éq.) et oxydant (600 éq.), arrêt à 20 minutes,

(K) 1 run + NikA 1 éq. et Cl⁻ (150 éq.), arrêt à 20 minutes,

(L) 1 run + Rubpza (1 éq.) et Cl⁻ (150 éq.), arrêt à 20 minutes,

(M) 1 run + Rubpza-NikA (1 éq.) et Cl⁻ (150 éq.), arrêt à 20 minutes,

(N) 1 run + Oxydant (600 éq.), arrêt à 20 minutes,

(O) 1 run + Cl⁻ (150 éq.), arrêt à 20 minutes.

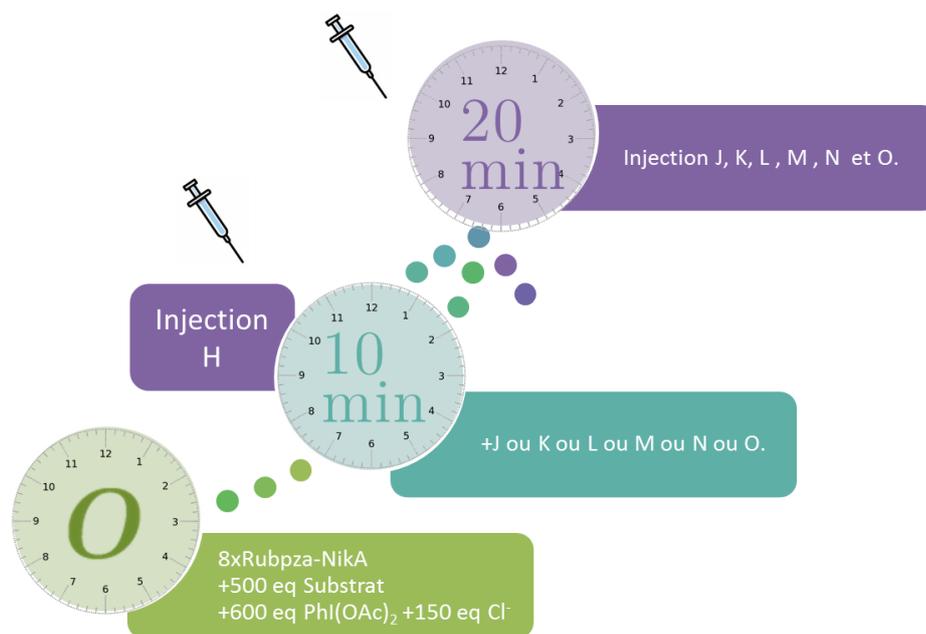


Figure 71. Description du mode opératoire concernant les expériences de stabilité.

Les résultats de ces expériences sont répertoriés dans le Tableau 8. La catalyse témoin (H) du *trans*- β -méthylstyrène par Rubpza-NikA sur un run atteint 90 cycles catalytiques, soit un rendement de 60%. Or, dans ces conditions, la quantité de chlorure est en défaut par rapport à la quantité de substrat et ne permet pas d'analyser pleinement la stabilité de l'hybride. Le premier test sur deux runs (Catalyse (O)) bénéficie donc d'un ajout dans le milieu réactionnel de 150 éq. de Cl⁻ supplémentaires (soit un total de 300 équivalents). Les résultats montrent une efficacité multipliée par deux en atteignant 185 cycles catalytiques. Avec 63% de rendement, on retrouve donc l'intégralité de la réactivité du témoin (H) ce qui suggère que la réactivité de Rubpza-NikA reste inchangée sur les deux runs. De plus, ces résultats confirment que la quantité en ions chlorure est le facteur limitant de l'efficacité de cette catalyse.

On retrouve d'ailleurs cette tendance lors de la catalyse (N) qui bénéficie après dix minutes de catalyse d'un ajout d'oxydant (600 éq.) à la place de l'ajout d'ion chlorure.

Après 20 min de réaction, cette dernière ne s'avère pas plus efficace qu'un seul et unique run catalytique (H) avec seulement 100 cycles catalytiques.

Tableau 8. Résultats des expériences de stabilité de Rubpza-NikA lors de catalyses d'oxydation du trans- β -méthylstyrène dans le tampon HEPES (10 mM, pH 7) avec $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ comme oxydant. Temps réactionnel = 10 minutes pour un run, 20 minutes pour deux runs.

		Rendement ¹	cycles catalytiques	tot. éq. Cl ⁻
Catalyse (H)	1 run	60%	90	150
Catalyse (J)	2 runs	86%	258	300
Catalyse (K)	2 runs	69%	200	300
Catalyse (L)	2 runs	56%	168	300
Catalyse (M)	2 runs	58%	174	300
Catalyse (N)	2 runs	68%	100	150
Catalyse (O)	2 runs	63%	185	300
Catalyse (I)	1 run	61%	305	500

¹Rendement en chlorhydrate calculé par rapport à la quantité de Cl⁻ (150 éq., 300 ou 500 éq.).

D'un autre côté, les résultats de la catalyse (O) montrent que l'apport fractionné en Cl⁻ ne permet toutefois pas d'accéder au nombre maximum théorique de cycles catalytiques de 300 après 2 runs. Simultanément, les réactions (K), (L) et (M) ont donc été entreprises afin de vérifier pleinement que cette différence ne provienne pas d'une dégradation partielle de l'hybride catalytique.

Dans un premier temps, c'est la stabilité de la protéine face aux conditions oxydantes de la catalyse qui a été vérifiée. Pour ce faire, en plus des 150 éq. de Cl⁻ ajoutés après le premier run, le contrôle (K) a bénéficié d'un ajout d'1 éq. de NikA en s'appuyant sur la capacité de l'hybride à se former *in situ*. De cette façon, 200 cycles catalytiques ont été réalisés par le système catalytique ce qui reste très proches du contrôle (O) en termes d'efficacité. Les résultats obtenus prouvent que la charpente protéique de

l'hybride ne subit pas de dégradation suffisamment forte pour libérer le complexe inorganique dans le milieu réactionnel.

Dans un second temps, la stabilité du complexe **Rubpza** a été étudiée de la même façon par un ajout de complexe de ruthénium à 10 minutes de catalyse. Là encore, avec 168 cycles catalytiques, aucune augmentation de l'activité catalytique n'a pu être observée en comparaison avec le contrôle (O). L'activité catalytique limitée à 63% de rendement ne semble donc pas due à une dégradation du complexe inorganique.

L'ajout d'un équivalent d'hybride **Rubpza-NikA** lors du deuxième run de la catalyse (M) permet d'accéder à 174 cycles catalytiques, soit 58% de rendement. De nouveau, la réactivité est du même ordre de grandeur que le contrôle (O). L'ensemble de ces données (K, L, M et O) montre une constante réactionnelle en termes de nombre de cycles catalytiques sur la totalité des deux runs consécutifs. La stabilité de l'hybride **Rubpza-NikA** ne semble pas être un facteur limitant l'activité catalytique.

Finalement, le meilleur résultat est atteint lorsque la catalyse bénéficie d'un ajout simultané de 150 éq. de Cl⁻ et de 600 éq. de PhI(OAc)₂ avec 258 cycles catalytiques, soit 73 cycles de plus (+ 40%) que pour un ajout seul d'ion chlorure. Ces nouvelles conditions ont permis d'atteindre un très bon rendement de 85%. La quantité d'oxydant est donc au même titre que celle de Cl⁻ un facteur limitant. Néanmoins, le contrôle (I) qui bénéficie de 500 équivalents de Cl⁻ dès le premier run, soit pour un rapport de un par rapport au substrat, permet d'atteindre 305 cycles catalytiques soit le triple de la réaction témoin (H) toujours pour un rendement de 60% mais toutefois avec une augmentation non négligeable de la part de la réaction non catalysée.

Ces résultats mettent en évidence que cet apport nécessaire en Cl⁻ se doit d'être fait de façon fractionnée au cours du temps pour éviter une concentration en ions chlorure trop élevée qui entrainerait alors des réactions non catalysées.

VIII) Diastéréosélectivité

Malgré les avantages non négligeables apportés par cette métalloenzyme artificielle, aucune catalyse d'oxydation d'alcènes réalisée jusqu'à présent ne présente d'excès énantiomérique. Cependant, la difonctionnalisation des substrats **2** et **3** crée un centre stéréogène supplémentaire, par rapport au 2-chloro-1-phényléthanol, lors de la formation des chlorhydrines correspondantes. Ceci permet l'accès à quatre diastéréoisomères. Afin d'étudier la diastéréosélectivité des catalyses d'oxydation de ces deux substrats, les tests catalytiques ont été de nouveau effectués dans les conditions standards. Le milieu réactionnel a été analysé en GC, afin de contrôler le bon déroulement de l'activité catalytique puis par HPLC sur colonne Chiralcel OD afin de mesurer la proportion relative de chaque diastéréomère (Figure 72).

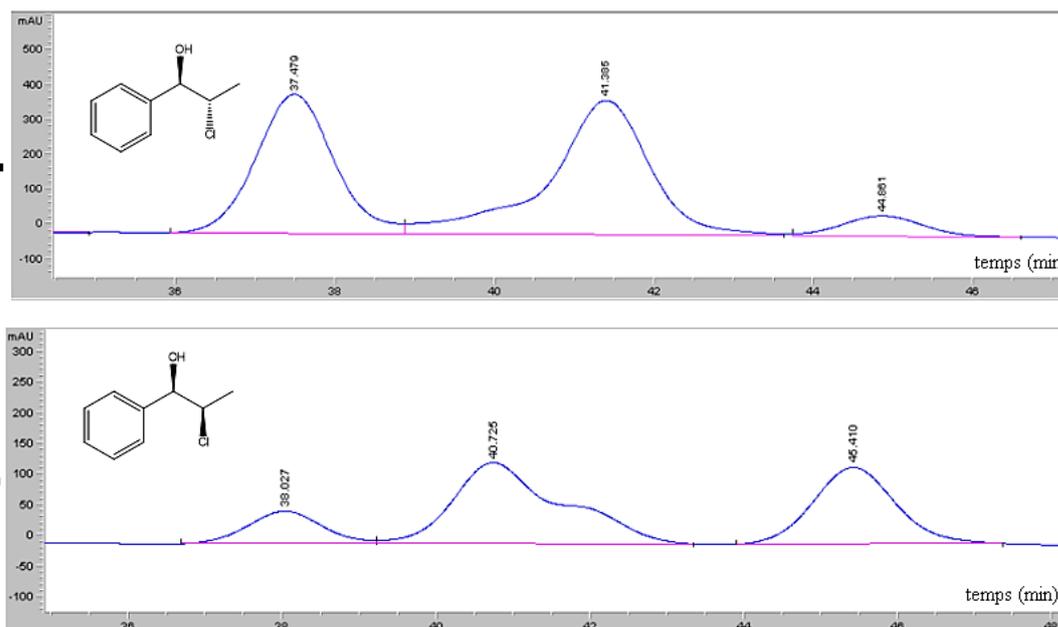


Figure 72. Chromatogramme HPLC des catalyses d'oxydation du *trans*- β -méthylstyrène **S2** (en haut) et du *cis*- β -méthylstyrène **S3** (en bas) par *Rubpza*-Nika dans le tampon HEPES (10 mM, pH 7) avec $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ comme oxydant en conditions standards de catalyse. Hexane/*i*PrOH : 95/5 sur colonne Chiralcel OD avec un débit de 0,25 mL.min⁻¹.

Dans le cas de **S2**, le profil HPLC montre une distribution de 3 pics entre 36 et 46 minutes. On note par la même occasion un épaulement à l'origine du pic à 41 minutes. Tous ces signaux sont absents lors des contrôles sans catalyseur. Une seconde observation permet également de relier deux à deux ces signaux. En effet, le signal à 37 minutes est de même intensité que le signal à 41 minutes. Ces deux signaux forment la paire A. De même, l'épaulement à 40 minutes est d'intensité égale au signal ayant un temps de rétention de 44 minutes, ceux-ci forment la paire B. On note une prédominance en intensité et intégration de la paire A sur la paire B. Enfin, le suivi HPLC étant réalisé par un détecteur UV-visible, il est alors possible d'accéder au profil d'absorbance de chaque signal et ainsi de les comparer (Figure 73).

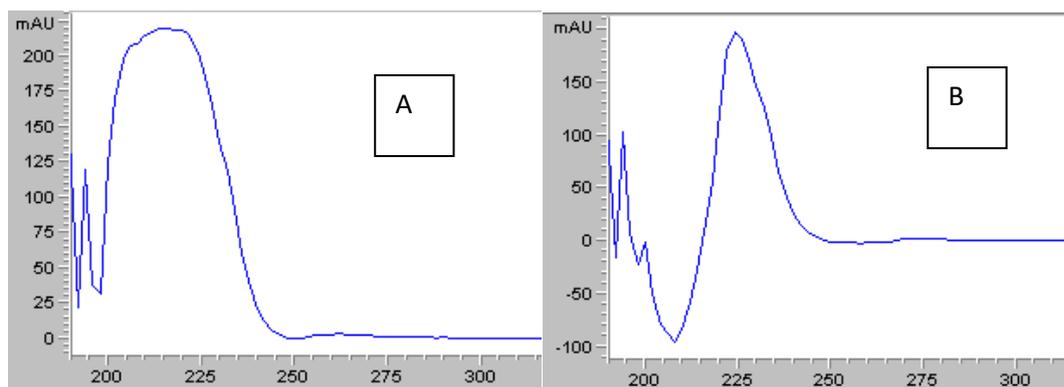


Figure 73. Spectre d'absorption UV-visible des composés possédant un temps de rétention de A) 37 et 41 minutes ou de B) 40 et 45 minutes.

Au sein d'une même paire, chaque signal présente un spectre d'absorption identique. Cependant, d'une paire à l'autre, on note un léger glissement bathochrome de l'absorbance avec une absorbance maximum atteinte pour une longueur d'onde de 215 nm, en ce qui concerne le spectre A, et 230 nm en ce qui concerne le spectre B. Étant donné que les chromatogrammes GC/MS ne révèlent pas la formation d'autres produits que la chlorhydrine, ces deux paires de signaux sont attribuées à deux paires de diastéréoisomères du 2-chlorophénylpropanol. La catalyse d'oxydation d'alcènes par **Rubpza-NikA** présente donc une diastéréosélectivité modérée avec un rapport diastéréoisomérique de 6,3.

Concernant le substrat **3**, le profil HPLC montre lui aussi un profil HPLC à 3 pics pour un temps de rétention à 38, 40 et 45,5 minutes, respectivement, plus un épaulement visible à la sortie du deuxième signal pour un temps de rétention de 42 minutes. Bien qu'ils ne soient pas répartis avec la même intensité, ces signaux correspondent à ceux observés lors de la catalyse du substrat **2**. A nouveau, les intensités des signaux et les spectres UV-visible correspondants sont reliés deux à deux en ce qui concerne les signaux à 38 et 42 minutes ainsi que ceux à 40 et 45 minutes. Avec la formation des quatre diastéréoisomères, la catalyse d'oxydation du *cis*- β -Méthylstyrène n'est donc guère plus diastéréosélective que précédemment. Cependant, cette fois la paire B est prédominante avec un rapport diastéréoisomérique de 2,6. Si la catalyse d'oxydation du *cis*- β -méthylstyrène et du

trans- β -méthylstyrène par l'hybride n'est pas énantiosélective et peu diastéréosélective, le fait que la paire de diastéréomères favorisée soit différente en fonction de la configuration de l'alcène met en avant un caractère stéréospécifique.

IX) Vers une catalyse énantiosélective.

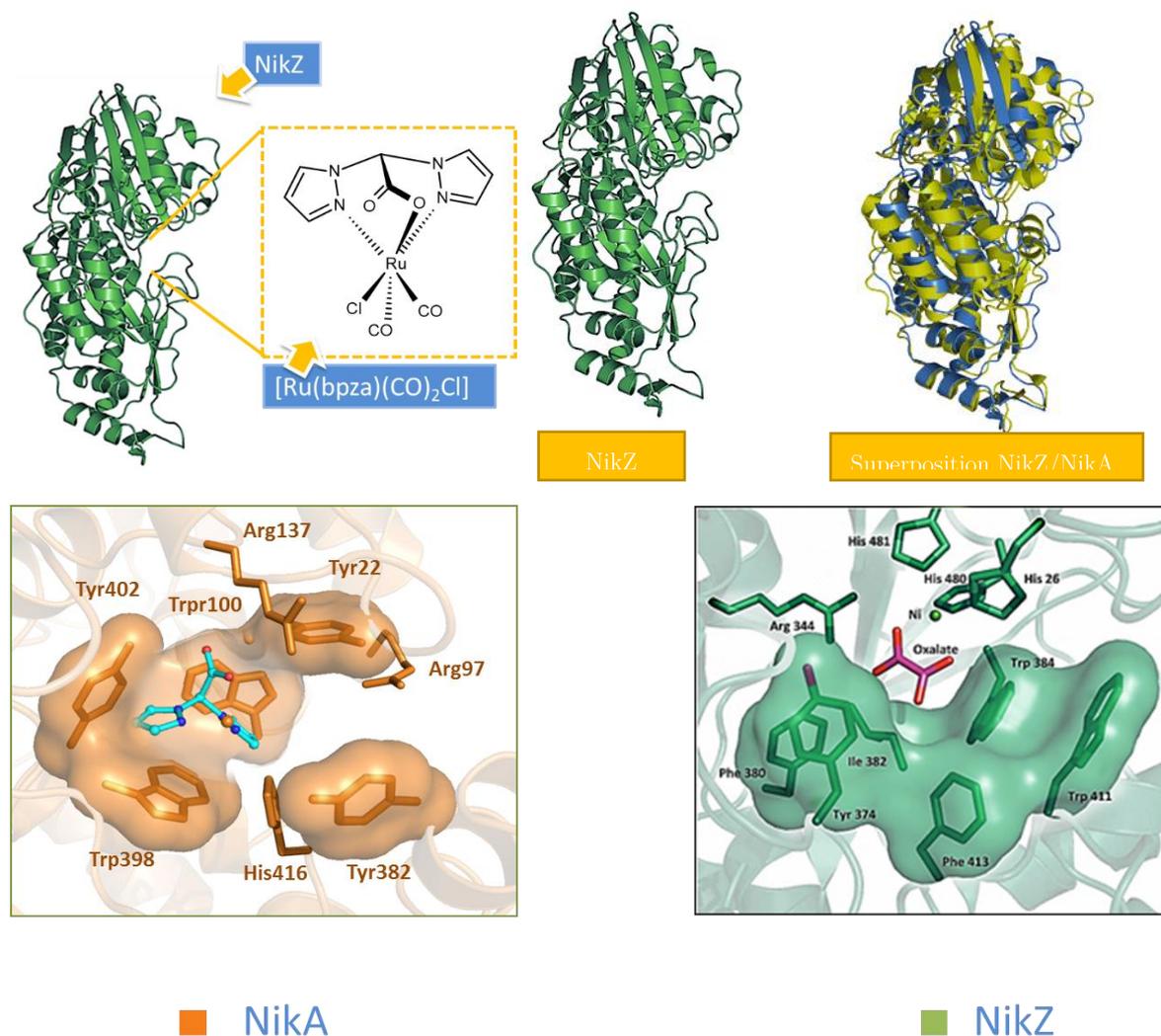


Figure 74. Comparaison des structures tridimensionnelles et des centres de fixation du nickel des protéines NikA et NikZ.

Les catalyses d'oxydation du styrène ainsi que des *cis* et *trans*- β -méthylstyrène par Rubpza-NikA forment le 2-chlorophénylpropanol en mélange racémique. Toutefois, comme décrit dans le chapitre 1, une modification de la seconde sphère de coordination constitue un outil majeur dans le développement de métalloenzymes artificielles énantiosélectives en permettant parfois un gain d'excès énantiomérique.

Dans cet objectif, avant de commencer de longs travaux de mutagenèse, la suite du projet a été centrée sur la recherche d'autres charpentes protéiques naturellement existantes. Cette recherche a été axée sur des protéines, qui bien que présentant de fortes similitudes avec NikA, comportent quelques différences au niveau du site actif dans la poche protéique. L'idée a alors été de tester des protéines analogues à la protéine NikA, c'est-à-dire des protéines péripasmiques de transport de nickel chez d'autres bactéries qu'*Escherichia coli*.

La protéine NikZ, provenant de la bactérie *Campylobacter jejuni*, a alors été retenue. En effet, à l'image de la protéine NikA, elle possède aussi deux domaines distincts, composés de feuillets β et d'hélices α , qui, à leur interface, créent une cavité possédant un site de fixation du Ni^{2+} . La très forte similitude concernant les structures tertiaire et secondaire qu'il y a entre ces deux protéines est illustrée par la Figure 74 qui représente la superposition des deux protéines. Cependant, un focus sur le site de fixation naturel du nickel montre des différences au niveau de la structure primaire. En effet, la cavité protéique de NikZ possède une distribution en acides aminés hydrophobes différente et plus confinée que celle de NikA tout en conservant une forte analogie avec cette dernière. Bien qu'il existe des différences dans leurs structures primaires, la protéine NikZ présente elle aussi une arginine permettant un ancrage du complexe inorganique, accompagné d'une tyrosine et de deux tryptophanes.

L'hybride Rubpza-NikZ a alors été préparé dans les mêmes conditions que Rubpza-NikA puis testé en catalyse d'oxydation d'alcènes sur le styrène et les *cis* et *trans*- β -méthylstyrène. Dans les trois catalyses, le produit formé reste la chlorhydrine correspondante. L'excès énantiomérique de chacune de ces catalyses a été mesuré par HPLC chirale dans les mêmes conditions que précédemment (colonne Chiralcel OD, Hexane/*i*PrOH : 95/5, 0,25 mL.min⁻¹). Les résultats sont regroupés dans le Tableau 9.

Tableau 9. Enantiosélectivité des catalyses d'oxydation des substrats **1**, **2** et **3** par la métalloenzyme artificielle **Rubpza-NikZ** dans le tampon HEPES (10 mM, pH 7) avec $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ comme oxydant. Conditions : catalyseur / substrat / oxydant = 1 / 500 / 1200 éq..

substrat	Excès énantiomérique		
	Styrène	<i>trans</i> - β -méthylstyrène	<i>cis</i> - β -méthylstyrène.
Rubpza-NikZ	10%	0%	0%

La catalyse d'oxydation du styrène par **Rubpza-NikZ** permet d'atteindre un ee de 10%. La différence de confinement hydrophobe des deux sites actifs permet à **Rubpza-NikZ** de procéder à une oxydation légèrement énantiosélective. Pour autant, cette propriété ne s'est pas montrée effective lors de la catalyse d'oxydation du *trans* et du *cis*- β -méthylstyrène. Un positionnement différent du substrat dans le site actif provoqué par un encombrement local pourrait en être la cause. Si l'excès énantiomérique mesuré lors de la catalyse d'oxydation est encore faible, ces résultats restent malgré tout encourageants puisqu'ils confirment un lien étroit entre l'agencement de la poche protéique et l'énantiosélectivité de la catalyse. Ceci ouvre la porte sur de futurs travaux de mutagenèse.

X) Mécanisme

Après avoir défini les fonctionnalités de cette métalloenzyme artificielle, il a paru important de comprendre son mécanisme catalytique. D'ailleurs, l'ensemble des expériences réalisées précédemment sont autant d'indices à confronter. En premier lieu, la caractérisation de l'hybride et du complexe inorganique libre indique une activation de **Rubpza** par la protéine. Ainsi, un ligand carbonyle est échangé au profit d'une molécule d'eau. Deuxièmement, la réactivité de cette nouvelle métalloenzyme artificielle montre une chimiosélectivité et une régiosélectivité de 100%. Le produit formé, une α -hydroxy- β -chloro chlorhydrine, résulte ainsi d'une addition électrophile. De plus, la stéréospécificité observée laisse suggérer une réaction en deux étapes passant par un intermédiaire réactionnel rigide tel qu'un

époxyde ou un chloronium suivie d'une ouverture de ce dernier par un nucléophile. Enfin, l'isomérisation partielle qui permet la formation des quatre diastéréoisomères suggère la formation partielle d'une entité carbocationique permettant une rotation de la liaison C-C, lors de ce mécanisme en deux étapes.

Dans un second temps, le fait que chaque contrôle (B) (catalyseur = complexe de ruthénium seul) ne permette pas d'accéder à la formation de chlorhydrine, suggère que le complexe de ruthénium seul ne peut générer cet intermédiaire réactionnel. Toutefois, les catalyses sont réalisées par un hybride généré *in situ*, 10 équivalents de Rubpza restent donc libres en solution et peuvent intervenir lors de l'ouverture d'un intermédiaire réactionnel ponté formé préalablement au sein de l'hybride. Dans le cadre de cette hypothèse, il est nécessaire de vérifier le rôle joué par l'hybride ou par Rubpza libre.

(1) Mécanisme en 2 étapes

De nouveaux contrôles ont été réalisés en partant du 2-méthylphényloxirane, l'époxyde *trans*- β -méthylstyrène, en tant que substrat. La stratégie consiste alors à suivre l'ouverture de l'époxyde dans les conditions suivantes :

Substrat + Rubpza-NikA (P),

Substrat + Rubpza libre. (Q),

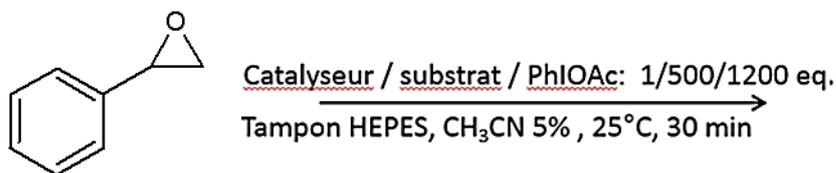
Substrat + NikA (R),

Substrat + PhI(OAc)₂ (S),

Substrat + Rubpza-NikA + PhI(OAc)₂ (T),

Substrat + Rubpza libre + PhI(OAc)₂ (U).

Tableau 10. Résultats de la catalyse d'ouverture du 2-méthylphényloxirane, avec la protéine Nika, le complexe *Rubpza* ou l'hybride *Rubpza*-Nika en absence ou en présence de $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ en conditions standards.



	Diol	Chlorhydrine
(P)	0%	0%
(Q)	0%	0%
(R)	0%	0%
(S)	22%	0%
(T)	0%	0%
(U)	0%	0%

Dans un premier temps, le chromatogramme obtenu au cours du contrôle (S) ne montre aucune trace de produit d'ouverture de l'époxyde. La seule présence de l'oxydant n'est donc pas suffisante pour hydrolyser le 2-phényloxirane. Dans un second temps, des tests en absence de $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ mais en présence de l'hybride catalytique (P) ou de ses sous-unités, soit le complexe de ruthénium (II) (Q) libre ou la protéine Nika (R), ont été réalisés. Dans ces conditions, aucun catalyseur ne permet l'ouverture de l'époxyde. De même, le catalyseur hybride reste inactif face au 2-phényloxirane, sa seule présence n'est pas non plus suffisante pour l'hydrolyser. Tous les tests impliquant les acteurs de la catalyse seuls s'étant montrés inefficaces, deux nouvelles expériences combinant catalyseurs et donneur d'oxygène ont été réalisées. Cette fois, la présence de l'hybride catalytique *Rubpza*-Nika aux côtés de l'oxydant (T) permet l'obtention du diol correspondant le 1-phényl-1,2-propanediol avec 22% de rendement soit 55 TON (calculé par rapport à la quantité totale de substrat). Néanmoins, le contrôle (U) ne montre pas l'ouverture de l'époxyde. Une fois de plus *Rubpza*-Nika se démarque de sa sous-unité inorganique libre. Ceci

indique que l'ouverture de l'époxyde est ruthénium et oxydant dépendante. Le complexe de ruthénium (II) requiert une activation par oxydation, peut-être pour accentuer son caractère acide selon Lewis.

Finalement, il faut aussi considérer que le produit obtenu lors de l'ouverture de l'époxyde par Rubpza-NikA, n'est pas la chlorhydrine formée lors des catalyses précédentes, mais le diol correspondant. Si le composé formé n'est pas le même en partant de l'alcène ou de l'époxyde, on peut supposer que ce dernier n'est jamais libéré en solution lors de la catalyse d'oxydation du *trans*- β -méthylstyrène par Rubpza-NikA. Le ruthénium ancré dans la poche protéique de l'hybride contrôlerait alors entièrement les deux étapes réactionnelles, soit l'époxydation et l'ouverture régiosélective par un nucléophile. Toutefois, l'ouverture de l'époxyde, potentiellement formé, par un ion chlorure devrait conduire majoritairement au régioisomère α chloré alors que c'est le régioisomère β chloré qui est produit.

Toujours est-il que la seconde hypothèse consistant en la formation d'un intermédiaire réactionnel chloronium à la place de l'époxyde semble la plus raisonnable. D'autant que la formation de l' α -hydroxy- β -chloro chlorhydrine, par ouverture d'un chloronium par l'eau, répondrait à la règle de Markovnikov qui préconise la formation du carbocation le plus stable.

(2) Espèce oxydante.

À ce jour, la nature et la structure de l'espèce oxydante restent indéterminées. Néanmoins, plusieurs possibilités sont envisageables (Figure 75).

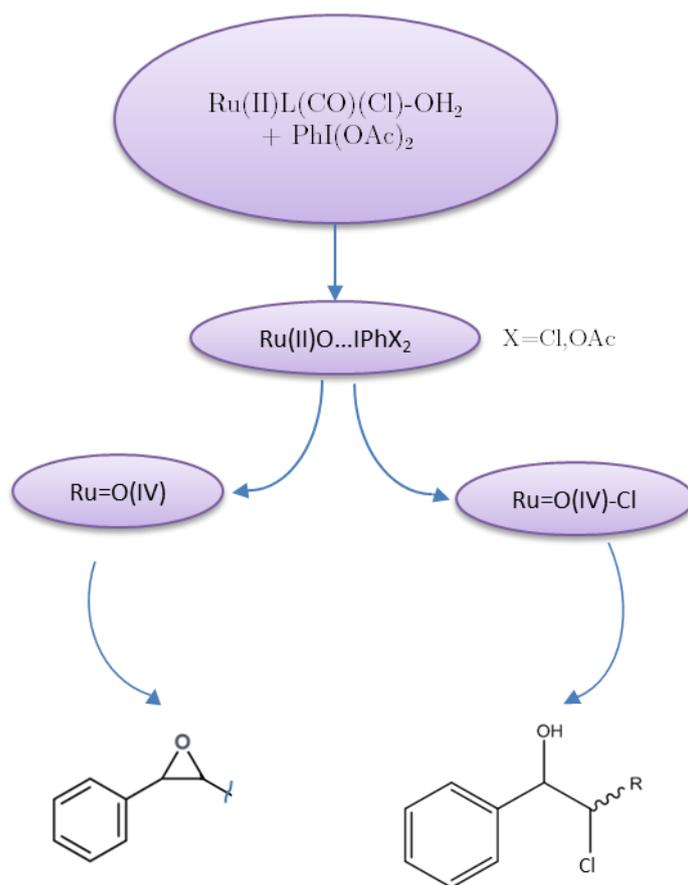


Figure 75. Proposition de mécanismes réactionnels pour l'oxydation d'alcènes en chlorhydrate par la métalloenzyme artificielle *Rubpza-NikA*.

Premièrement, la formation exclusive de chlorhydrate, écarte l'hypothèse d'une espèce ruthénium (IV) dioxy qui permettrait la formation des diols correspondants.¹¹⁸ Deuxièmement, l'ensemble des contrôles réalisés précédemment démontrent une activation de l'oxydant par le catalyseur. Les caractérisations structurales ont montré la présence d'une molécule d'eau substituant un ligand carbonyle. Une attaque de cette molécule d'eau liée au ruthénium sur le diacétate d'iodobenzène pourrait alors entraîner la formation d'une espèce catalytique $[\text{Ru}(\text{II})\text{O}\dots\text{IPhX}_2]$. Cette dernière permettrait de générer une espèce ruthénium oxo $\text{Ru}(\text{IV})=\text{O}$ alors capable de transférer un atome d'oxygène au substrat, et par la même occasion de former un intermédiaire de type époxyde. Soit de générer une espèce $\text{O}=\text{Ru}(\text{IV})-\text{Cl}$ qui permettrait alors un transfert de chlore entraînant la formation d'un intermédiaire de type chloronium. Enfin, les réactions étant réalisées en présence d'ion chlorure, il

est possible de former une autre espèce à base d'iode hypervalent : PhICl_2 à partir du $\text{PhI}(\text{OAc})_2$. Cette nouvelle espèce pouvant être l'oxydant terminal de la réaction. Dans tous les cas, ces hypothèses nécessitent vérification. De nouvelles études mécanistiques feront l'objet d'une partie de la thèse de Mlle Lopez.

XI) Conclusion

Un métalloenzyme artificielle à centre ruthénium (II) et à ligand scorpionate a été développée au cours de ce projet de thèse. Premièrement, des analyses de caractérisation, dont des études de structures cristallographiques, ont confirmé l'ancrage du complexe $[\text{Ru}(\text{II})\text{bpza}(\text{CO})_2(\text{Cl})]$ dans la protéine NikA. Ceci met en avant la polyvalence de cette dernière qui est capable d'ancrer différents centres métalliques (fer, ruthénium..). Deuxièmement, des études de réactivité ont révélé que cette métalloenzyme artificielle, en présence de diacétate d'iodobenzène uniquement, fait preuve d'une activité catalytique unique oxydation d'alcènes benzylique en milieu aqueux (tampon HEPES 10 mM, pH 7). En effet, à ce jour, **Rubpza-NikA** est la seule métalloenzyme artificielle capable de difonctionnalisation d'alcènes en chlorhydrines. Il a, par la même occasion, été montré que son activité est le résultat d'une synergie entre sa sous-unité inorganique et sa protéine hôte, et non le résultat d'une addition de l'activité de ces deux acteurs. De plus, cet hybride catalytique s'est montré résistant en milieux oxydant fort, en atteignant jusqu'à 258 cycles catalytiques. Cette activité catalytique est d'ailleurs plus de dix fois supérieure à celle obtenue en milieu organique par la famille de ruthénium (II) scorpionate $[\text{RuL}(\text{CO})_2\text{Cl}]$ dont le complexe **Rubpza** est issu (22 TON pour $[\text{Ru}(\text{II})\text{bdmpza}(\text{CO})_2(\text{Cl})]$). Concernant l'aspect énantioselectif, la réaction d'oxydation d'alcènes catalysée par **Rubpza-NikA** ne permet que la formation de chlorhydrines sous la forme d'un mélange racémique. Toutefois, **Rubpza-NikA** se veut 100% chimiosélectif, régiosélectif (formation exclusive de régioisomères β), et stéréospécifique. En outre, des premières études sur **Rubpza-NikZ** ont permis de souligner une relation étroite entre l'agencement de la

poche protéique et l'excès énantiomérique. En effet, un petit changement dans l'environnement protéique du site actif montre une évolution d'excès énantiomérique : 10% en catalyse d'oxydation du styrène. À plus long terme, une mutagenèse dirigée est envisagée au niveau du site actif. Un docking permettra de mettre en évidence les différents acides aminés pouvant interagir avec, ou stabiliser, le substrat dans un rayon d'environ 10 Å autour du métal. Les mutagenèses envisagées se concentreront sur ces acides aminés.

Concernant le mécanisme catalytique, la structure cristallographique des hybrides comparée à celle du complexe inorganique seul, a mis en évidence une différence de la structure électronique du complexe de ruthénium. Cette observation permet, en partie, d'expliquer la différence de réactivité observée entre la métalloenzyme artificielle et sa sous-unité inorganique libre. De plus, les données rassemblées tout au long de cette thèse laissent envisager la formation d'un intermédiaire réactionnel de type époxyde ou chloronium. Un passage par de tels intermédiaires réactionnels ouvre la porte à d'intéressantes applications, permettant l'obtention de précurseurs de composés chimiques produits industriellement. Cette propriété fera l'objet de futurs travaux concernant l'insertion de différents nucléophiles. Néanmoins, le mécanisme de cette oxydation nécessite une étude plus complète, notamment en ce qui concerne la nature de l'espèce catalytiquement active.

D) Bibliographie

(45) Esmieu, C.; Cherrier, M. V.; Amara, P.; Girgenti, E.; Marchi-Delapierre, C.; Oddon, F.; Iannello, M.; Jorge-Robin, A.; Cavazza, C.; Ménage, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 3922.

(47) Cherrier, M. V.; Girgenti, E.; Amara, P.; Iannello, M.; Marchi-Delapierre, C.; Fontecilla-Camps, J. C.; Menage, S.; Cavazza, C. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, *17*, 817.

- (53) Allard, M.; Dupont, C.; Robles, V. M.; Doucet, N.; Lledos, A.; Marechal, J. D.; Urvoas, A.; Mahy, J. P.; Ricoux, R. *ChemBiochem* **2012**, *13*, 240.
- (71) Kohler, V.; Mao, J. C.; Heinisch, T.; Pordea, A.; Sardo, A.; Wilson, Y. M.; Knorr, L.; Creus, M.; Prost, J. C.; Schirmer, T.; Ward, T. R. *Angew. Chem, Int. Ed.* **2011**, *50*, 10863.
- (88) Rousselot-Pailley, P.; Bochot, C.; Marchi-Delapierre, C.; Jorge-Robin, A.; Martin, L.; Fontecilla-Camps, J. C.; Cavazza, C.; Menage, S. *ChemBiochem* **2009**, *10*, 545.
- (94) Fernandez-Gacio, A.; Codina, A.; Fastrez, J.; Riant, O.; Soumillion, P. *ChemBiochem* **2006**, *7*, 1013.
- (97) Kokubo, T.; Sugimoto, T.; Uchida, T.; Tanimoto, S.; Okano, M. *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* **1983**, 769.
- (103) Amarnath, V.; Amarnath, K. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 301.
- (104) Xu, Z.; Singh, J.; Schwinden, M. D.; Zheng, B.; Kissick, T. P.; Patel, B.; Humora, M. J.; Quiroz, F.; Dong, L.; Hsieh, D.-M.; Heikes, J. E.; Pudipeddi, M.; Lindrud, M. D.; Srivastava, S. K.; Kronenthal, D. R.; Mueller, R. H. *Organic Process Research & Development* **2002**, *6*, 323.
- (105) Cho, D. O.; Kwon, Y.; Cha, K. H.; Kim, Y.; Tae, H. S.; Google Patents: 2012.
- (106) Zhu, G.; Gong, H.; Becker, S.; Google Patents: 2007.
- (107) El-Qisairi, A.; Hamed, O.; Henry, P. M. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2790.
- (108) Patel, R. N. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 659.
- (109) Patel, R. N.; Chu, L.; Mueller, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 3105.
- (110) Beck, A.; Weibert, B.; Burzlaff, N. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, *2001*, 521.
- (111) Burzlaff, N.; Beck, A.; Muller, R. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *96*, 110.
- (112) Schrock, R. R. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 145.
- (113) Meyer, T. J.; Huynh, M. H. V. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 8140.
- (114) Tuerkoglu, G.; Tampier, S.; Strinitz, F.; Heinemann, F. W.; Huebner, E.; Burzlaff, N. *Organometallics* **2012**, *31*, 2166.
- (115) Peters, L.; Hübner, E.; Haas, T.; Heinemann, F. W.; Burzlaff, N. *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 2319.
- (116) Boeri Erba, E.; Petosa, C. *Protein Science* **2015**, *24*, 1176.
- (117) Lopez-Hernandez, A.; Muller, R.; Kopf, H.; Burzlaff, N. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, 671.
- (118) Pagliaro, M.; Campestrini, S.; Ciriminna, R. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 837.
- (119) Ujwaldev, S. M.; Sindhu, K. S.; Thankachan, A. P.; Anilkumar, G. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 6175.

Chapitre 3 : Des oxygénases artificielles à base de fer

A) Projet

La seconde partie de ce projet de thèse s'inscrit dans la thématique de développement d'oxygénases artificielles.

Cette étude constitue la suite directe des travaux décrit sur l'hybride FeL0-NikA.⁷⁹ Une étude par cristallographie en temps résolu avait permis de mettre en évidence son aptitude à activer l'oxygène moléculaire en présence d'un réducteur générant une espèce active Fer(III) η^1 -peroxo.

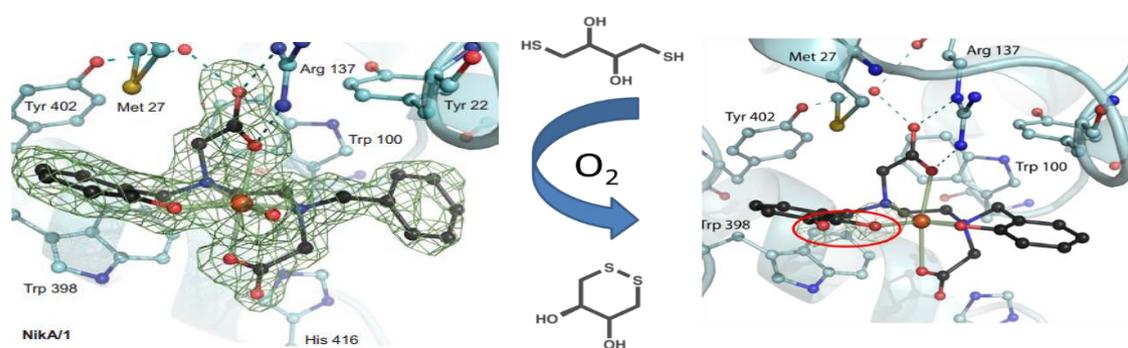


Figure 76. Structures cristallographique de FeL0-NikA avant et après traitement au couple DTT/O₂.

Il était alors observé une double hydroxylation aromatique du ligand L0 au niveau de son bras benzylique. Cette oxydation est entourée en rouge sur la Figure 76. Les différents états intermédiaires identifiés dans les structures cristallographiques semblaient suggérer que la première hydroxylation aromatique favorisait la seconde. Comme le montre la Figure 76, un des atomes d'oxygène du catéchol nouvellement formé provoquait alors la saturation de la première sphère de coordination de l'hybride FeL0-NikA. Il en résultait alors une inhibition de son activité à deux cycles catalytiques, en considérant le ligand comme un substrat interne.

L'objectif de ce projet réside alors dans l'optimisation de ce système en lui permettant d'accéder à des propriétés catalytiques par l'augmentation du nombre de cycles catalytiques qu'il peut réaliser. Pour cela, la priorité est d'empêcher les dihydroxylations aromatiques en positions ortho- et méta-benzyliques. Ces deux

hydroxylations étant successives, l'idée a alors été de bloquer la première hydroxylation qui se fait en position ortho.

Trois approches ont alors été proposées:

- Premièrement, retirer le bras benzylique du ligand, en le remplaçant par un groupement méthyle, afin d'empêcher toute hydroxylation (formation de FeL1);

- Deuxièmement, afin de ne pas trop modifier la structure électronique du complexe correspondant, substituer uniquement les deux positions ortho benzyliques par des groupements méthyles (formation de FeL2).

- Troisièmement, puisque la cristallographie sur FeL0-NikA/O₂/DTT a permis d'observer des états intermédiaires dans le mécanisme réactionnel, un troisième ligand a été envisagé. Dans l'objectif d'observer une nouvelle réactivité intramoléculaire, la substitution d'une seule position ortho par un groupement thioéther dans l'idée d'observer une sulfoxydation intramoléculaire (formation de FeL3) a été proposée.

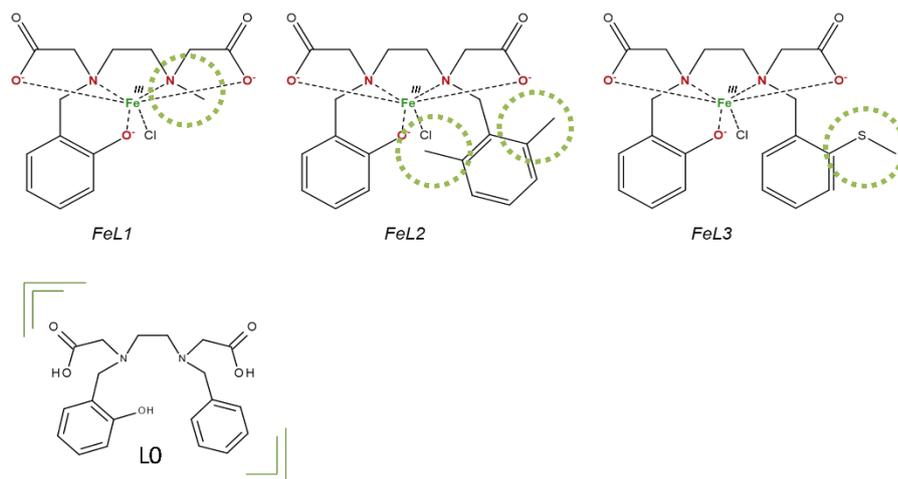


Figure 77. Modification apportées à FeL_0 en substituant des groupements du ligand L_0 pour former les complexes inorganiques $FeL1$, $FeL2$ et $FeL3$.

En résumé, ces modifications sont représentées à partir des complexes dans la Figure 77 où elles sont entourées en pointillés verts. La synthèse et la caractérisation de trois catalyseurs, de leurs hybrides FeL_n -NikA correspondants et de leurs activités catalytiques sont donc le fondement premier de ce chapitre de thèse (Figure 78). Dans un second temps, en cas d'activité catalytique surpassant 2 cycles catalytiques en activation d'oxygène moléculaire par les hybrides FeL_n -NikA, un premier screening de substrat sera réalisé, suivi d'un deuxième concernant la nature du réducteur utilisé.

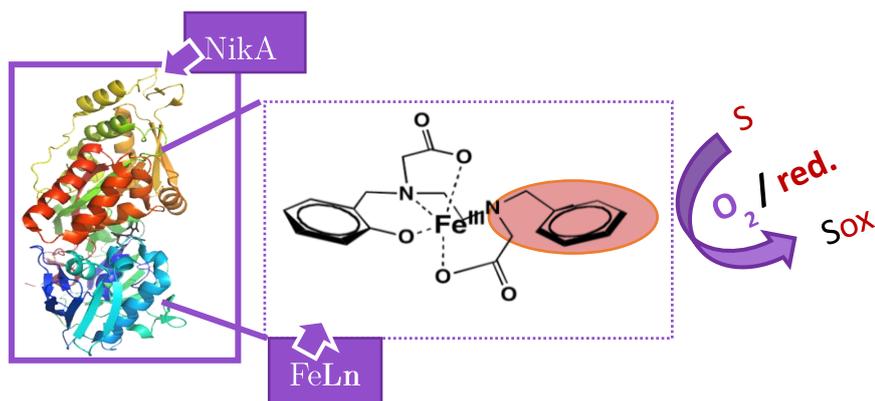


Figure 78. Projet de développement de nouvelles oxygénases artificielles où les différents travaux à réaliser sont signalés en rouge.

B) Synthèse des ligands

Avant d'élaborer les trois hybrides catalytiques correspondants, il faut dans un premier temps synthétiser les trois ligands mentionnés plus haut.

La synthèse envisagée implique une condensation d'une molécule d'éthylènediamine sur une (L1) ou deux (L2 et L3) molécules d'aldéhydes d'intérêt. Pour ce faire, le schéma réactionnel comporte quatre étapes dont deux étapes clés :

- la mono substitution de l'éthylènediamine par de l'acide salicylique,
- l'insertion de deux bras acétate de *tert*-butyle sur le ligand.

I) Synthèse de l'acide *N*-(2, 6-diméthylbenzyl)-*N'*-(2-hydroxybenzyl)-*N, N'*-éthylènediaminediacétique : L2

(1) Étape n°1

La première étape de synthèse consiste à préparer l'éthylènediamine monosubstituée **1** (*N*-(2-hydroxybenzyl)-*N,N'*-éthylènediamine) par une réaction d'amination réductrice d'un aldéhyde salicylique sur l'éthylènediamine (Schéma 2).

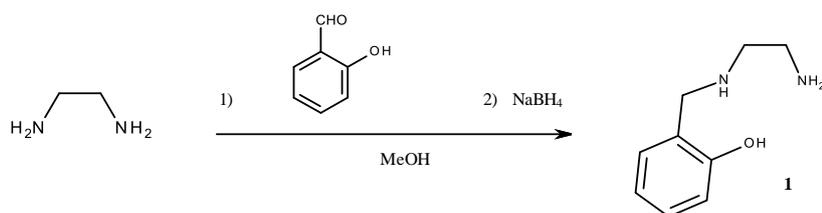


Schéma 2.

Étant donné que le composé **1** possède encore une fonction amine primaire, et qu'une diaddition est autant favorable qu'une monoaddition, il existe un risque de former un produit secondaire symétrique disubstitué. Cette réaction nécessite donc un contrôle particulier. En effet, suivant les travaux publiés par C.M. Micklitsch, l'idée est alors de minimiser la probabilité de rencontre de l'aldéhyde salicylique avec une molécule de **1** déjà formée.¹²⁰ Pour cela, la réaction se fait sous un large excès d'éthylènediamine dans un milieu réactionnel suffisamment dilué, le tout à 0°C. Deux essais ont été effectués à cinq ou dix équivalents d'éthylènediamine : dans les deux cas le composé **1** a été obtenu avec de très bon rendement soit 75 et 80%, respectivement. Cependant, la faible différence de rendement (5%) et la difficulté à éliminer l'excès d'éthylènediamine, ne justifie pas l'utilisation de 10 équivalents d'éthylènediamine. Ce sont donc les conditions impliquant seulement 5 équivalents qui ont donc été retenues.

(2) Étape n°2

Pour la deuxième étape, qui consiste à introduire la modification du ligand au niveau du bras benzyle de **L0**, l'étape précédente a simplement été reconduite en remplaçant l'aldéhyde salicylique par du diméthylbenzaldéhyde (Schéma 3).

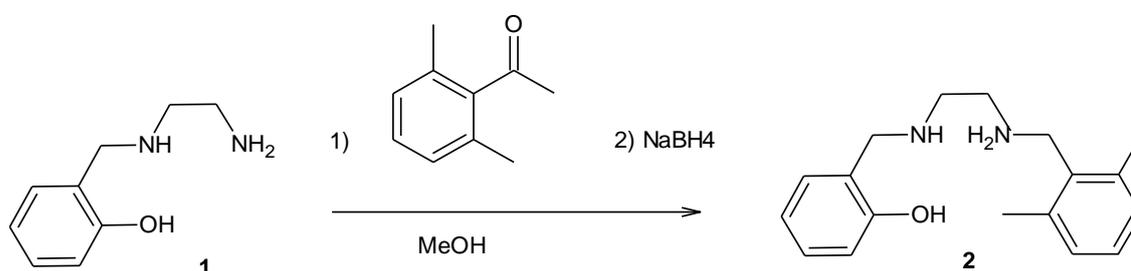


Schéma 3.

Néanmoins, le substrat **1** étant déjà monosubstitué, il ne possède plus qu'une fonction primaire, fonction plus réactive qu'une amine secondaire. Cette étape comporte alors moins de problème de polyalkylation : la réaction est ainsi réalisée avec un seul

équivalent d'aldéhyde. La diamine **2** dissymétrique est obtenue avec un très bon rendement (quantitatif) et ne nécessite pas d'étape de purification.

(3) Étape n°3

La troisième étape de cette synthèse consiste à introduire les deux bras carboxyliques (dont la présence est nécessaire à l'ancrage du complexe correspondant dans la protéine). Cependant, afin d'anticiper les difficultés de purification que peuvent induire des fonctions carboxyliques, celles-ci sont insérées sous leurs formes protégées par un ester. Les deux fonctions amines étant à présent secondaires, il est tout à fait envisageable de réaliser une réaction d'alkylation par substitution nucléophile d'un halogénure plutôt que de passer par la formation d'un intermédiaire iminium, moins favorable qu'une imine. C'est pourquoi la réaction est effectuée cette fois en présence de bromoacétate de *tert*-butyle (Schéma 4).

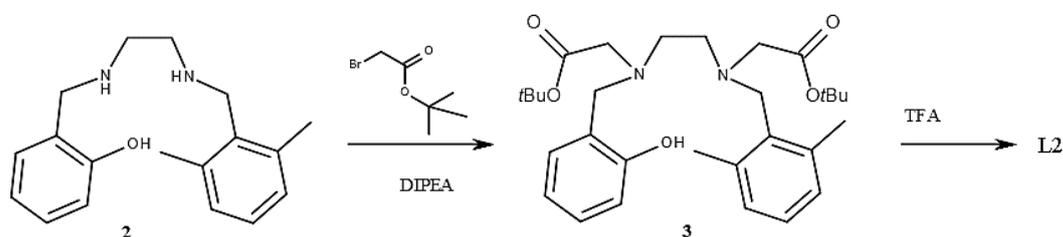


Schéma 4.

Le composé **2** est traité par du bromoacétate de *tert*-butyle en présence de base dont le rôle est de piéger l'acide bromhydrique formé en tant que sous-produit.

De précédents travaux au laboratoire ont éliminé le choix des bases suivantes : triéthylamine, carbonate de potassium et diazabicycloundécène (DBU). En effet, les deux premières bases conduisent à un rendement moyen de 50% associé à une récupération de 50% de 2.2HBr. Enfin, le DBU forme majoritairement du cétène, un produit du 2-bromoacétate de *tert*-butyle. Une quatrième base est alors testée : la

diisopropyléthylamine (DIPEA). Toutefois, la diamine tertiaire **3** n'a été obtenue qu'avec un rendement moyen de 50% après une étape de purification sur silice. Ces résultats suggèrent que la présence de base n'est pas d'une aide significative tandis que le bromhydrate de **2** peut être récupéré puis retraité avec de la soude pour être réutilisé.

Le dernier point important de cette étape réside dans la déprotection des acides carboxyliques qui est réalisée en présence de 40 équivalents d'acide trifluoroacétique. Enfin, une simple précipitation dans l'éther diéthylique permet d'obtenir **L1** avec un très bon rendement (quantitatif), suffisamment pur pour être directement utilisé dans une étape de synthèse de complexe de fer III correspondant.

II) Synthèse de l'acide *N*-(méthyl)-*N'*-(2-hydroxybenzyl)-*N, N'*-éthylène-diaminediacétique : **L1**

Le ligand **L1** a été synthétisé suivant le même chemin réactionnel que décrit précédemment. Néanmoins, le bras benzyle présent chez **L0** étant absent, la première étape diffère donc en conséquence. De plus, la *N*-méthyléthylènediamine est disponible commercialement. La première étape consiste alors à préparer directement la diamine dissymétrique. Puisque la *N*-méthyléthylènediamine ne comporte qu'une seule fonction amine primaire, cela permet de s'affranchir des difficultés de diaddition mentionnées plus haut. L'amination réductrice se fait alors avec un unique équivalent de *N*-méthyléthylènediamine pour un équivalent d'aldéhyde salicylique. Le produit est obtenu avec un rendement quantitatif. Les deux dernières étapes permettent ensuite l'addition des deux bras acide acétique suivi de leur déprotection selon le même mode opératoire que décrit pour la synthèse de **L2** avec un rendement global de 57%.

III) Synthèse de l'acide *N*-(2-thiométhylbenzyl)-*N'*-(2-hydroxybenzyl)-*N, N'*-éthylènediaminediacétique : **L3**

Le ligand **L3** est synthétisé suivant la même voie de synthèse que **L2**. Après déprotection des fonctions carboxyliques et purification, le ligand **L3** a été obtenu avec un rendement de 24%.

IV) Conclusion :

La synthèse des ligands **L1**, **L2** et **L3** a été faite suivant des étapes d'amination réductrice et d'alkylation par substitution nucléophile d'un halogénure, avec un rendement global de 52%, 40% et 24%, respectivement. Ces rendements restent moyens et nécessitent une optimisation des voies de synthèses. Néanmoins, les quantités obtenues de ligands sont amplement suffisantes pour permettre d'obtenir les complexes de fer correspondants dans des proportions suffisantes pour tester leur réactivité ainsi que celle de leurs hybrides NikA correspondants.

C) Synthèse des complexes

Les complexations de **L1**, **L2**, **L3** ont été réalisées à partir de chlorure de fer(III) en milieu aqueux et à température ambiante selon une stratégie précédemment décrite au laboratoire.⁷⁹ Pour cela, le ligand est, dans un premier temps, mis en suspension dans l'eau. Trois équivalents de potasse (KOH) sont alors ajoutés et permettent la solubilisation totale du ligand. Un équivalent de chlorure de fer(III) est ensuite ajouté au milieu réactionnel. On note l'apparition instantanée d'une coloration violette. Fe**L2** et Fe**L3** précipitent après 17 h d'agitation et sont obtenus sous forme de poudres violette et brun-pourpre, respectivement. Fe**L1** a, quant à lui, nécessité une modification de la méthode de synthèse. Le solvant aqueux a été remplacé par du méthanol puis le complexe a été précipité par ajout d'éther diéthylique et purifié par extraction dans de l'acétonitrile à froid. Les complexes de fer (III) sont ainsi obtenus

sous forme de poudres avec de bons rendements de 75, 80, et 60%, respectivement pour FeL1, FeL2 et FeL3.

l) Caractérisation des complexes FeL1, FeL2, FeL3

Après leur synthèse, tous les complexes ont été caractérisés par spectroscopie UV-visible et infrarouge ainsi que par spectrométrie de masse. Les trois complexes n'ayant pas pu être cristallisés, ce sont donc les analyses spectroscopiques et spectrométriques qui permettront dans un premier temps de définir leur mode de coordination par comparaison au complexe FeL0.

(1) Caractérisation Infrarouge

La Figure 79 présente les spectres infrarouges des complexes. Les spectres ont été réalisés sur un échantillon solide sous forme d'une pastille de KBr.

Premièrement, les trois spectres des complexes montrent une bande d'absorption large autour de 1700-1500 cm^{-1} . Cette bande est attribuée aux vibrations des carboxylates.

Si l'on observe la présence de bandes caractéristiques des liaisons C=O sur chaque spectre, on note un déplacement hypsochrome de ces bandes sur les spectres des complexes en comparaison avec les spectres des ligands seuls (de 1678 à 1630 pour FeL1, de 1678 à 1636 pour FeL2, de 1678 à 1640 pour FeL3). De plus, cette bande devient alors comparable à celle observée sur FeL0, nous informant alors de la coordination des bras carboxylate sur le fer. Ces données confirment donc la chélation du fer par les ligands.

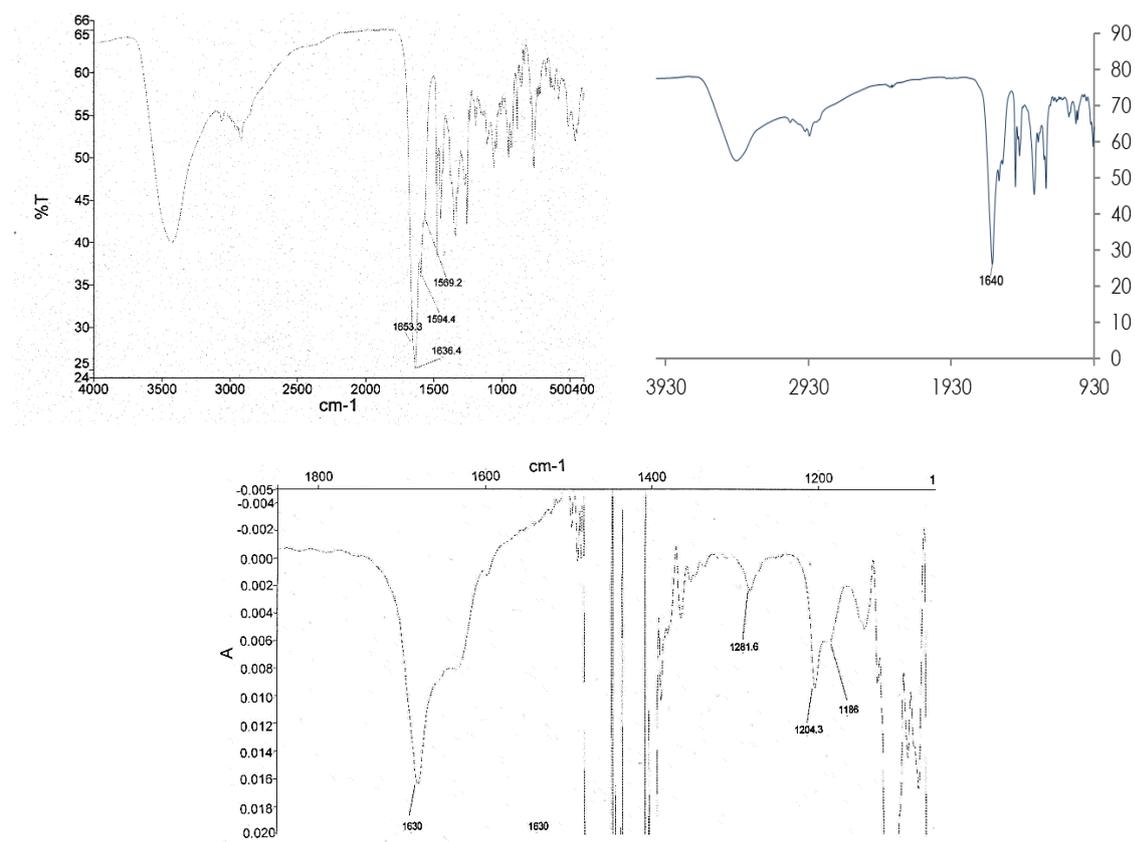


Figure 79. Spectres IR des complexes **FeL1** (en bas au centre), **FeL2** (en haut à gauche) et **FeL3** (en haut à droite).

(2) Spectrométrie de masse

Dans le cas de **FeL1**, le spectre présente un pic parent avec une valeur de $m/z = 384$ qui est attribué à l'ion $[\text{Fe}^{\text{III}} + (\text{L1-3H}) + \text{Cl}]^+$ correspondant au complexe de fer déprotonné au niveau du phénol et des deux fonctions carboxyliques et avec un ligand chloro. Ce dernier provient de l'utilisation du sel de fer FeCl_3 lors de la synthèse des complexes. Lorsque le complexe est dissous dans le méthanol, on note la présence d'un pic à $m/z = 380$ attribué au complexe $[\text{Fe}^{\text{III}} + (\text{L1-3H}) + \text{MeO}]^+$ qui comprend un méthanolate coordonné sur la position labile. On note aussi la présence de pics caractéristiques de polymérisation des complexes à $m/z = 488$ $[2 \text{Fe}^{\text{III}} + 2(\text{L1-3H}) + \text{Cl}]^+$. Afin de s'affranchir des problèmes de polymérisation, les acquisitions de spectrométrie de masse seront effectuées dans l'acétonitrile. Les complexes de fer **FeL2** et **FeL3**, présentent des spectres de masse similaires, puisque on observe pour chacun d'entre eux un pic principal correspondant au complexe de fer déprotonné

trois fois avec un ligand chloro, soit : $m/z = 488 [\text{Fe}^{\text{III}} + (\text{L2-3H}) + \text{Cl}]^-$, et $m/z=506$ $[\text{Fe}^{\text{III}} + (\text{L3-3H}) + \text{Cl}]^-$, respectivement.

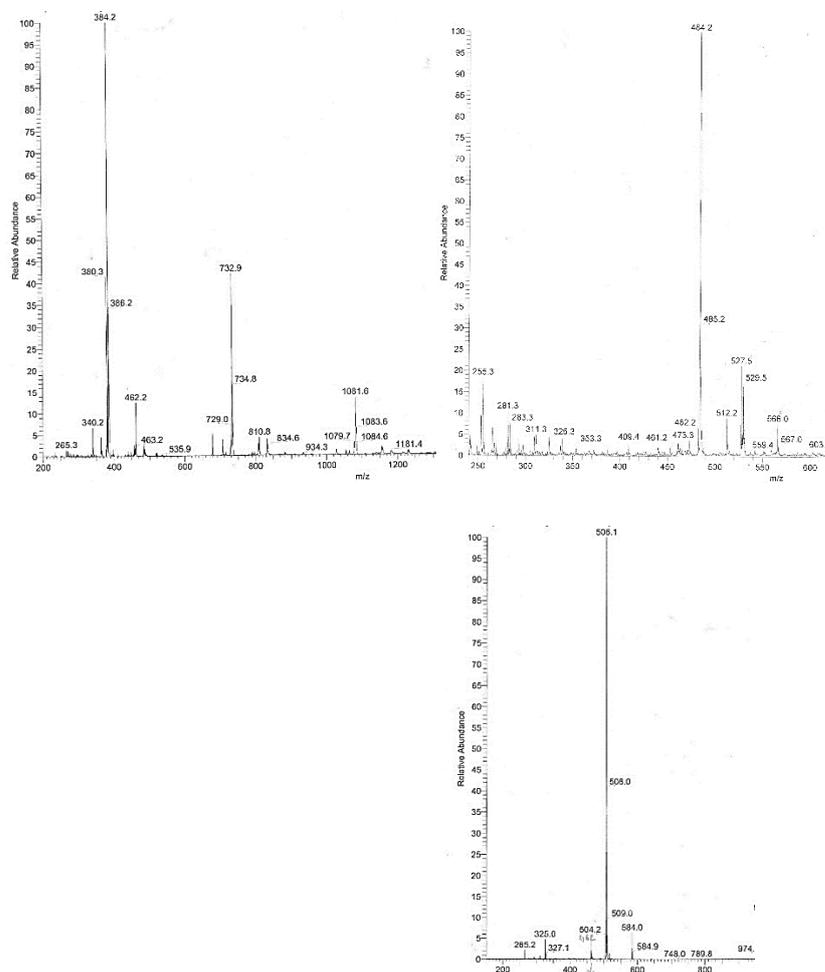


Figure 80. Spectres de masse ESI-MS des complexes *FeL1* (en haut à gauche), *FeL2* (en haut à droite) et *FeL3* (en bas au centre), respectivement, en mode négatif.

Les spectres de masse confirment l'obtention des trois complexes souhaités comportant un ligand **L_n** et mettent en évidence la nature d'un ligand chloro en sixième position. La présence de méthanolate à la place de l'atome de chlore lors des analyses en solution dans le méthanol montre la propriété d'échangeabilité de cette sixième position. Celle-ci reste donc une position ouverte pour interagir avec un substrat exogène ou activer une molécule d'oxydant.

(3) Spectroscopie UV-visible

Les propriétés d'absorption en spectroscopie UV-visible de chacun des trois complexes de fer ont par la suite été étudiées à partir de solutions aqueuses de

concentration 200 μM . Les spectres d'absorptions de FeL1, FeL2 et FeL3 sont présentés Figure 82.

Les spectres UV-visible des trois complexes de fer présentent une large bande d'absorbance dans le visible autour de 400 nm (Tableau 11). On relève le maximum d'absorbance de FeL1 à 465 nm ($\epsilon = 6500 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), celui de FeL2 à 470 nm ($\epsilon = 7250 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et celui de FeL3 à 480 nm ($\epsilon = 16750 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Tableau 11. Maxima d'absorbance et epsilon des complexes de fer FeLn en solution à 200 μM dans le tampon Tris.HCl 40 mM, pH 7,5.

	Abs	λ max (nm)	ϵ ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)
FeL1	0,130	465	6500
FeL2	0,145	470	7250
FeL3	0,335	480	16750

Ces trois bandes d'absorption marquent une bande de transfert de charge correspondant à une transition d'un électron d'une orbitale $p\pi$ du phénolate vers une orbitale $d\sigma^*$ du métal. Ces données confirment ainsi la chélation du fer par les phénolates.

(4) Conclusion

En l'absence de structures atomiques des complexes de fer synthétisés dans ce projet, leurs structures sont proposées à partir des précédentes analyses spectroscopiques et spectrométriques ainsi que de la structure de FeL0 déjà décrite dans la littérature (Figure 81).

Ainsi, les spectres de masse montrent que les trois complexes de fer comportent un ligand chlorure et que les trois ligands sont déprotonnés trois fois. D'ailleurs, les analyses spectroscopiques mettent en évidence que ces derniers se coordonnent à l'atome de fer par leurs fonctions phénolates et par leurs carboxylates.

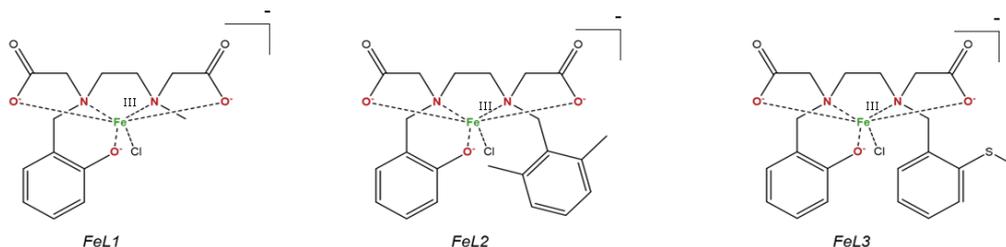


Figure 81. Structures proposées pour les trois complexes FeL_n dont le ligand se coordonne au métal par deux azotes, deux carboxylates et un phénolate. La sixième position du polyèdre de coordination est occupée par un ligand chlorure.

II) Réactivité de FeL_n en solution aqueuse en présence du couple O_2 /DTT sans substrat exogène.

Après avoir caractérisé les trois hybrides FeL_n , les études suivantes reposent sur l'exploration de leurs propriétés réactionnelles. En effet, il s'agit, dans un premier temps, de vérifier que les modifications générées à partir de L_0 en L_1 , L_2 ou L_3 , permettent de conserver l'intégrité de la réactivité initiale dirigée par FeL_0 -NikA soit : l'activation de l'oxygène moléculaire. Dans un second temps, une attention particulière sera portée sur la première sphère de coordination afin de s'assurer que les modifications réalisées préviennent la complexation de cette dernière sur le fer et garantissent le maintien de l'activation du fer. Dans ce cas, une seconde partie de l'étude fonctionnelle des hybrides sera centrée sur la capacité de ces trois systèmes à transférer l'oxygène moléculaire activé à un substrat exogène. L'objectif final étant de vérifier que les nouveaux systèmes sont catalytiques.

Afin d'explorer les capacités des nouveaux complexes de fer à activer l'oxygène moléculaire, les premières études ont donc concerné l'activité des complexes nouvellement obtenus dans les conditions d'oxydation employées précédemment lors des études de la réactivité de l'hybride FeL_0 -NikA.

Concernant l'oxydant, son apport résulte d'une simple dissolution d' O_2 contenu dans l'air au contact du milieu réactionnel aqueux. Cependant, si les conditions d'activation de l'oxygène moléculaire impliquent des catalyses d'oxydation, la

présence d'un réducteur est toutefois requise. En effet, le centre métallique fer(III) doit être réduit à l'état de fer(II) ce qui engendre donc l'emploi d'un partenaire réducteur. Afin de comparer les résultats obtenus avec l'hybride initial, le réducteur retenu reste le même que celui utilisé lors de l'étude préliminaire sur FeL0-NikA : Le dithiothréitol (DTT). Les tests se font à température ambiante, en milieu aqueux tamponné par l'HEPES 10 mM, pH 7, toujours par souci de cohérence avec les résultats préliminaires. Les quantités relatives de chacun des acteurs sont aussi définies d'après les conditions d'analyse de la réactivité de FeL0-NikA.

(1) Études par spectroscopie UV-visible.

Dans un premier temps, le comportement des trois complexes vis-à-vis du couple réducteur/oxygène moléculaire a été observé par spectroscopie UV-visible. Les absorbances obtenues sont mises en comparaison avec celles relevées lors des caractérisations spectroscopiques de FeL1, FeL2, et FeL3. Pour ce faire, chaque complexe est dissous en solution aqueuse dans les mêmes conditions que précédemment (200 μ M). Toutefois, afin de pouvoir observer chaque étape de cette réactivité, les milieux réactionnels sont transférés en boîte à gant, avant d'être exposé à 50 équivalents de DTT après un délai d'équilibration.

Les absorbances qui en résultent sont regroupées dans le Tableau 12.

Tableau 12. Absorbance et longueur d'onde pour l'absorbance maximale en spectroscopie UV-visible des complexes de fer(III) en conditions réductrices suivies d'une exposition à l'air libre en fonction du temps.

	FeL1		FeL2		FeL3	
	Abs	λ max (nm)	Abs	λ max (nm)	Abs	λ max (nm)
Complexe seul	0,130	465	0,145	470	0,335	480
30 min après ajout DDT	0,175	500	0,080	490	0,175	495
1h40 après ajout DDT	0,105	500	0,030	490	0,025	495
30 min après O ₂	0,160	500	0,225	490	0,264	500
1h après O ₂	0,165	500	0,210	490	0,295	500

Une nette décoloration est visible à l'œil nu pour chaque complexe inorganique. Ceci est confirmé par une lecture d'absorbance qui montre une décroissance de l'absorbance maximale au cours du temps jusqu'à sa quasi disparition. Ainsi 30 min après ajout de DTT, on note des absorbances de 0,170, 0,080 et 0,175 pour FeL1, FeL2 et FeL3, respectivement, puis de 0,105, 0,030 et 0,025, respectivement, à 1 heure et 40 min après ajout du réducteur. Tout comme observé sur FeL0–NikA, cette décroissance d'absorbance marque le passage des complexes de l'état de fer(III) à l'état de fer(II). On note toutefois une réduction plus difficile de FeL1 accompagnée pour certains d'un changement important de longueur d'onde. Par la suite, Les solutions de complexes sont alors sorties de la boîte à gants afin d'être exposées à l'air atmosphérique. Un suivi est alors effectué par de nouvelles lectures d'absorbance à 30 minutes et 1h. Chaque milieu réactionnel se recoloré rapidement en fonction du temps. Chacun des trois complexes montre un profil d'absorbance similaire aux spectres obtenus avant réduction. On note ainsi la réapparition de la bande d'absorbance correspondant à une transition de transfert de charge $\pi\pi\text{-d}\sigma^*$ phénolate–métal. Celle-ci atteint une longueur d'onde maximum de 500 (FeL1), 490

(FeL2) et 500 nm (FeL3) après exposition à l'air. Cependant, il est intéressant de noter un déplacement bathochrome de l'absorbance en accord avec la littérature. En effet, cela a déjà été décrit dans le cas de FeL0 et FeHBED (HBED = Acide *N,N'*-bis(2-hydroxybenzyl)-éthylènediamine-*N,N'*-diacétique).⁷⁹ De ce fait, il existe un $\Delta\lambda$ de 35 nm dans le cas de FeL1, de 20 nm pour FeL2 et pour FeL3. Ceci peut s'expliquer par une légère modification de la structure électronique des complexes après exposition à l'oxygène moléculaire, suggérant une possible modification du ligand ou la présence d'un autre ligand. Il est à noter que l'ajout de DTT en excès dans le milieu entraîne une variation d'énergie de la LMCT avant sa disparition. Cela semble suggérer la présence d'un changement de ligand lorsque le DTT est ajouté. On peut proposer le passage par la coordination d'une molécule d'eau ou d'un hydroxyle, voire la coordination du DTT. Enfin, les maxima d'absorbance des complexes FeLn-red/O₂ par rapport à l'espèce de départ s'avèrent sensiblement plus élevés dans le cas de FeL1 et FeL2 (0,130 contre 0,165 et 0,145 contre 0,210, respectivement) tandis que FeL3 se démarque en présentant un maximum d'absorbance plus faible après réduction puis exposition à l'oxygène moléculaire.

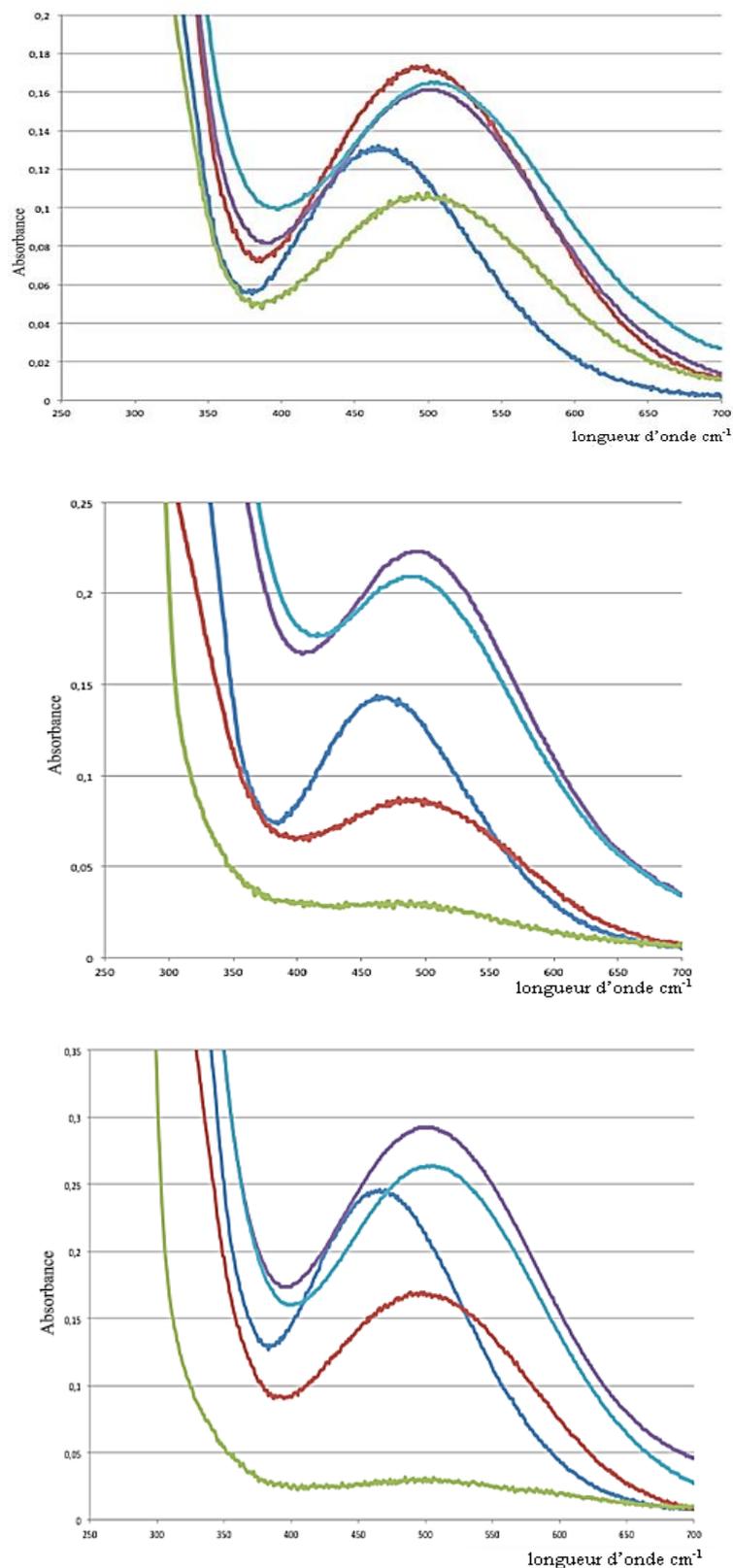


Figure 82. Spectres UV-visible obtenus à partir des complexes **FeL1** (gauche), **FeL2** (centre) et **FeL3** (gauche) soumis à une réduction par 50 éq. de DTT en boîte à gants et réoxydation à l'air. Complexes en solution 200 μ M dans le tampon Tris.HCl 40 mM, pH 7,5. Cyan : complexe initial, rouge : 30 min après ajout de DTT, vert : 1 h après ajout de DTT, violet : après 30 min de réoxydation à l'air, bleu clair : après 1 h de réoxydation à l'air.

Les données spectroscopiques en UV-visible indiquent clairement deux états différents des complexes au cours du temps. Ainsi, en présence de DTT, le fer semble subir une réduction en fer(II), avant d'adopter un nouvel état après exposition à l'air libre. Ces résultats suggèrent que la modification du ligand **L0** en **L1**, **L2** et **L3** (bien que **L1** ralentisse la phase de réduction) ne compromet pas la capacité d'activation de l'oxygène moléculaire dont il disposait à l'origine. Toutefois, cela nécessite de plus amples études afin de comprendre les modifications que subissent notamment chacun des ligands **L1**, **L2**, **L3**.

(2) Études par spectrométrie de masse

En complément de l'étude par spectroscopie UV-visible et afin de mieux comprendre les changements subit par les complexes, une étude similaire a été réalisée, cette fois-ci par spectrométrie de masse ESI en mode négatif. Ainsi 20 éq. de DTT sont ajoutés à une solution aqueuse (5,02 μM , 2mL, pH 8) de chacun de ces complexes. Le milieu réactionnel est ensuite laissé au contact de l'air libre pendant 3 heures puis analysé par spectrométrie de masse.

Ainsi, concernant le complexe **FeL1**, le spectre présente un premier pic avec une valeur de $m/z = 365$ qui est attribué à l'ion $[\text{Fe}^{\text{III}} + (\text{L1-3H}) + \text{OH}]^-$ correspondant au complexe de fer déprotonné au niveau du phénol et des deux fonctions carboxyliques avec un ligand hydroxyle. Ce dernier provient de l'équilibration du pH par une solution de soude. On note toutefois la présence d'un second pic à $m/z = 381$ d'une valeur +16 supérieure au pic précédent. Cette espèce résulte donc d'une oxydation du complexe inorganique au niveau du ligand. Une troisième espèce est visible pour une valeur de $m/z = 397$ qui correspond au complexe inorganique oxydé deux fois au niveau du ligand.

Le spectre obtenu à partir du complexe inorganique **FeL2** présente un premier pic d'une valeur de $m/z = 468$ $[\text{Fe}^{\text{III}} + (\text{L2-3H}) + \text{OH}]^-$. Cette fois, on note la présence

de nombreux autres pics d'une valeur de $m/z = 484$, $m/z = 549$, $m/z = 518$, $m/z = 534$, etc... résultant de multioxydations subies par le ligand du complexe inorganique. La fragmentation du pic $m/z = 484$ montre notamment la formation d'un catéchol. Enfin, Le dernier complexe, **FeL3**, présente un premier pic $m/z = 486$, accompagné, lui aussi, par de nombreux autres pics : $m/z = 468$, $m/z = 468$, $m/z = 502$, $m/z = 518$, $m/z = 533$ etc... . Là encore, le pic $m/z = 518$ montre notamment la formation d'un catéchol.

L'ensemble des résultats obtenus lors des tests de réactivité des trois complexes inorganiques en présence du couple DTT/O₂ démontre leur aptitude à activer l'oxygène moléculaire. D'autre part, la suroxydation des ligands suggère que chaque nouvelle espèce **FeL_{ox}** formée conserve la propriété d'activation d'oxygène moléculaire au cours du temps contrairement au (précurseur) **FeL0**.

D) Préparation des hybrides et caractérisation

La préparation des Hybrides **FeLn-NikA** est similaire au protocole décrit pour la formation des hybrides Ru-NikA. Ainsi, la protéine NikA en solution dans le tampon tris.HCl (40mM pH 7,4) est incubée en présence de 5 équivalents de complexes de fer solubilisés dans du DMSO. Cette incubation est effectuée le temps d'une nuit en chambre froide. Une centrifugation est ensuite réalisée pour éliminer les résidus solides, puis l'excédent de complexe de fer en solution est éliminé par une dialyse à l'aide d'une membrane poreuse. L'échantillon est ensuite concentré sur centricon. Enfin, la quantité de complexe de fer est dosée suivant un protocole proche du dosage de Fish, puis la protéine NikA est dosée au rose Bengale. Le résultat des dosages permet ainsi de calculer le taux d'occupation de la protéine par les complexes **FeLn**. Les taux sont répertoriés dans le Tableau 13.

Les trois hybrides présentent en moyenne un taux d'occupation de 1/1 entre la protéine et le complexe. Ces données nous assurent ainsi de l'ancrage d'un complexe par protéine bien qu'une dialyse ait été effectuée.

l) Constante de dissociation

Les constantes de dissociation ont été mesurées par spectroscopie de fluorescence selon le même mode opératoire que celui décrit pour les hybrides à base de ruthénium. Ainsi, plusieurs échantillons contenant la protéine NikA, à concentration fixe, et le complexe inorganique, à différentes concentrations croissantes, sont placés tour à tour sous une longueur d'onde d'excitation de 280 nm. La fluorescence est mesurée à son absorbance maximale pour une longueur d'onde de 340 nm. La fluorescence est ensuite reportée en fonction de la concentration en complexe de fer. Une première observation met en évidence une décroissance de la fluorescence liée à la croissance de la concentration en fer. Après ajustement de la courbe obtenue en fonction de l'équation de Hill, on obtient alors un K_d de l'ordre du micromolaire pour chacun des trois hybrides, soit $28,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$ pour FeL1-NikA, $32 \pm 8 \mu\text{M}$ pour FeL2-NikA et $14 \pm 2 \mu\text{M}$ pour FeL3-NikA. Ainsi, la modification du ligand L0 en L1, L2 ou L3 ne semble pas altérer de façon significative l'affinité du complexe de fer(III) pour la protéine NikA.

Tableau 13. Caractérisation des hybrides.

	FeL1-NikA	FeL2-NikA	FeL3-NikA	FeL0-NikA
Rapport NikA/Fer	1/0,8	1/1	1/1	1/1
K_d	$28,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$	$32 \pm 8 \mu\text{M}$	$14 \pm 2 \mu\text{M}$	$0,64 \pm 0,2$

II) Caractérisation des Hybrides par spectroscopie UV-visible

De la même façon que pour les complexes libres, les trois hybrides nouvellement formés ont été caractérisés par spectroscopie UV-visible à partir d'une solution de concentration 200 μM .

Les spectres d'absorptions de FeL1-NikA, FeL2-NikA et FeL3-NikA sont présentés en Figure 83. Les trois hybrides présentent un profil d'absorption dans l'UV-visible similaire à ceux observés à partir de leur sous-unité inorganique libre. Ainsi, on retrouve une large bande d'absorbance dans le visible autour de 500 nm, correspondant à une transition de transfert de charge $p\pi-d\sigma^*$ phénolate-métal. Le maximum d'absorbance est atteint pour une longueur d'onde de 495 nm dans le cas de FeL1-NikA ($\epsilon = 13250 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), de 495 nm pour FeL2-NikA ($\epsilon = 8250 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et de 490 nm concernant FeL3-NikA ($\epsilon = 17000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). La sensible différence observée en comparaison avec le complexe libre peut s'expliquer par l'effet de la 2nd sphère de coordination sur le complexe. Toutefois, ces données restent proches et suggèrent que l'ancrage du complexe de coordination dans la protéine NikA ne semble pas provoquer de modification majeure de sa structure électronique.

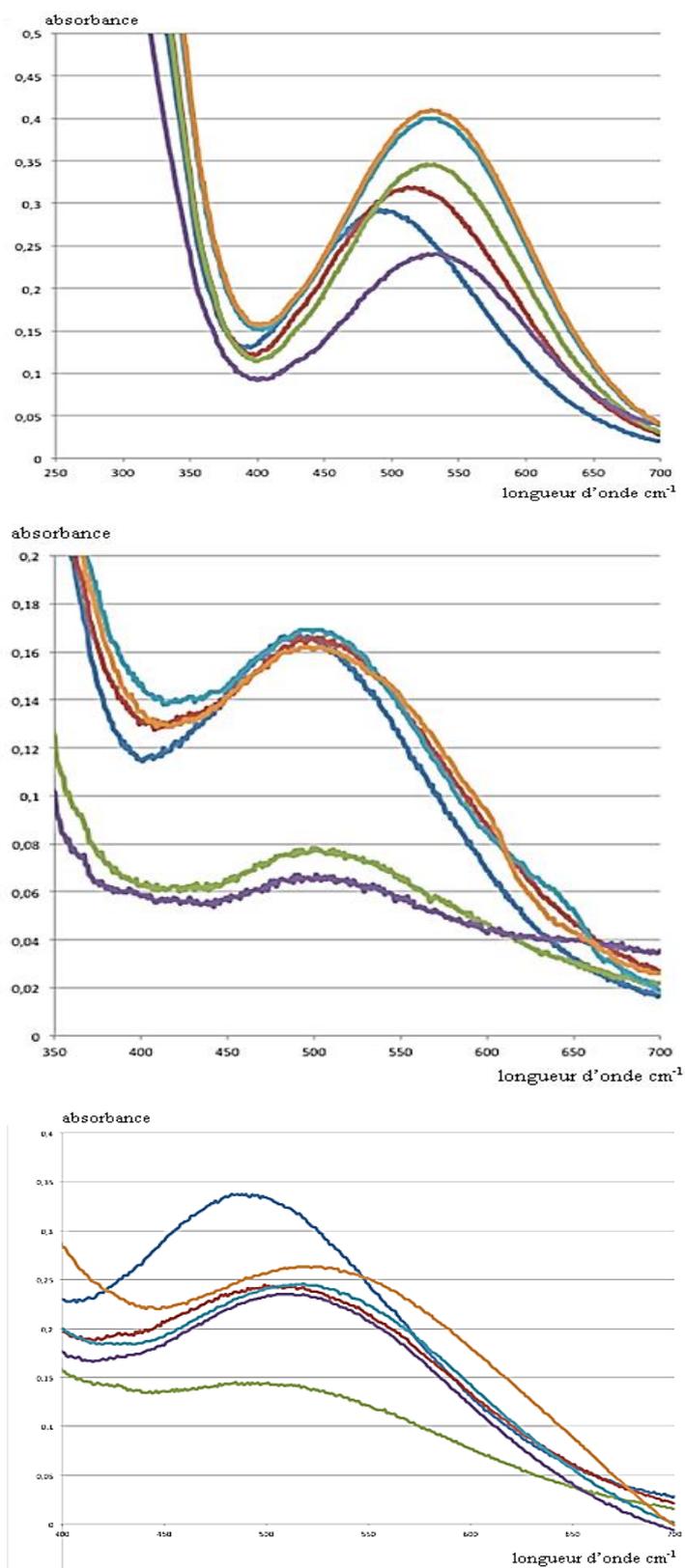


Figure 83. Spectres UV-visible obtenus à partir des hybrides FeL1-Nika (haut), FeL2-Nika (centre) et FeL3-Nika (bas) soumis à une réduction par 50 éq. de DTT en boîte à gants et réoxydation à l'air. Complexes en solution 200 μ M dans le tampon Tris.HCl 40 mM, pH 7,5. Cyan : complexe initial, rouge : 30 min après ajout de DTT, vert : 1 h après ajout de DTT, violet : 2h après ajout de DTT, bleu clair : après 30 min de réoxydation à l'air, orange : après 1 h de réoxydation à l'air.

Le suivi de l'activation réductrice de l'oxygène par les trois hybrides s'apparente à celui des complexes libres. On retrouve une lente réduction de FeL1-NikA par rapport aux deux autres hybrides ainsi que l'effet bathochrome de la LMCT. De nouveau, il n'est pas possible de conclure sur la nature des modifications à l'échelle moléculaire.

III) Caractérisation des hybrides par cristallographie aux rayons X.

Les trois hybrides FeLn-NikA ont été cristallisés afin d'observer par diffraction des rayons X la géométrie structurale ainsi que le mode d'ancrage du complexe inorganique au sein de la protéine hôte. La cristallisation de chacun de ces hybrides a été réalisée suivant la méthode de trempage. En effet, la protéine NikA incubée avec 2 équivalents de Fe(III)-EDTA a, dans un premier temps, été cristallisée par la technique de diffusion de vapeur en gouttes suspendues. Après quelques jours, des cristaux transparents et orthorhombiques de FeEDTA-NikA ont été obtenus. Dans un second temps, les cristaux ont été trempés dans une solution concentrée en complexe de fer souhaité ce qui entraîne une coloration immédiate des cristaux en rouge pourpre.

Les cristaux d'hybrides FeLn-NikA ont par la suite été testés à l'ESRF sur la ligne BM30-A. Les résultats sont présentés sur la Figure 84. Tous les cristaux appartiennent au groupe d'espace $P212121$ (orthorhombique) et montrent une résolution comprise entre 1.8 et 2.2 Å. Une première observation permet de confirmer la substitution du FeEDTA par le complexe de fer d'intérêt (FeL1, FeL2 ou FeL3) dans le site de fixation, c.à.d. à l'interface des deux domaines de la protéine. De même, tout comme NikA-FeL0, les trois hybrides montrent un atome de fer avec un même polyèdre de coordination octaédrique. La première sphère de coordination est alors constituée par deux atomes d'azotes du motif éthylènediamine, de trois atomes d'oxygène dont deux provenant des groupements carboxylates et le dernier du phénolate et enfin d'une molécule d'eau, ou d'une molécule non identifiable dans la

carte de densité électronique. Ainsi, les deux atomes d'azote, le phénolate et la molécule d'eau constituent le plan équatorial. Les deux carboxylates viennent prendre place en position apicale.

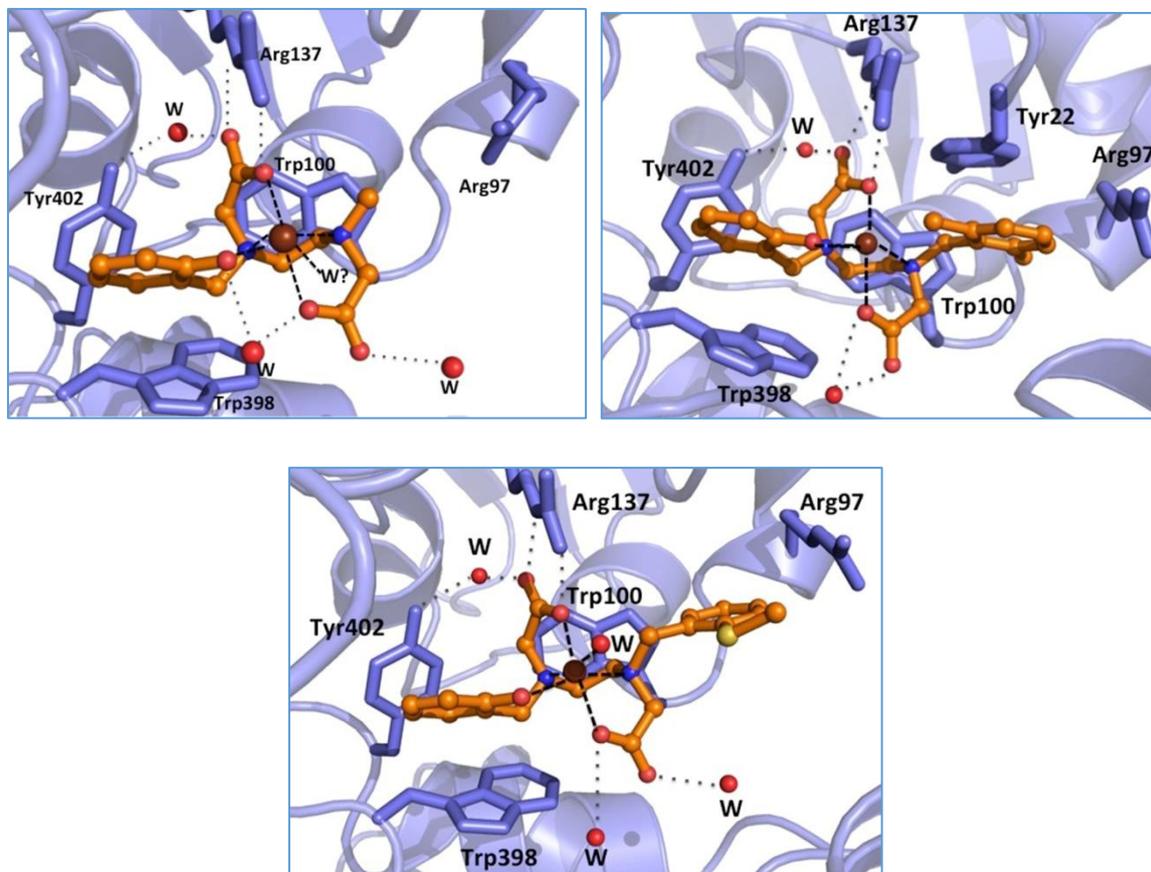


Figure 84. Structures cristallographiques des hybrides a) FeL1-NikA, b) FeL2-NikA et c) FeL3-NikA montrant l'ancrage et la configuration des complexe de Fe(III) au sein de la poche de NikA.

De la même façon que pour FeL0-NikA, le complexe inorganique de fer est stabilisé par des interactions supramoléculaires. Premièrement, de façon identique aux précédents hybrides NikA, on observe un pont salin entre un carboxylate du ligand et le résidu Arg137. Deuxièmement, on note des interactions de type π -stacking qui interviennent entre le cycle aromatique du phénolate et le résidu Trp398. S'ajoute à cela, une interaction entre un des deux bras carboxylate et le résidu Tyr402 par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. Disposé de cette façon dans la poche protéique de NikA, le bras modifié par rapport au complexe FeL0 prend systématiquement place à proximité du résidu Arg97 tel l'image miroir du bras phénolate par rapport

à l'atome de fer. Il est important de noter que les différentes modifications du ligand par rapport à **L0**, telles que la substitution des positions ortho du bras benzyle par deux groupements méthyles ou par un groupement thiométhyléther ne semble pas apporter de contrainte au passage d'un substrat en position labile (ce qui était déjà le cas pour **FeL0**). On ne note aucune différence par rapport à **FeL0**.

E) Réactivité des hybrides **FeLn-NikA**

I) Réactivité des hybrides **FeLn-NikA** en solution aqueuse en présence du couple O_2 / DTT sans substrat exogène

(1) Études par spectroscopie UV-visible.

Après avoir caractérisé les trois nouveaux hybrides, il fallait alors étudier leur réactivité pour valider les modifications de **FeL0-NikA**. Afin de comparer le comportement des hybrides à ceux de leurs sous-unités libres en présence du couple réducteur/oxygène moléculaire, de nouvelles études ont été suivies par spectroscopie UV-visible. Pour ce faire, chaque complexe est dissous en solution aqueuse dans les mêmes conditions que précédemment (200 μ M). De même, les milieux réactionnels sont transférés en boîte à gants, avant d'être exposé à 50 équivalents de DTT. Les absorbances mesurées sont alors comparées à celles relevées lors de l'analyse des complexes libres **FeL1**, **FeL2**, et **FeL3**. Les données sont regroupées dans le Tableau 14 et les spectres correspondants sur la Figure 83.

De la même façon que pour les complexes libres, les hybrides subissent une décoloration quasi complète en fonction du temps. Même si 30 min après ajout de DTT, l'absorbance ne varie que peu (elle augmente même dans le cas de **FeL1-NikA**), 2 h après l'ajout, on observe une nette décroissance jusqu'à des absorbance de 0,220, 0,070 et 0,145 pour **FeL1-NikA**, **FeL2-NikA** et **FeL3-NikA**, respectivement. Malgré l'ancrage du complexe dans la protéine **NikA**, il peut toujours être réduit de fer(III) à fer(II). Les trois solutions de **FeLn-NikA** sont ensuite réexposées à l'air libre,

bénéficiant ainsi de la présence de l'oxygène moléculaire atmosphérique. L'absorbance est alors lue après 30 min puis 1 heure après la sortie de la boîte à gants. Chaque milieu réactionnel se recolorie rapidement en fonction du temps.

Tableau 14. Absorbance et longueur d'onde pour l'absorbance maximale en spectroscopie UV-visible des hybrides catalytiques en conditions réductrices suivi d'une exposition à l'air libre en fonction du temps.

	FeL1-NikA		FeL2-NikA		FeL3-NikA	
	Abs	λ max (nm)	Abs	λ max (nm)	Abs	λ max (nm)
Hybride	0,265	495	0,165	495	0,340	490
30 min après ajout DDT	0,320	510	0,165	500	-	-
1h00 après ajout DDT	0,350	525	0,080	500	0,245	505
2h00 après ajout DDT	0,220	535	0,070	500	0,145	505
30 min après O ₂	0,400	535	0,170	500	0,235	515
1h après O ₂	0,405	535	0,160	500	0,245	520

Ainsi l'exposition à l'air des trois complexes permet d'observer à nouveau une transition de transfert de charge $p\pi-d\sigma^*$ phénolate-métal par la réapparition d'une bande d'absorption qui atteint une absorbance maximum de 0,400 (FeL1-NikA), 0,170 (FeL2-NikA) et 0,235 nm (FeL3-NikA) à 30 min après exposition à l'air qui varie peu au cours du temps car des valeurs très similaires sont observées 1 heure après la sortie des échantillons de la boîte à gants. Dans cette étude, le comportement des hybrides ne fait pas exception à celui des sous-unités inorganiques libres. Ainsi, un déplacement bathochrome de l'absorbance se fait aussi observer avec un décalage de 40 nm dans le cas de FeL1-NikA, de 5 nm seulement dans le cas de FeL2-NikA et de 30 nm pour FeL3-NikA. Les trois hybrides semblent à leur tour subir une modification de leur structure électronique au niveau de l'atome de fer, une première fois en présence de DTT, puis une fois encore après contact avec l'oxygène

moléculaire. La spectroscopie d'absorbance en UV-visible couplée à la spectrométrie de masse ayant mis en évidence une activation de l'oxygène moléculaire par les complexes inorganiques libres, on peut par analogie en tirer la même conclusion concernant les hybrides catalytiques FeLn-NikA. Ainsi, les nouveaux Hybrides FeLn-NikA conservent la capacité d'activer O₂. Toutefois, à l'image de FeL0-NikA, il devient alors important de vérifier que cette réactivité ne provoque pas de modifications du squelette organique du ligand, responsables à terme d'une inhibition de la réactivité du métal par saturation de la première sphère de coordination. Le suivi de l'activation réductrice de l'oxygène par les trois hybrides s'apparente à celui des complexes libres. On retrouve une lente réduction de FeL1-NikA par rapport aux deux autres hybrides ainsi que l'effet bathochrome de la LMCT. De nouveau, il n'est pas possible de conclure sur la nature des modifications à l'échelle moléculaire

(2) Études *in crystallo* de la réactivité des hybrides FeL3-NikA

Cette étude n'a été effectuée que sur l'hybride FeL3-NikA. Les cristaux d'hybride FeL3-NikA sont transférés en boîte à gants, c.à.d. en milieu anaérobie, avant d'être incubés en présence d'un excès de DTT (20 à 50 mM) durant une heure. Cet ajout de réducteur a pour effet de décolorer complètement les cristaux qui peuvent alors être cryoconservés pour être analysés sans avoir été en contact avec de l'oxygène. Afin d'étudier la réoxydation à l'air, les cristaux sont réexposés à l'air. Les cristaux se recolorent rapidement et sont congelés après 2h d'exposition. Les données structurales de ces cristaux sont ensuite collectées. Après traitement des données, les structures présentées Figure 85 ont pu être obtenues.

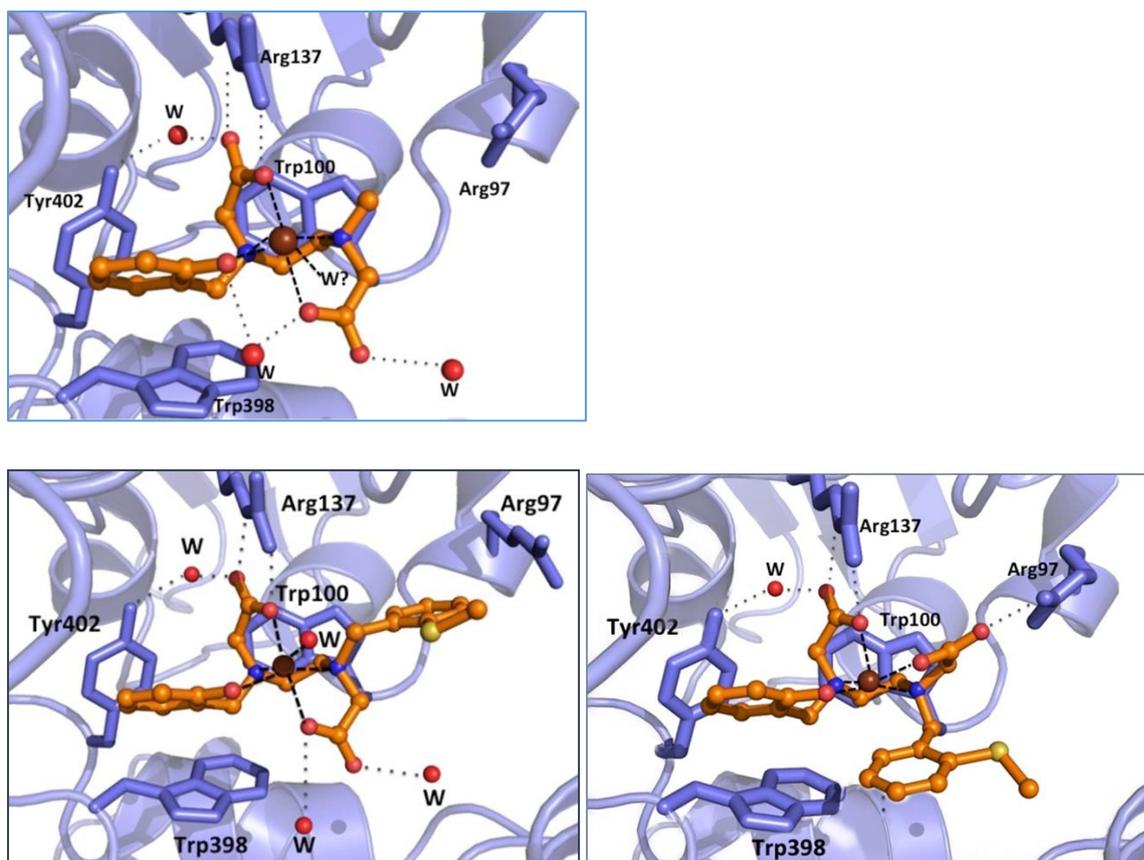


Figure 85. Structures cristallographiques de l'hybride originel $FeL3$ -NikA puis sous la forme réduite $FeL3_{red}$ -NikA et enfin sous sa forme réoxydée $FeL3_{red/O_2}$ -NikA montrant les différentes configurations du complexe de Fe(III) au sein de la poche de NikA en fonction des conditions catalytiques.

(a) Réduction des hybrides $FeL3$ -NikA en boîte à gants

À première observation, la première sphère de coordination de chacun des hybrides endure un changement important quand les cristaux sont exposés à l'agent réducteur. L'apparition d'une charge négative par réduction du Fe(III) en Fe(II) (indiquée par la décoloration des cristaux) entraîne, par un effet de compensation, le déplacement du bras carboxylate positionné à l'origine en position apicale inférieure pour former un pont salin avec l'Arg97. Ce faisant, le bras modifié (thiométhylbenzyle) prend systématiquement place en position apicale et se situe alors à proximité du Trp398. On note toutefois que le bras bascule de façon à ce que la fonction thioéther ne soit pas orientée vers le métal mais vers l'extérieur de la première sphère de coordination.

L'interaction entre le second bras carboxylate et l'Arg137 est conservé après réduction des cristaux d'hybride FeL3-NikA au DTT.

La réorganisation du ligand, notamment au niveau de la 1^{ère} sphère de coordination confirme ainsi la réduction des complexes Fe^{III}L3 à l'état de Fe^{II}. De plus, le taux d'occupation du Fe et du ligand après réduction est de l'ordre de 100% indiquant que la réduction des hybrides n'implique pas de dissociation permanente entre le fer et son ligand, pas plus qu'entre le complexe inorganique et sa protéine hôte.

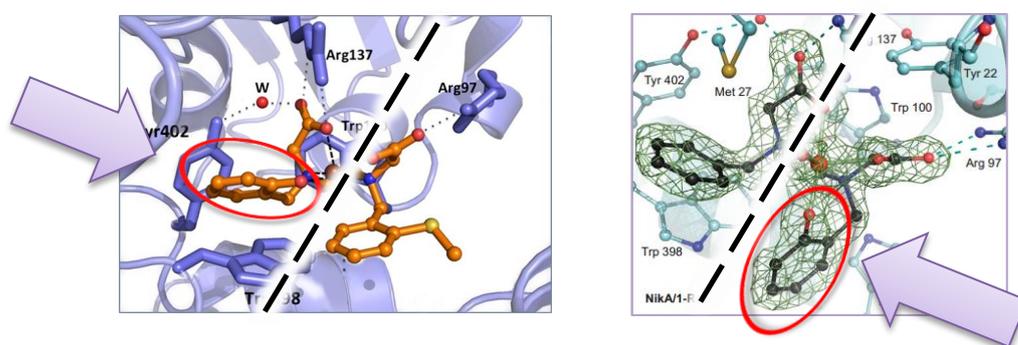


Figure 86. Différence de comportement entre les hybrides nouvellement conçu (représentés ici par FeL3-NikA) et FeL0-NikA au moment de leur réduction.

À l'image des études en solution, l'ensemble de ces structures démontre la possibilité de réduire le fer au sein de ces nouveaux hybrides. De plus, tout comme FeL0-NikA, FeL3-NikA subit une importante réorganisation de la 1^{ère} sphère de coordination. Toutefois, il est intéressant de remarquer que celle-ci diffère sensiblement de celle observée sur la structure FeL0_{red}-NikA. En effet, lors de la réduction, c'était le phénolate qui prenait place en position apicale et non le bras benzyle (bras modifié). Cette différence de comportement est montrée en Figure 86 par une flèche violette. Ceci pourrait s'expliquer par un équilibre entre des contraintes stériques générées par les modifications réalisées sur FeL0.

(b) Réoxydation des hybrides FeL_n-NikA par exposition à l'air libre

La structure cristallographique de l'hybride $\text{FeL3}_{\text{red/O}_2}$ -NikA après exposition au couple DTT/ O_2 est similaire à la structure originale FeLn -NikA avant réduction. Dans un premier temps, le deuxième bras carboxylate n'interagit plus avec l'Arg97. Cette rupture du pont salin permet à ce bras carboxylate et au bras thiométhylbenzyle de retrouver leur place d'origine. En effet, on constate le retour du carboxylate dans la première sphère de coordination en position apicale, comme décrit sur la structure initiale avant réduction. Toutefois, une différence existe par rapport aux structures FeLn -NikA initiales puisqu'on observe une densité électronique supplémentaire au niveau de la position ortho du phénolate (Figure 84). Celle-ci est représentée à l'aide d'une « grille » verte sur les structures de la Figure 87 et correspond à la présence d'un second groupement hydroxyle. Toutefois, aucune sulfoxydation ou sulfonation n'est observée probablement en raison de la position du groupement thioéther sur la structure FeL3_{red} -NikA. Ces données peuvent ainsi expliquer les résultats obtenus en suivi par spectrométrie UV-visible en solution aqueuse. En effet, le déplacement bathochrome qui était observé résulte probablement de la présence d'un groupement hydroxyle donneur supplémentaire sur les ligands.

En conclusion, le retour à l'origine dans l'organisation de la première sphère de coordination met en évidence le retour de l'état de fer(III). De plus, l'hydroxylation aromatique du ligand ne peut être provoquée que par le métal et montre sans ambiguïté la réactivité de l'hybride face à l'oxygène moléculaire. Les modifications de FeL0 -NikA n'entraînent donc aucune contrainte quant à l'activation de l'oxygène moléculaire. Les hybrides FeLn -NikA sont donc de nouvelles oxygénases artificielles. Toutefois, leur capacité à activer l'oxygène moléculaire s'accompagne cette fois encore de la formation d'un catéchol. Cependant, la situation a évolué puisque, la formation du catéchol ne résulte plus de deux hydroxylations aromatiques successives du bras benzyle comme décrite sur FeL0 -NikA. Elle provient en effet d'une seule et

unique hydroxylation au niveau du cycle aromatique du phénolate, le bras benzyle modifié n'a pas été touché par la réactivité. La différence observée entre le réarrangement de la structure $\text{FeL}_{\text{n}}_{\text{red}}\text{-NikA}$ et celui de la structure $\text{FeL0}_{\text{red}}\text{-NikA}$ en est la raison.

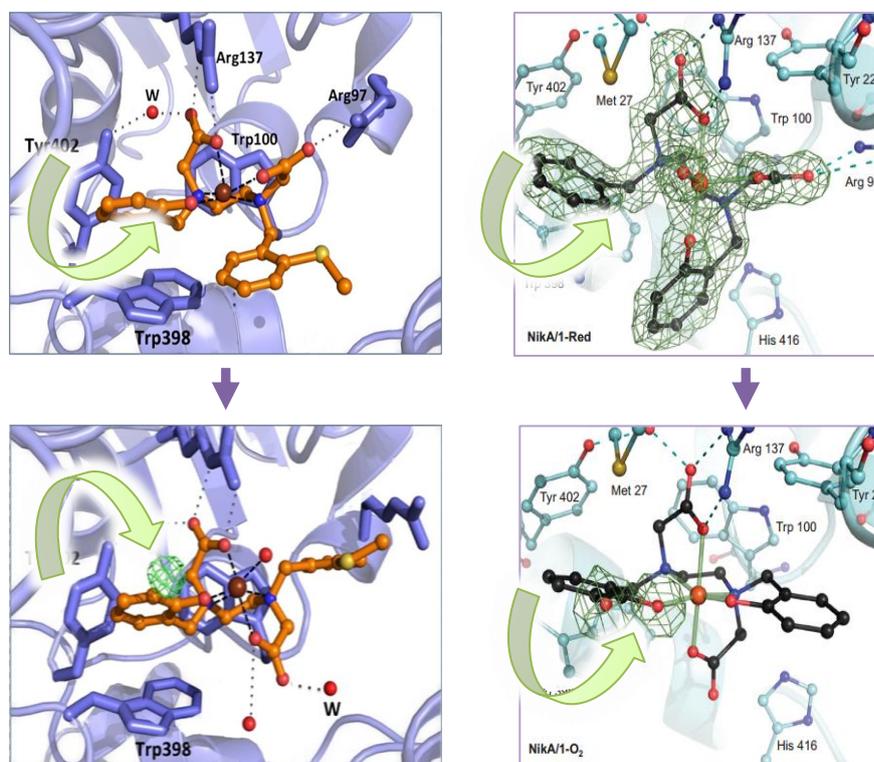


Figure 87. Différence de comportement entre les hybrides nouvellement conçu (représenté par FeL3-NikA (à gauche)) et FeL0-NikA (à droite) au moment de l'oxydation du ligand qui semble toujours se faire sur le bras en position équatoriale sur la structure réduite.

En effet, la position de l'hydroxylation aromatique du ligand semble suivre une règle précise. En comparant le suivi cristallographique sur $\text{FeL}_{\text{n}}\text{-NikA}$ et FeL0-NikA (Figure 87), il semble que l'hydroxylation aromatique soit toujours dirigée sur le bras situé en position équatoriale, à proximité du Trp398 et de la Tyr402. Les raisons de cette régiosélectivité restent encore inconnues mais nous pouvons suggérer que l'espèce peroxy formée (comme observée dans le cas de FeL0) est orientée sur le carbone en ortho du phénol. La coupure homolytique ou hétérolytique du peroxy libérant à priori un radical $\text{OH}\cdot$ dans la zone de l'atome de carbone en alpha du phénol rend alors la réaction très sélective.

Le suivi cristallographique de la réduction des hybrides en milieu anaérobie et de leur exposition à l'air atmosphérique met en évidence leur capacité à activer O_2 mais aussi à transférer l'oxygène activé à un substrat (en considérant le ligand comme un substrat intramoléculaire). Cette aptitude est très encourageante et laisse une porte ouverte à l'emploi d'un substrat exogène dans le cas d'une étude de catalyse d'oxydation. Enfin, une étude cristallographique sur un hybride FeL4-NikA, comportant une fonction thioéther en ortho du phénol symétrique, pourrait potentiellement permettre d'observer une sulfoxydation intramoléculaire.

II) Réactivité de FeLn-NikA en solution aqueuse en présence du couple O_2 / DTT et en présence d'un substrat exogène

Après avoir démontré la pertinence du développement des hybrides FeLn-NikA, la suite de ce projet concerne alors l'étude de leur capacité de transfert d'oxygène activé à un substrat exogène. Pour ce faire, le styrène ainsi que le thioanisole sont les deux premiers substrats utilisés dans ces tests catalytiques car ce sont les substrats de référence dans la littérature en matière d'oxydation d'alcènes et de thioéthers.

Les conditions standards, de catalyse d'oxydation par activation de l'oxygène moléculaire, ont été définies, notamment en ce qui concerne les équivalences de chacun des acteurs mis en jeu. Toutefois, la quantité de l'oxydant qui provient uniquement d'une dissolution de l'air dans le milieu réactionnel ne peut être contrôlée. En conséquent, la catalyse d'oxydation est alors contrôlée par la quantité de réducteur. Pour les mêmes raisons qu'avancées précédemment, les ratios retenus sont les suivants: catalyseur / substrat / réducteur à 1 / 500 / 600 éq. pour une concentration finale en catalyseur de $3,73 \cdot 10^{-5}$ moles.L⁻¹.

Par conséquent, les catalyses d'oxydation qui suivent sont réalisées en présence de 2,5 nmoles de FeLn-NikA (37 μ M), $1,25 \cdot 10^{-6}$ moles de substrat dans 67 μ L de tampon HEPES 10 mM, pH 7. L'apport en substrat organique dans un milieu aqueux

nécessite l'utilisation d'un co-solvant organique miscible à l'eau. Le substrat est donc préalablement solubilisé à 10% dans de l'acétonitrile. Concernant l'oxydant, les réactions sont réalisées dans des Eppendorf fermés d'un volume de 1,5 mL, ce qui permet de disposer d'un très large excès de molécule d'O₂ dont la solubilisation est facilitée par une agitation permanente. L'ajout du DTT ($1,5 \cdot 10^{-6}$ moles) marque le début du test catalytique qui est réalisé sur un temps de 4 heures à température ambiante. Ce délai passé, l'ajout de benzophénone, en tant que référence interne, est réalisé juste avant l'extraction du milieu réactionnel par de l'acétate d'éthyle. Les quantifications en produits et en réactifs sont faites par étalonnage interne *via* une analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Pour finir, afin de pouvoir attribuer avec rigueur la réactivité observée aux nouveaux hybrides, chaque catalyse d'oxydation entreprise s'accompagne de contrôles permettant, entre autre, de comparer leur réactivité à celle de chaque constituant libre. Ainsi, le contrôle **E** est réalisé en absence de catalyseur et de réducteur, le contrôle **D** permet de mettre en évidence une quelconque réactivité incombant à l'oxydant seul, tandis que les contrôles **C** et **B** permettent d'observer concrètement l'implication de chaque partenaire libre de l'hybride FeLn-NikA dans la réactivité. Ces contrôles sont répertoriés ci-dessous.

- Substrat / réducteur / hybride (**A**)
- Substrat / réducteur / complexe FeLn (**B**)
- Substrat / réducteur / Apo-NikA (**C**)
- Substrat / réducteur (**D**)
- Substrat (**E**).

(1) Catalyse d'oxydation d'alcène

Les trois hybrides sont testés séparément en catalyse d'oxydation du styrène selon les conditions de catalyse décrites précédemment. Les résultats des catalyses d'oxydation et des contrôles sont regroupés dans le Tableau 15. Les résultats sont présentés sous le terme générique FeLn-NikA car tous les hybrides conduisent à des résultats comparables. Les chromatogrammes collectés pour FeLn-NikA présentent le même profil et ne montrent aucune trace de l'époxyde du styrène. Toutefois, les analyses CPG révèlent un unique produit d'oxydation en la présence de benzaldéhyde avec un très faible rendement de 2%. La production de ce dernier résulte d'une coupure oxydante du substrat et traduit donc l'aptitude des hybrides FeLn-NikA à accomplir un transfert d'oxygène activé sur le styrène pendant 10 cycles catalytiques. Ce résultat montre donc le succès de nos choix de modification de L0 puisque avec FeL0-NikA il n'avait pas été possible de transférer un atome d'oxygène à un substrat autre que le ligand du complexe lui-même. Le phénylacétaldéhyde n'est jamais observé.

Tableau 15. Résultats de la catalyse d'oxydation du styrène avec la protéine NikA, les complexe FeLn et les hybrides FeLn-NikA dans le tampon HEPES (10 mM, pH 7) avec du DTT comme réducteur. Condition : cat/substrat/red = 1/500/600 éq.. Temps réactionnel = 4 heures.

entrée	Catalyse ou contrôle	Conversion du styrène	Rendement en benzaldéhyde	Nombre de cycles catalytiques
1	Catalyse (A) FeLn-NikA	100%	3%	15
2	Contrôle (B) FeLn	100%	2%	10
3	Contrôle (C)	100%	0%	/
4	Contrôle (D)	100%	0%	/
5	Contrôle (E)	80%	0%	/

Ces résultats sont alors confrontés aux contrôles (B), (C), (D) et (E). Dans un premier temps, le contrôle (E) (entrée 5) souligne le caractère volatile du styrène

(tension de vapeur de 0,7) avec l'évaporation de 80% du substrat après 4 heures en solution. Ceci contraint donc le rendement maximum théorique de la catalyse à 20% et peut expliquer en partie la faible quantité de produit d'oxydation obtenue. Le contrôle (D) (entrée 4), réalisé sans catalyseur mais en présence de DTT, ne montre aucune trace de produit d'oxydation. Ceci confirme que l'oxydation du substrat requiert l'implication d'un catalyseur pour activer O₂. Les contrôles (B) et (C) (entrées 2 et 3), où les hybrides FeLn-NikA sont substitués par leur complexe inorganique FeLn libre, ou par la protéine NikA apo, permettent de voir l'implication de chaque partenaire de l'hybride dans la formation du benzaldéhyde. Aucune réactivité n'est observée dans le cas de l'utilisation de la protéine apo tandis qu'on note la formation de benzaldéhyde avec 2% de rendement (soit 10 cycles catalytiques) en présence des complexes inorganiques libres FeLn. La protéine apo, qui se montre totalement inerte dans ces conditions, n'est donc aucunement responsable de la réactivité observée sur les 10 cycles catalytiques de la catalyse (A). Les complexes de fer font, quant à eux, preuve des mêmes capacités de transfert d'oxygène que les hybrides correspondant, avec une efficacité équivalente. A ce stade, on peut donc se poser la question de savoir si c'est l'hybride qui produit une réaction ou du complexe libéré en solution. Toutefois, les tests d'oxydation réalisés en absence de substrat ont montré que les complexes subissent plus de modification que lorsqu'ils sont dans la protéine. Il est donc important de se demander si la protéine n'endosserait pas un rôle de protection des complexes de fer qui permettrait aux hybrides d'être actifs plus longtemps.

Enfin, aucune différence de réactivité n'est visible entre les trois nouveaux hybrides qui tous montrent une réactivité équivalente avec la même efficacité.

(2) Catalyse d'oxydation de thioéthers aromatiques

Afin de tester la réactivité des hybrides en sulfoxydation par activation d'O₂, les mêmes expériences ont été répétées en substituant le styrène par du thioanisole. La

catalyse (A), réalisée par les trois nouveaux hybrides FeLn-NikA en présence du couple DTT/O₂, ne montre aucune réactivité. En effet, les chromatogrammes obtenus ne montrent aucun produit résultant de sulfoxydation ou de sulfonation. De plus, aucune hydroxylation aromatique ou coupure oxydante n'a été observée. La catalyse (B), réalisée par les complexes inorganiques FeLn ne montre pas non plus de signe de réactivité. Dans ces conditions-là, les trois hybrides nouvellement conçus n'ont donc aucune activité de sulfoxydation par transfert d'oxygène activé.

Cette observation va de pair avec l'étude cristallographique réalisée sur FeL3-NikA où aucune oxydation du thioéther n'a pu être constatée.

(3) Conclusion

Bien que les rendements soient faibles, ces premiers résultats sont encourageants puisqu'ils témoignent d'une oxydation du styrène par activation d'oxygène moléculaire dirigée par une métalloenzyme artificielle. Ceci en ferait, à ce jour, les premières oxygénases artificielles de ce genre. De plus, la coupure oxydante subie par la double liaison du substrat traduit la formation d'une espèce active fortement oxydante. Toutefois, ces résultats sont à nuancer puisque la quantité mesurée en benzaldéhyde est similaire lors de la réaction catalysée par FeLn et FeLn-NikA. De surcroît, le faible rendement en benzaldéhyde ne s'accorde pas avec la consommation en DTT observée. Puisque tout l'oxygène activé n'est pas transféré au substrat d'intérêt, il se peut que le DTT interagisse préférentiellement dans un processus secondaire. Une des possibilités envisagées concerne la réduction directe de l'espèce catalytiquement active. Cette hypothèse soulève donc la question d'un recours à d'autres réducteurs.

Ainsi quelques points restent à définir.

- 7- L'activité catalytique des trois hybrides FeLn-NikA, mais aussi des complexes seuls, en oxydation d'alcènes par activation d'oxygène moléculaire a pu être démontrée validant par la même occasion leur conception. Toutefois, l'efficacité de cette catalyse reste timide, ce qui nécessite une amélioration afin d'accéder à des nombres de cycles catalytiques nettement plus élevés. La substitution du styrène par un substrat moins volatile sera la première piste à explorer.
- 8- La nature du réducteur constitue une seconde piste dans la stratégie d'optimisation de ce système catalytique. À cet effet, différents réducteurs seront testés à la place du DTT. De plus, un nouveau moyen de délivrer les électrons au système catalytique est aussi envisagé par le développement d'un système photocatalytique.
- 9- En outre, il devient important de valoriser et donc de différencier les hybrides par rapport au complexe inorganique libre pour entériner leur conception. Les premiers tests de réactivité réalisés en absence de substrat suggèrent que la protéine confère une protection au complexe inorganique. De nouvelles études seront axées sur le recyclage des catalyseurs.

III) Optimisation du système catalytique

(1) Catalyse d'oxydation du cinnamate de méthyle

Afin d'optimiser l'efficacité catalytique de nos hybrides, le styrène est remplacé par un autre alcène aromatique moins volatile, le cinnamate de méthyle. De plus, de par sa structure, l'idée est de chercher à observer le sous-produit complémentaire du benzaldéhyde en cas de coupure oxydante de sa double liaison. De la même façon qu'avec le styrène, les trois hybrides FeLn-NikA, ainsi que les complexes inorganiques

libres (catalyse (A) et contrôle (B)), se montrent réactifs en catalyse d'oxydation du cinnamate de méthyle par activation d'oxygène moléculaire. En effet, les chromatogrammes montrent la formation de benzaldéhyde avec un rendement de 2% soit 10 cycles catalytiques pour la catalyse (A) et 3% soit 15 TON pour le contrôle (B). Les trois hybrides atteignent le même rendement cette fois encore, il en est de même pour les trois complexes inorganiques correspondant. Ce résultat se révèle donc être identique à ceux de la catalyse d'oxydation du styrène précédemment décrite. Le changement de substrat ne permet donc pas d'optimiser le système par un gain d'efficacité. De plus, concernant l'exploration de sous-produit, aucun sous-produit complémentaire au benzaldéhyde résultant d'une coupure oxydante de la double liaison n'a été détecté lors de cette catalyse. Cependant, le taux de conversion du substrat de 2 à 3% est cette fois corrélé avec le rendement en benzaldéhyde. De même, les contrôles (C) à (E) possèdent cette fois un taux de conversion nul. Cette observation suggère alors que la faible efficacité ne peut être imputée à un phénomène d'évaporation du substrat. C'est donc du côté de la réduction du fer que la suite des études doit être orientée. Notamment sur la façon dont les électrons seront délivrés jusqu'au fer.

Tableau 16. Résultats de la catalyse d'oxydation du cinnamate de méthyle avec la protéine NikA, les complexes FeLn et les hybrides FeLn-NikA dans le tampon HEPES (10 mM, pH 7) avec du DTT comme réducteur. Condition : cat/substrat/red = 1/500/600 éq.. Temps réactionnel = 4 heures.

entrée	Catalyse ou contrôle	Conversion du cinnamate de méthyle	Rendement en benzaldéhyde
1	Catalyse (A) FeLn-NikA	2%	3%
2	Contrôle (B) FeLn	3%	3%
3	Contrôle (C)	0%	/
4	Contrôle (D)	0%	/
5	Contrôle (E)	0%	/

(2) Activation de l'oxygène moléculaire en présence d'autres réducteurs : TCEP et ascorbate de sodium

Deux nouveaux réducteurs ont alors été testés dans des conditions catalytiques identiques (Catalyseur / Substrat / Réducteur : 1 / 500 / 600 éq.). Le premier choix se porte sur la tricarboxyéthylphosphine (TCEP) ($E^\circ = -0,29$ V alors que $E^\circ\text{DTT} = -0,33$ V) qui présente l'avantage d'être plus stable que le DTT à l'air libre bien qu'il conduise à une nette baisse du pH de la solution tamponnée (pH à environ 2,5).¹²¹ Un second choix se porte sur l'ascorbate de sodium couramment utilisé en biochimie comme agent de réduction ($E^\circ = 0,08$ V) (Figure 88).¹²²

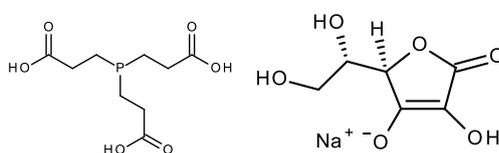


Figure 88. Tricarboxyéthylphosphine (TCEP) (droite) et ascorbate de sodium (gauche) utilisés en substitution du DTT en tant qu'agent réducteur.

Deux séries d'études catalytiques sont alors réalisées. Chaque série de catalyse comprend la catalyse standard (A) et ses contrôles (B) à (D). La première série est réalisée en remplaçant le DTT par la TCEP (Tableau 17, gauche), tandis que la seconde est faite en présence d'ascorbate de sodium (Tableau 17, droite).

Tableau 17. Résultats de la catalyse d'oxydation du cinnamate de méthyle avec la protéine NikA, le complexe FeL2 et l'hybride FeL2-NikA dans le tampon HEPES (10 mM, pH 7) en présence de TCEP (gauche) ou d'ascorbate de sodium (droite) comme réducteur. Condition : cat/substrat/red = 1/500/600 éq.. Temps réactionnel = 4 heures.

Catalyseur	Conversion (%)	Rendement (%)
Catalyse (A) FeL2-NikA	4	0
Catalyse (B) FeL2	9	0
Contrôle (C) Apo-NikA	0	0
Contrôle (D) /	0	0

Catalyseur	conversion (%)	Rendement (%)
Catalyse (A) FeL2-NikA	20	0
Catalyse (B) FeL2	22	0,5
Contrôle (C) Apo-NikA	0	0
Contrôle (D) /	0	0

Dans chacune des deux séries, les contrôles (C) et (D) correspondant au remplacement du catalyseur par la protéine apo-NikA ou à l'absence totale de catalyseur, respectivement, présentent un taux de conversion nul. Les catalyses (A) et contrôles (B) réalisés en présence des hybrides catalytiques ou des complexes inorganiques correspondantes ne montrent plus la formation de benzaldéhyde ni d'aucun autre produit d'oxydation. Ces résultats divergent alors de ceux observés en présence de DTT. Toutefois, une partie du substrat semble avoir été convertie. En effet, en présence de TCEP, on note 4% de conversion du cinnamate de méthyle lors de chaque catalyse (A) (FeL₂-NikA) et 9% dans le cas des complexes libres. Dans le cas où l'agent réducteur est l'ascorbate de sodium, cette conversion s'avère plus importante avec 20% dans le cas des catalyses (A) et 22% dans le cas des contrôles (B).

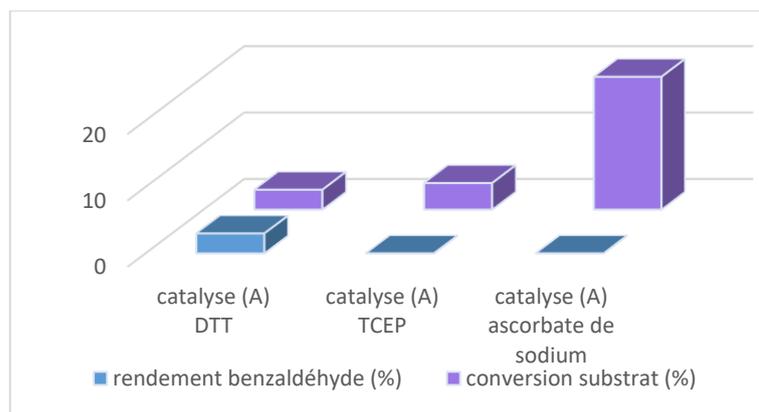


Figure 89. Comparaison des conversions en fonction de la nature du réducteur lors de l'oxydation du cinnamate de méthyle par l'hybride FeL2-NikA.

Il est intéressant de noter que si ce taux de conversion reste du même ordre dans le cas de la TCEP que lors de l'usage du DTT (4% contre 3%), l'ascorbate de sodium permet quant à lui d'atteindre 20% de consommation du substrat (Figure 89). Les contrôles (C) à (D) n'ayant pas montré de réactivité avec un substrat, la conversion du substrat dans les catalyses (A) et (B) ne peut provenir que d'une réactivité dirigée par les catalyseurs correspondants. De plus, cette réactivité semble plus importante dans le cas de la catalyse en présence d'ascorbate de sodium. D'autant plus que cette fois encore, la conversion du substrat par les hybrides FeLn-NikA est du même ordre de grandeur que celle réalisée par leurs sous-unités inorganiques libres.

Bien que les taux de conversion aient été augmentés, le remplacement du DTT par de la TCEP ou de l'ascorbate de sodium n'a cependant donné aucun produit d'oxydation. La question se pose alors quant au devenir du substrat. De plus, les taux de conversion restent très faibles. Pour s'affranchir d'une possible désactivation de l'espèce catalytiquement active par le réducteur, la délivrance des électrons petit à petit a été privilégiée.

(3) Réduction du catalyseur par un système photocatalytique

La suite de ces travaux concerne le développement d'une méthode permettant de contrôler les équivalents réducteurs dans le milieu. C'est à ces fins, qu'un procédé de réduction photocatalytique adapté a été mis au point.

Ce procédé comporte deux étapes majeures : l'activation du photosensibilisateur (ou transfert des e-) et la catalyse en elle-même. Dans ce projet, la seconde étape concerne l'activation d'O₂ par FeLn-NikA. Elle a été décrite tout au long de ce chapitre. La première étape de ce procédé se décompose comme ceci :

Activation du photosensibilisateur : ce dernier est activé par une irradiation lumineuse d'une longueur d'onde spécifique. Le photosensibilisateur peut alors agir en tant qu'agent réducteur en transférant un électron vers le fer(III).

Dans le cadre de ce projet, le photosensibilisateur choisi est le dichlorure de ruthénium trisbipyridine (Figure 90). En effet, ce dernier est non seulement soluble en solution aqueuse, mais absorbe aussi dans le domaine du visible sur une large gamme de longueurs d'onde. De plus, son état excité présente une durée de vie suffisamment longue pour permettre au transfert d'électrons de se faire.

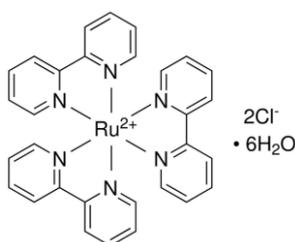


Figure 90. Le complexe $[Ru^{II}(bpy)_3]^{2+}$ utilisé en tant que photosensibilisateur.

Ainsi, après irradiation par de la lumière bleue, le ruthénium, alors à l'état excité, peut délivrer des électrons au complexe de fer(III) FeLn le réduisant à l'état de fer(II). Cette étape génère alors un ruthénium $[Ru^{III}(bpy)_3]^{3+}$. Un cycle normal de catalyse d'oxydation par activation d'oxygène moléculaire peut alors commencer. Au terme du cycle de catalyse d'oxydation par activation d'oxygène moléculaire, le

complexe inorganique de fer retrouve son état d'oxydation (III). Ainsi, pour que cela soit cyclique, le complexe inorganique de fer(III) doit une nouvelle fois être réduit. À ces fins, le photosensibilisateur doit alors être régénéré en $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$. Ceci se fait par l'action de la triéthanolamine (TEOA), un donneur d'électrons sacrificiel. Ce processus est résumé dans la Figure 91.

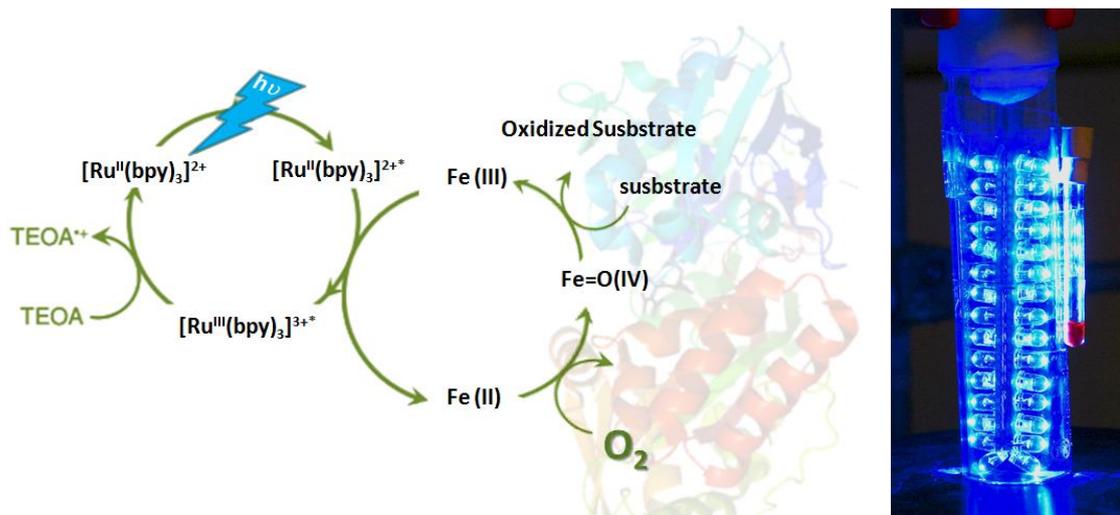


Figure 91. Cycle du procédé photocatalytique impliquant FeLn-NikA en tant que catalyseur, $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$ en tant que photo sensibilisateur, la triéthanolamine en tant que donneur d'électrons sacrificiel, le tout activé par irradiation sous rayon lumineux bleus.

Au cours des expériences préliminaires, nous avons pu voir que les trois hybrides FeLn-NikA conduisaient à des résultats expérimentaux équivalents. Les premiers tests catalytiques ont donc été réalisés uniquement sur l'un des catalyseurs hybrides, FeL2-NikA.

La viabilité du système, notamment la possibilité de générer des cycles $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ a, dans un premier temps, été vérifiée par spectroscopie UV-visible. En effet, les premiers tests de réactivité ont montré la possibilité de suivre la réduction des hybrides de fer(III) FeLn en fer(II) par une décroissance de l'absorbance en fonction du temps. Le catalyseur FeL2 a alors été dilué dans de l'eau puis mis en présence de 20 équivalents de $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$ accompagné de 50 équivalents de TEOA, mais sans substrat exogène. Le milieu réactionnel a ensuite été placé en conditions anaérobies

en boîte à gants et exposé à la lumière bleue après équilibration. Un suivi par spectroscopie UV-visible par balayage est alors effectué en fonction du temps. La superposition de l'ensemble des spectres est représentée en Figure 92. Le spectre d'absorbance avant irradiation par lumière bleue montre une bande d'absorbance à 450 nm suivie d'un épaulement bien visible à 550 nm. La première bande est attribuée au $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$, et l'épaulement correspond au complexe de fer(III). Si le suivi en fonction du temps montre une légère diminution de l'absorbance à 450 nm, c'est à 550 nm que la décroissance de l'absorbance est la plus intense. En effet, l'épaulement significatif de la présence du complexe de fer(III) décroît jusqu'à sa quasi disparition. Ce phénomène est identique à celui observé lors de la réduction du catalyseur par le DTT. Ainsi, cette observation met en avant le passage de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_2$ à l'état de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{L}_2$. De même, cette réduction est responsable de la décroissance de l'absorbance à 450 nm. Ainsi, ces résultats montrent la possibilité de réduire le complexe inorganique par activation d'un photosensibilisateur par la lumière bleue.

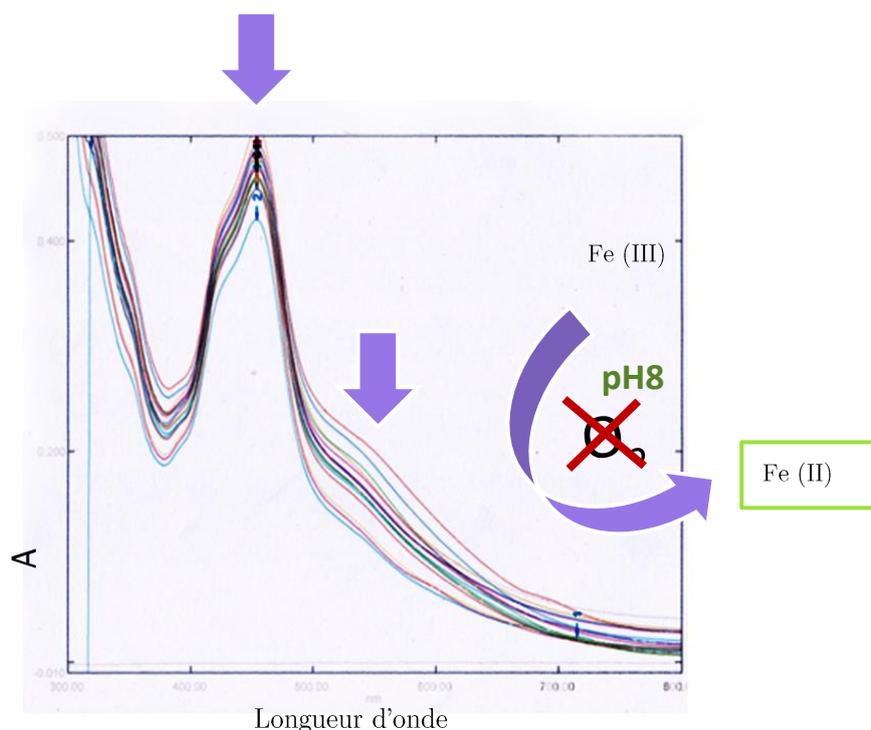


Figure 92. Superposition des spectres UV-visible acquis en conditions photocatalytiques en milieu anaérobie.

Le système photocatalytique développé est alors testé en catalyse d'oxydation du cinnamate de méthyle. Les conditions standards de photocatalyse du cinnamate de méthyle par FeL2-NikA sont définies comme telles :

- Le ratio catalyseur substrat reste identique aux précédentes catalyses soit 1/500 éq. catalyseur/substrat. S'ajoute à cela 200 équivalents de photosensibilisateur, l'excès restant, dans un premier temps élevé, afin de tester le système et de 500 équivalents de triéthanolamine.
- Le photosensibilisateur utilisé absorbe dans les gammes de 450 nm, son activation se fait donc sous irradiation d'une lumière bleue de entre 450 et 500 nm.
- Les réactions de photocatalyse sont alors réalisées dans un tube en verre transparent de 5 mm de diamètre exposé aux rayons de lumière bleue. Le milieu réactionnel contient 2,5 nmoles de FeL2-NikA (37 μ M) et $1,25 \cdot 10^{-6}$ moles de substrat (18,5 mM) dans 67 μ L de tampon HEPES 10 mM, pH 7, auxquels sont ajoutés 10 μ L d'une solution contenant le ruthénium (7,4 mM) et la triéthanolamine (18,5 mM) (Schéma 5). La totalité des réactions se fait à température ambiante, sur une durée de 24 heures. La mise sous irradiation de lumière bleue marque le début de la photocatalyse. Enfin, après le temps imparti, le milieu réactionnel est extrait par de l'acétate d'éthyle, contenant de la benzophénone en tant que référence interne, afin de l'analyser par CPG.

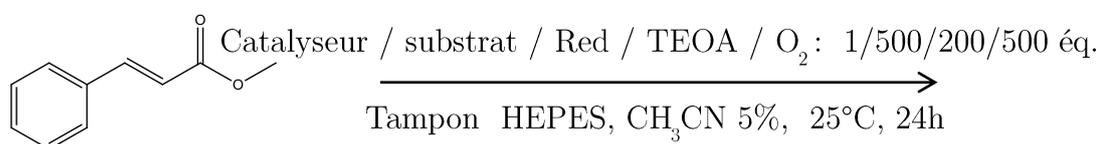


Schéma 5.

Les premiers tests de réactivité sous photocatalyse sont réalisés sur le cinnamate de méthyle. A nouveaux, des contrôles sont réalisés, mais le développement de nouvelles conditions de catalyse nécessite d'ajuster les contrôles comme suivant :

- Substrat / FeL2-NikA / $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$ / TEOA / LED_{bleu} (F)
- Substrat / FeL2 / $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$ / TEOA / LED_{bleu} (G)
- Substrat / FeL2-NikA / LED_{bleu} (H)
- Substrat / FeL2 / LED_{bleu} (I)
- Substrat / $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$ / TEOA / LED_{bleu} (J)
- Substrat / LED_{bleu} (K)
- Substrat / FeL2-NikA / $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$ / TEOA / LED_{blanche} (L)
- Substrat / FeL2-NikA / $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$ / TEOA / obscurité (M).

Les résultats sont présentés Figure 93 et Tableau 18.

Tableau 18. Résultats de la catalyse d'oxydation du cinamate de méthyle dans le tampon HEPES (10 mM, pH 7). Conditions : cata / substrat / $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$ / TEOA = 1/500/200/600 éq.. Temps réactionnel = 24 heures.

Entrée	Catalyse	conversion substrat (%)	rendement en benzaldéhyde (%)
1	catalyse (F)	65	0
2	contrôle (G)	90	0
3	contrôle (H)	0	0
4	contrôle (I)	0	0
5	contrôle (J)	0	0
6	contrôle (K)	0	0
7	contrôle (L)	0	0
8	contrôle (M)	0	0
9	catalyse (N)	100	/
10	catalyse (O)	100	/

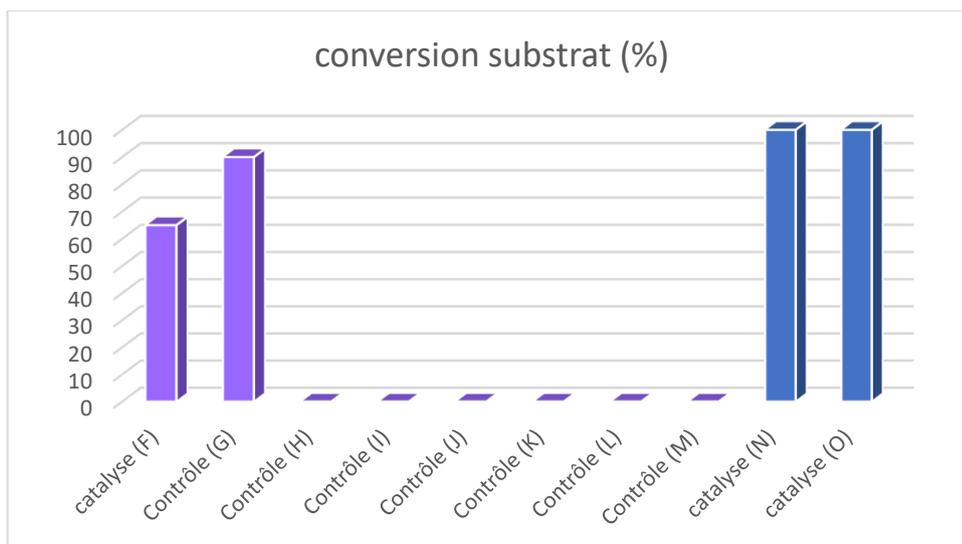


Figure 93. Représentation graphique des résultats obtenus en catalyse d'oxydation du cinnamate de méthyle par FeL2-NikA avec l'oxygène moléculaire comme oxydant sous photocatalyse.

L'entrée 1 du Tableau 18 correspondant à la photocatalyse (F), c'est-à-dire, qu'elle représente la réaction de catalyse standard en présence de FeL2-NikA. Elle montre une forte conversion de 65% du cinnamate de méthyle. Ce taux de conversion est largement supérieur à celui observé lors des catalyses d'oxydation de ce même substrat en présence des agents réducteurs DTT ou ascorbate de sodium. On note aussi une légère isomérisation du cinnamate de méthyle restant. Avec 90% de taux de conversion, c'est le même profil de chromatogramme qui est observé pour le contrôle (G) correspondant à la même réaction mais catalysée uniquement par la sous-unité inorganique libre (FeL2). Toutefois, pour ces deux réactions ((F) et (G)), aucune trace de benzaldéhyde, pas plus que d'aucun autre produit d'oxydation, n'est visible sur les chromatogrammes. Pour vérifier que la conversion observée n'était pas liée à une dégradation du substrat sous irradiation, le contrôle (K) a été réalisé. Le substrat, exposé à la lumière bleue, est entièrement récupéré, puisque les 500 équivalents (0% de taux de conversion) sont toujours présents après 24 heures. Il est donc nécessaire de comprendre ce qu'il advient du substrat. À ces fins, des analyses RMN ainsi que des analyses de spectrométrie de masse (ESI-MS en mode positif) ont été entreprises. Les spectres RMM du proton, réalisés après évaporation de la phase

organique d'extraction, ne dévoilent aucune présence de produit d'oxydation simple ou résultant d'une coupure oxydante. Toutefois, le spectre de masse (Figure 94) permet d'observer un pic à $m/z = 89$.

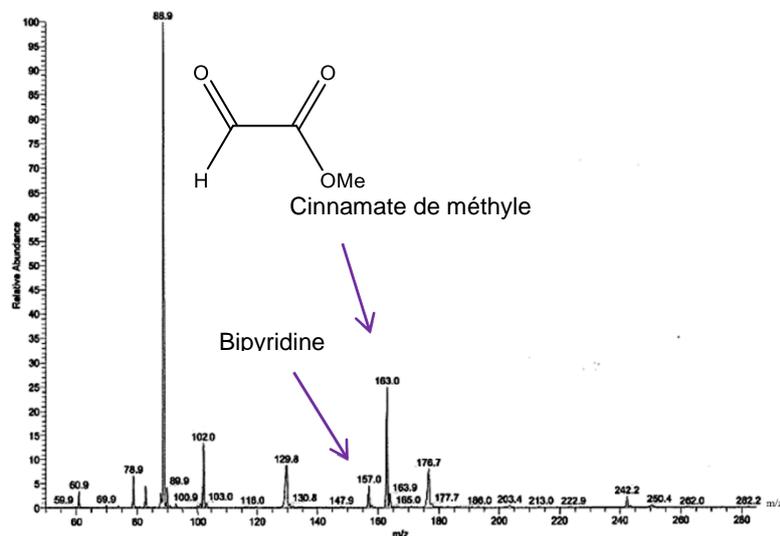


Figure 94. Spectre de masse du glyoxalate de méthyle, produit résultant de la coupure oxydante de la double liaison du cinnamate de méthyle par FeL2-NikA en condition photocatalytique dans des conditions 1/500/200/ 600 éq / catalyseur/substrat/ photosensibilisateur/ donneur d'électron sacrificiel.

Ce pic est attribué au glyoxalate de méthyle qui correspond à la moitié complémentaire du benzaldéhyde dans le cas d'une coupure oxydante de la double liaison du cinnamate de méthyle. Toutefois, aucune trace de benzaldéhyde n'a été observée. La photocatalyse (F), réalisée en présence du trio FeL2.NikA / $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$ / TEOA, montre donc une réactivité d'oxydation certaine. Il devient alors important d'analyser les autres réactions de contrôle réalisées afin de comprendre le rôle de chaque acteur impliqué dans cette photocatalyse.

Concernant le taux de conversion, les contrôles (H), (I) et (J), réalisés en présence des catalyseurs FeL2-NikA ou FeL2 sous irradiation de lumière bleue, mais en absence de photosensibilisateur ou au contraire en présence de photosensibilisateur mais en absence de catalyseur, ne montrent aucune réactivité avec un taux de conversion nul. La seule présence du photosensibilisateur, couplé à la lumière bleue, n'est donc pas suffisante à la réactivité. Le centre métallique de fer(III) de FeL2-NikA ou de FeL2

reste le seul responsable direct de l'activation de l'oxygène moléculaire et de son transfert à un substrat, bien que son couplage à un système photosensibilisateur/donneur d'électrons soit nécessaire. Enfin, avec un taux de conversion du cinnamate de méthyle nul, les entrées 7 et 8 du tableau confirment que l'irradiation du milieu réactionnel est nécessaire à l'activation du photosensibilisateur de même que la longueur d'onde du rayon lumineux est un critère limitant de cette photocatalyse.

A ce stade, on peut conclure que la présence de glyoxalate de méthyle dans le milieu réactionnel implique une activation d'oxygène moléculaire par FeL2-NikA ou FeL2 en conditions photocatalytiques, ainsi que son transfert à un substrat exogène. De plus, avec 65% de taux de conversion du substrat (lors de la catalyse (F)), ce système se révèle plus efficace qu'avec les agents réducteurs précédents qui ne dépassaient pas 20% de conversion. Ces données démontrent que le moyen de délivrer les électrons au catalyseur est un processus limitant l'efficacité de nos catalyseurs et valide par la même occasion le couplage de la catalyse à un photosensibilisateur. Cependant, l'absence de traces de produits d'oxydation ne permet pas de comprendre totalement le devenir du substrat. L'hypothèse émise est alors une complète dégradation de ce dernier.

Afin de mieux comprendre l'absence de benzaldéhyde après 24h de photocatalyse alors que du glyoxalate a pu être observé, les précédents tests catalytiques ont de nouveaux été réalisés en remplaçant, toutefois, le cinnamate de méthyle par du benzaldéhyde (500 éq.) :

- benzaldéhyde / FeL2-NikA / $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$ / TEOA / LED_{bleu} (N),
- benzaldehyde / FeL2 / $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$ / TEOA / LED_{bleu} (O)

Ainsi, après analyses des milieux réactionnels par CPG, les catalyses (N) et (O) présentent un taux de conversion de 100% (Figure 94, Tableau 18). Il est important de noter que ce même taux s'est avéré nul en absence de l'hybride ou de complexe libre. Ainsi, la seule présence du complexe de ruthénium (II), couplé à la triéthanolamine, n'est pas suffisante à la conversion du benzaldéhyde, tout comme dans le cas du cinnamate de méthyle. De ce fait, ces résultats suggèrent une dégradation des produits oxydés en présence du catalyseur (Schéma 6). Une dégradation importante des substrats jusqu'à la formation du gaz CO₂ pourrait être une hypothèse.

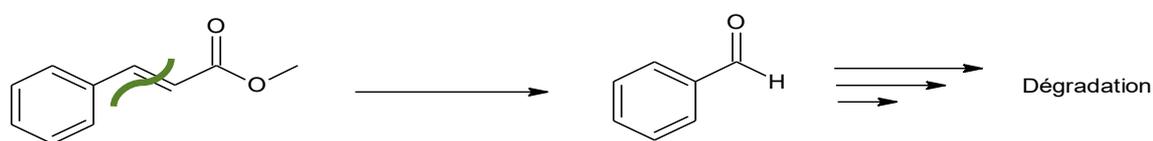


Schéma 6.

Une première piste consiste à réaliser une étude de la composition de la phase gazeuse supérieure des échantillons de photocatalyse en comparaison à la composition de l'air atmosphérique. Ainsi les photocatalyses, réalisées sur le cinnamate de méthyle, le benzaldéhyde ou d'autres substrats comme le *trans*- β -méthylstyrène, ont toutes conduit à une augmentation du taux de CO₂ (Figure 95). Cependant, à ce jour, ces analyses n'ont pas permis de quantifier le gaz généré. En effet, ces conditions photocatalytiques nécessitent un pH basique qui génère une forte solubilisation du CO₂ sous forme de carbonate dans la solution aqueuse. On n'observe donc qu'une partie (environ 5%) de la quantité de CO₂ normalement produite par la dégradation totale de chaque substrat. Cependant, il a été observé une corrélation entre la quantité de CO₂ mesurée et le nombre d'atomes de carbone du substrat, et donc la quantité de CO₂ théoriquement produite.

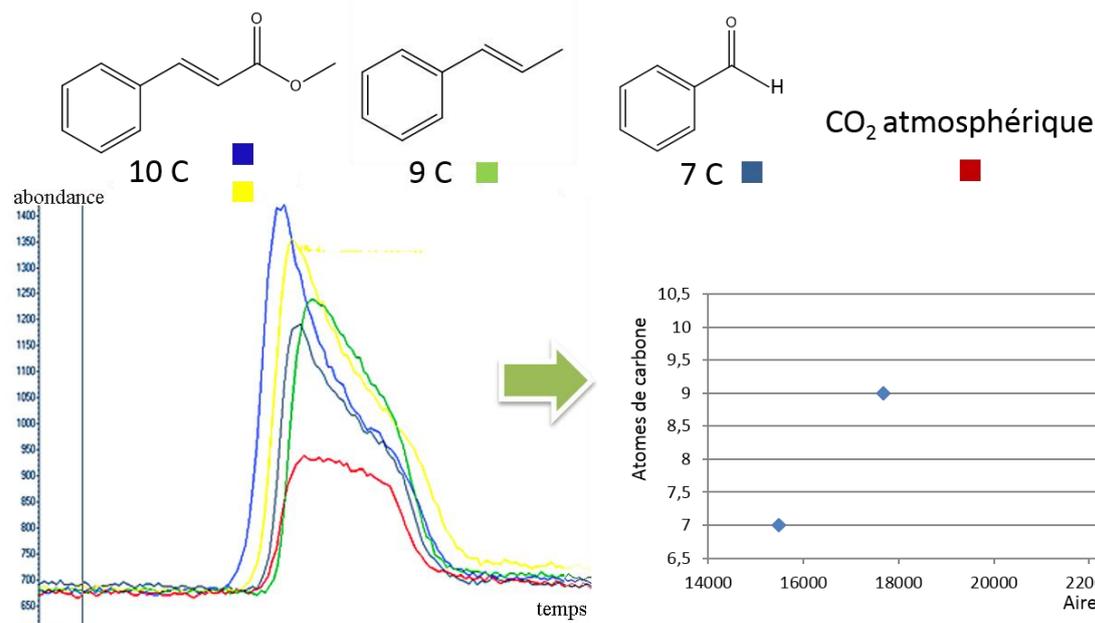


Figure 95. Chromatogrammes obtenus après injection en CPG d'un prélèvement de l'air présent au-dessus de l'échantillon réactionnel pour différents substrats.

Toutefois, ces résultats ne sont pas cohérents avec la quantité de TEAO présente dans le milieu réactionnel, et impliquent un mécanisme qui n'est pas à l'heure actuelle compris. Néanmoins, la dégradation des produits d'oxydation en CO₂ suggère la formation d'une espèce hautement active. Cependant l'intérêt du développement d'un catalyseur hybride par rapport au simple catalyseur inorganique n'est à ce point pas avéré puisque les conversions sont équivalentes que l'on emploie l'hybride ou le complexe seul. Comme la réaction ne conduit pas à des produits d'oxydation chiraux, on ne peut pas se baser sur la différence de stéréosélectivité des deux catalyseurs pour valoriser le choix d'un catalyseur hybride plutôt qu'inorganique. Des expériences concernant la stabilité de FeL₂-NikA par rapport à celle de sa sous-unité inorganique pourraient permettre de différencier le comportement de chacun des deux catalyseurs.

(4) Stabilité des catalyseurs hybrides

Les études précédentes nous ont permis de développer des photocatalyseurs d'oxydation en milieu aqueux et en présence d'oxygène moléculaire. Cependant, il fallait encore discriminer la réactivité des complexes FeL_n seuls de celle des hybrides FeL_n-NikA.

C'est dans cet objectif que des tests de stabilité mettant en jeux, d'une part, la métalloenzyme artificielle, et, d'autre part, le complexe correspondant libre, ont été entrepris. Les tests de stabilité ont été réalisés suivant les conditions standard de photocatalyse soit : catalyseur / cinnamate de méthyle / photo-sensibilisateur / triéthanolamine (TEOA) : 1 / 500 / 200 / 600 équ.. Afin de vérifier l'intégrité et de comprendre le comportement de chaque acteur impliqué dans la stabilité de l'hybride, une nouvelle série de catalyse a été entreprise sur 3 runs catalytiques consécutifs. Un run est alors défini à 24 heures de catalyse standard. Pour ce faire, deux séries de photocatalyses (une première appliquée à FeL2-NikA et une seconde appliquée à FeL2) ont été entreprises. Chaque série comprend 3 échantillons préparés dans des conditions identiques. Le premier échantillon est analysé par CPG après un run. Ce dernier sert de comparaison pour les expériences de stabilité réalisées sur deux et trois runs. Pour les deux autres échantillons, les réactions sont poursuivies sur 24 heures supplémentaires, en bénéficiant chacune d'un ajout de substrat et de TEOA. Au terme du second run, soit après 48 heures de photocatalyse, un nouvel échantillon est traité puis analysé en CPG. Enfin, le troisième échantillon bénéficie d'un nouvel ajout de substrat et de TEOA avant d'être analysé après 72 heures de réactivité.

Précisément, les réactions suivantes sont entreprises :

Témoin sur un run :

- substrat / FeL2-NikA / $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$ / TEOA / LED_{bleu} (A),
- substrat / FeL2 / $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$ / TEOA / LED_{bleu} (B).

Stabilité sur deux runs :

Catalyse (A) ou (B) + ajout à 24 heures de :

- 500 équ. de cinnamate de méthyle et 500 équ. de TEOA, arrêt à 48 heures ((P) pour FeL2-NikA et (P') pour FeL2).

Stabilité sur trois runs :

Catalyse (A) ou (B) + ajout à 24 et à 48 heures de :

- 500 éq. de cinnamate de méthyle et 500 éq. de TEOA, arrêt à 72 heures ((Q) pour FeL2-NikAet (Q') pour FeL2).

L'ensemble de ces expériences sont résumés à l'aide de la Figure 96.

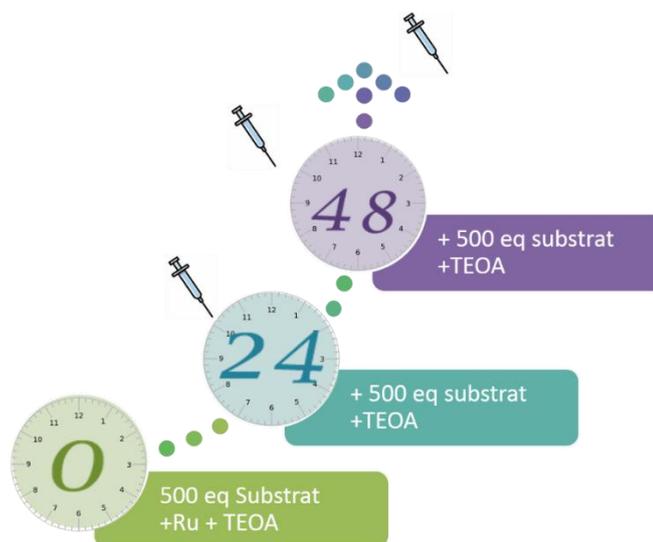


Figure 96. Représentation des expériences de stabilité. Suivi à 24 h, 48 h et 72, de la réactivité de la métalloenzyme artificielle FeL2-NikA et de sa sous-unité inorganique FeL2.

Les résultats sont présentés en nombre de cycles catalytique minimum (comptés sur la base d'un seul cycle par consommation d'une molécule de substrat, c.à.d. sans tenir compte du nombre d'atomes de carbone réellement mis en jeu) calculés à partir des taux de conversion. Les données sont regroupées dans le Tableau 19 sous nombre de cycles catalytique réalisés pour chaque run et comparés à l'aide d'un graphique opposant la série réalisée en présence de FeL2-NikA à celle réalisée en présence de FeL2 libre en termes de cycles catalytiques cumulés (Figure 97).

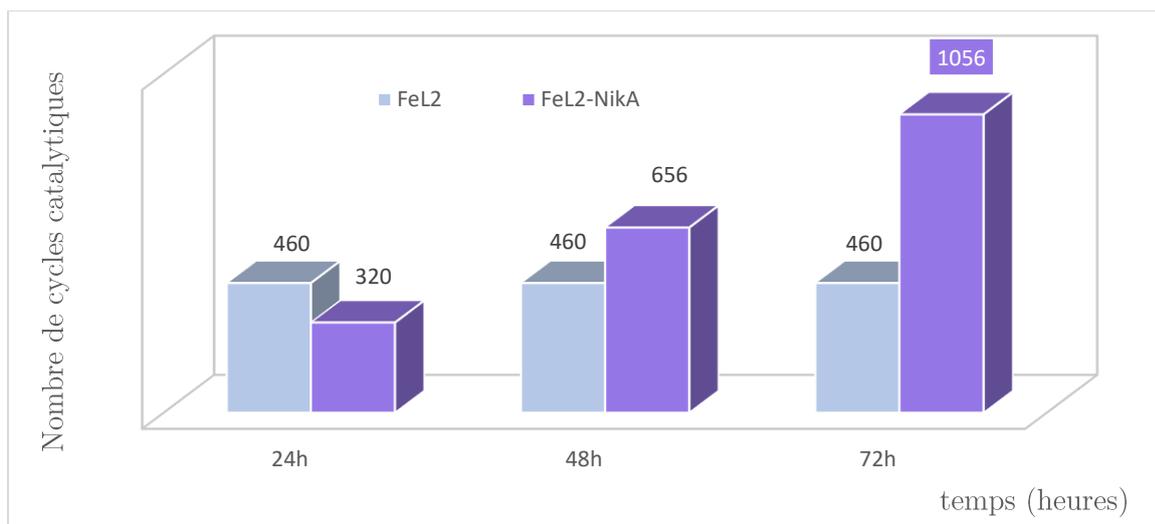


Figure 97. Graphique opposant la série réalisée en présence de FeL2-NikA à celle réalisée en présence de FeL2 libre.

Dans un premier temps, les données correspondant à un seul et unique run pour chacun des catalyseurs montrent des résultats cohérents avec les réactions réalisées précédemment. En effet, la catalyse (A) permet d'atteindre 320 cycles catalytiques (soit 64% de conversion du substrat) contre 460 cycles dans le cas de la catalyse (B) (soit 92%), ce qui montre que sur un run, FeL2 est plus efficace que l'hybride. Cependant, cette tendance s'inverse lors du second run. En effet, la catalyse (P'), en présence de FeL2, ne dépasse pas les 460 cycles catalytiques tandis que la catalyse (P), en présence de FeL2-NikA, permet de cumuler 656 cycles sur deux runs. Ainsi le deuxième run met clairement en évidence une rapide inhibition de l'activité catalytique de FeL2 contrairement à la métalloenzyme qui poursuit son activité. En effet, la réactivité de celle-ci reste stable avec une efficacité très proche lors des deux runs. Enfin, le troisième run continue sur la même lignée que le précédent puisque la catalyse (Q') ne dépasse toujours pas les 460 cycles catalytiques cumulés sur trois runs alors que l'hybride ne cesse d'être performant atteignant cette fois 1056 cycles après 72 heures de réactivité. FeL2-NikA est donc indéniablement plus performant que sa sous-unité inorganique qui montre finalement une rapide inhibition de sa réactivité.

Tableau 19. Nombre de cycles catalytiques réalisés au cours de chaque run.

	Nombre de cycles catalytiques par run		
	1 ^{er} run	2 ^{ème} run	3 ^{ème} run
FeL2	(B) 460	(P') 0	(Q') 0
FeL2-NikA	(A) 320	(P) 336	(Q) 400

Dans ces conditions catalytiques, une importante dégradation du complexe inorganique pourrait expliquer cette différence de stabilité entre les deux systèmes. Les premiers tests catalytiques, exempts de substrats mais réalisé en présence du couple DTT/O₂, corroborent d'ailleurs ce phénomène. En effet, les complexes FeLn subissaient alors de multiples oxydations du ligand alors que des études cristallographiques par diffraction des rayons X ne montrent qu'une unique oxydation du ligand lorsqu'il se situe au sein de la protéine. Ainsi, l'enveloppe protéique de NikA de FeL2-NikA semble préserver l'intégrité du ligand et donc l'activité du catalyseur.

De cette façon, l'hybride se révèle alors nettement plus stable et donc plus performant que le complexe seul.

(5) Apport de la protéine

Ayant démontré la capacité de la protéine à protéger le complexe inorganique de l'hybride, il fallait alors en comprendre le mécanisme ; NikA pouvant être actrice dans le piégeage d'espèces actives, ou assurant tout simplement un espace protégé de par sa cavité protéique. Deux nouvelles protéines ont alors été choisies pour remplacer NikA pour la suite des études photocatalytiques : la sérum albumine humaine (HSA) et le lysozyme de poulet (Figure 98).

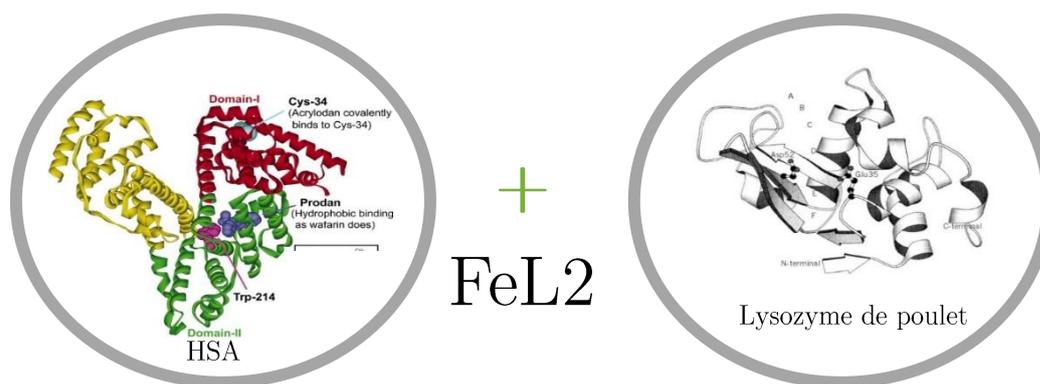


Figure 98. Présentation des protéines choisies pour remplacer *Nika* en tant que copule protéique de l'hybride.

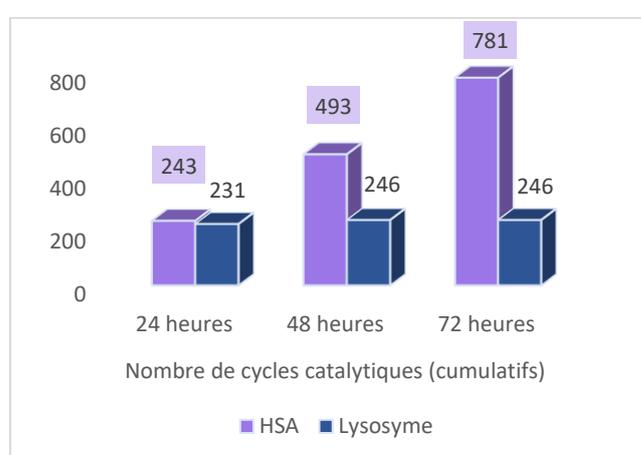


Figure 99. Nombres de cycles catalytiques réalisés en remplaçant *Nika* par d'autres protéines.

La première est une protéine globulaire, contenant trois domaines hélicoïdaux définissant 7 cavités,¹²³ dans laquelle l'équipe a déjà ancré des complexes de manganèse (II).⁸⁸ La seconde est une protéine non globulaire formée d'une seule chaîne de 129 acides aminés. L'expérience de stabilité précédente est reproduite en substituant la protéine *Nika* par l'une et l'autre (Tableau 20, Figure 99).

Tableau 20. Résultats de la catalyse d'oxydation du cinnamate de méthyle avec différentes protéines et le complexe FeL2 dans le tampon HEPES (10 mM, pH 7). Condition : cat/substrat/ruthénium/TEAO = 1/500/200/500 éq. Temps réactionnel = 24 heures.

	Nombre de cycles catalytiques (cumulatifs)		
	24 heures	48 heures	72 heures
FeL2	460	460	460
FeL2 + NikA	320	456	1056
FeL2 + HSA	243	493	781
FeL2 + Lysozyme	231	246	246

Tandis que la réaction du cinnamate de méthyle catalysée par FeL2 en présence de lysozyme conduit à la même tendance que celle observées en présence de FeL2, c.à.d. que le nombre de cycles catalytique n'augmente pas au fil des runs, en présence de HSA, l'activité catalytique reste constante au cours du temps comme en présence de NikA. Ainsi, la catalyse réalisée en présence de lysozyme présente à son tour une rapide inhibition de son activité tandis que celle de la catalyse en présence de la protéine HSA reste stable dans le temps. On peut donc supposer qu'à l'image de NikA, et contrairement au lysozyme, HSA préserve le complexe inorganique en le maintenant dans une cavité. Ainsi, le rôle stabilisateur de la protéine semble être plus garanti par la présence d'une cavité que par un piégeage d'espèces actives réalisé par une structure protéique. Cependant, il reste à préciser le rôle exact de la cavité. On pourrait penser qu'un ancrage spécifique, comme c'est le cas avec NikA, semble être avantageux dans le temps puisque la présence de HSA, ne permet pas à FeL2 d'atteindre un nombre de cycles catalytiques aussi important que la présence de NikA.

(6) Limites du système : dégradation des HAP ?

Finalement, afin de tester les capacités d'oxydation du système photocatalytique et de l'espèce oxydante formée, il a été décidé de tester comme substrat des polluants

comme les hydrocarbures aromatiques polyinsaturés (HAP). Ces expériences étant réalisées sur un run unique, il a été décidé de réaliser ces tests avec le catalyseur inorganique seul FeL2. Trois nouveaux substrats ont donc été choisis : le naphthalène, le dihydronaphtalène et l'anthracène (Tableau 21). Ce dernier s'est montré totalement insoluble dans le milieu et a été totalement récupéré en fin de réaction (entrée 4). L'expérience a été répétée en présence de l'hybride qui pourrait aider à la solubilisation du substrat. De même, aucune conversion n'a été observée.

Une première limitation est donc liée à la solubilité des substrats potentiels en milieu aqueux.

Tableau 21. Résultats de la catalyse d'oxydation de divers substrats par FeL2 dans le tampon HEPES (10 mM, pH 7). Conditions : cata / substrat / [Ru^{II}(bpy)₃]²⁺ / TEOA = 1/500/200/600 éq.. Temps réactionnel = 24 heures.

Entrée	Substrat	conversion substrat (%)	Observation de produits d'oxydation
1	Cinnamate de méthyle	90	0
2	Naphtalène	100	0
3	Dihydronaphtalène	100	0
4	Anthracène	0	0

Quant au naphthalène et au dihydronaphtalène (entrées 2 et 3), ils sont totalement consommés en 24 h, sans qu'aucun produit organique ne soit observé en CPG. La phase gazeuse supérieure a alors été analysée qualitativement en CPG (Figure 100).

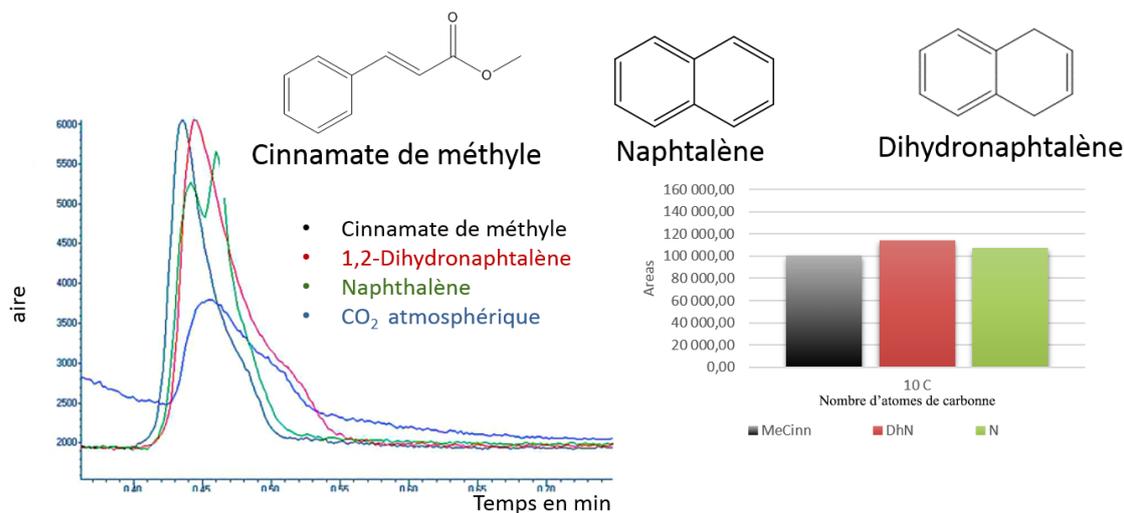


Figure 100. Mesure qualitative du CO₂ dégagé lors des réactions d'oxydation par FeL2.

On peut observer que les trois substrats conduisent tous à la production de CO₂. De plus, la quantité de CO₂ produite semble équivalente pour ces trois substrats qui possèdent le même nombre d'atomes de carbone dans leur squelette.

On peut donc en conclure que le catalyseur FeL2 ainsi que notre hybride FeL2-Nika est capable de dégrader, en conditions photocatalytiques, des substrats très stables tels que les HAP, mais à condition de réussir à les solubiliser dans le milieu réactionnel. Cela demandera donc quelques améliorations afin de pouvoir proposer une méthode viable pour la dégradation de polluants plus hydrophobes que le naphthalène.

IV) Conclusion

Les résultats préliminaires de photoréduction sont très encourageants mais souffrent de la confirmation de la présence du CO₂ à la hauteur de la balance des masses. Des travaux dans le futur impliqueront d'utiliser des substrats moins volatils aussi.

F) Conclusion

Ce projet avait pour objectif d'optimiser le système catalytique de FeL0-Nika, capable d'activer l'oxygène moléculaire mais dont l'efficacité ne dépassait pas les

deux cycles catalytiques après oxydation du ligand **L0**. Trois nouvelles métalloenzyme artificielles à centre Fer (III) **FeLn-NikA** ont été développées après la synthèse de trois nouveaux complexes de Fer (III) **FeL1,2,3** comportant des différences structurelle par rapport à **FeL0** au niveau du ligand dans le but de prévenir son oxydation. Dans un premier temps, des analyses de caractérisation, dont des études de structures cristallographiques, ont confirmé l'ancrage des complexes **FeL1,2,3** dans la protéine **NikA**, de façon identique à leur homologue **FeL0**. Dans un second temps, l'étude des propriétés catalytiques en cristallographie cinétique de ces hybrides démontre la possibilité de réduire le fer III au sein de ces nouveaux hybrides ainsi que la conservation de la capacité d'activer l'oxygène moléculaire en présence du DTT en tant que partenaire réducteur. Les modifications de **FeL0-NikA** n'entraînent donc aucune contrainte quant à l'activation de l'oxygène moléculaire. De plus, les structures **FeLn-NikAox** montrent que les modifications apportées aux ligands induisent une différence de comportement du ligand lors de l'étape de réduction de fer. L'oxydation du ligand ne devient alors plus une contrainte à la réactivité. Les catalyses en solution aqueuse sur un substrat exogène par **FeLn-NikA** en présence du réducteur DTT, ont d'ailleurs fait preuve d'une activité catalytique d'oxydation d'alcènes benzylique, par activation d'oxygène moléculaire, en formant du benzaldéhyde avec 15 TON. Les modifications apportées à **FeL0** ont donc permis de concevoir les premières oxygénases artificielles de ce genre. Toutefois la faible efficacité de cette réaction (15 TON) a mené à développer un second système de réduction du Fer III. Un système photocatalytique couplé aux hybrides **FeLn** a permis une forte conversion du substrat. Ces résultats démontrent que le moyen de délivrer les électrons au catalyseur est un processus limitant l'efficacité de nos catalyseurs. De plus, ce nouveau système montre un fort caractère oxydant allant jusqu'à la dégradation des produits d'oxydation en CO_2 . Les prochains travaux, concernant le développement de cette oxygénase artificielle, seront menés dans le but

de quantifier le dioxyde de carbone formés lors de photocatalyses d'oxydations d'alcène. Enfin, des tests de la stabilité de la sous unité inorganique de ces oxygénases artificielles ont clairement montré une synergie entre NikA et FeL2. Si la présence d'une cavité protéique semble nécessaire à une stabilisation de la réactivité de ce système, son effet reste à comprendre. Il est envisagé de déterminer l'état du polypeptide ainsi que l'état du complexe inorganique après catalyse et d'identifier les oxydants potentiels comme des dérivés réactifs de l'oxygène. L'ensemble de ces propriétés catalytiques de NikA-FeL2 amènent aussi à envisager une application dans la dépollution de l'eau. En effet, étant peu solubles, hydrophobes et relativement stables, les HAPs ont tendance à s'accumuler dans les sols et à contaminer les eaux souterraines. Au vu des résultats obtenus sur le naphthalène, les hybrides NikA-FeLn s'inscrivent dans cette lignée.

G) Bibliographie

(79) Cavazza, C.; Bochot, C.; Rousselot-Pailley, P.; Carpentier, P.; Cherrier, M. V.; Martin, L.; Marchi-Delapierre, C.; Fontecilla-Camps, J. C.; Menage, S. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 1069.

(88) Rousselot-Pailley, P.; Bochot, C.; Marchi-Delapierre, C.; Jorge-Robin, A.; Martin, L.; Fontecilla-Camps, J. C.; Cavazza, C.; Menage, S. *ChemBiochem* **2009**, *10*, 545.

(120) Micklitsch, C. M.; Yu, Q.; Schneider, J. P. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6277.

(121) Peng, L.; Xu, X.; Guo, M.; Yan, X.; Wang, S.; Gao, S.; Zhu, S. *Metallomics* **2013**, *5*, 920.

(122) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*; 95th ed.; Haynes, W. M., Ed.; CRC Press: Boca Raton, 2014-2015.

(123) Ghuman, J.; Zunszain, P. A.; Petitpas, I.; Bhattacharya, A. A.; Otagiri, M.; Curry, S. *J. Mol. Biol.* **2005**, *353*, 38.

Conclusion générale

L'objectif de ces travaux de thèses était la conception, la caractérisation et l'étude des propriétés catalytiques de deux nouveaux biocatalyseurs de réactions d'oxydation ; le premier dans le cadre d'oxydation asymétrique d'alcène, le second dans le cadre d'oxydation par activation d'oxygène moléculaire. Dans un premier temps, les deux hybrides ont tous les deux été préparés à partir de la protéine NikA, protéine bactérienne d'*Escherichia coli*, en tant que squelette protéique. De précédents travaux du Dr M. Cherrier ont déjà montré que cette protéine est capable de reconnaître le complexe Fe(EDTA), via son site de fixation pour l'ion Ni²⁺, par des liaisons hydrogène entre les carboxylates du ligand et certains acides aminés de la protéine. Les deux catalyseurs inorganiques choisis comportent donc au moins une fonction carboxylique sur leur ligand. Il diffèrent cependant de par leur métal, avec un complexe de ruthénium [Ru(II)**bpza**(CO)₂(Cl)] d'un côté et un complexe Fe(III)**Ln** de l'autre. Dans un premier temps, des analyses spectroscopiques ont permis de confirmer leur ancrage dans la protéine, tandis que les études de leurs structures cristallographiques, ont spécifié leur mode d'ancrage dans la cavité de fixation de l'ion Ni²⁺ via des interactions de types supramoléculaire entre un carboxylate du ligand et un acide aminé de la protéine. Ces résultats soulignent la polyvalence de la protéine NikA alors capable d'ancrer des complexes inorganiques à différents centres métalliques.

Concernant leurs propriétés catalytiques, nous avons montré l'aptitude de L'hybride Rubpza-NikA à difonctionnaliser des alcènes en chlorhydrines en présence de diacétate d'iodobenzène. La conception de cette métalloenzyme a permis de conférer une nouvelle activité au complexe de ruthénium qui se montre inactif en solution aqueuse sans sa protéine hôte. De plus, son efficacité atteint jusqu'à 258 cycles

catalytiques soit dix fois plus que celle obtenue en milieux organique par la famille de ruthénium (II) scorpionate $[\text{RuL}(\text{CO})_2\text{Cl}]$ dont le complexe **Rubpza** est issu (22 TON pour $[\text{Ru}(\text{II})\text{bdmpza}(\text{CO})_2(\text{Cl})]$). À ce jour, aucune énantiosélectivité n'a pu être observée et le mécanisme réactionnel reste à préciser. Cependant ce système ouvre la porte à d'intéressantes applications, permettant l'obtention de précurseurs de composés chimiques produits industriellement. Cette propriété fera l'objet de futurs travaux.

Les hybrides FeLn-NikA ont quant à eux fait preuve de capacité à activer l'oxygène moléculaire puis à le transférer à un substrat organique. Dans des conditions de photocatalyse, le système peut ainsi atteindre jusqu'à 1056 cycles catalytiques et procède à l'oxydation des substrats jusqu'à la dégradation des produits d'oxydation en CO_2 . Cette propriété permet d'envisager une application dans la dégradation de polluant HAP. En revanche, cette fois, la conception de métalloenzyme artificielle ne permet pas d'atteindre une réactivité unique par rapport à sa sous unité inorganique qui montre elle aussi la même réactivité. Toutefois, l'hybride se révèle nettement plus stable et donc plus performant que le complexe seul.

L'ensemble de ces résultats montre que les métalloenzymes artificielles sont des catalyseurs prometteurs dans le développement de solutions durables appliqué à des réactions d'oxydation variées.

Partie expérimentale

Tous les produits chimiques et les solvants proviennent de Sigma-Aldrich et d'Acros Organics. Ils ont été utilisés sans purification sauf cas mentionnés.

Les spectres UV–visibles ont été effectués sur un appareil Shimadzu UV-1800 dans les cuves de 1 cm de trajet optique.

Les spectres RMN (^1H et ^{13}C) ont été enregistrés à température ambiante sur un appareil Brüker Avance 300 MHz. Les solvants deutérés utilisés sont indiqués dans chaque cas. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en partie par million (ppm) et les constantes de couplage J en Hz. Les multiplicités sont désignées par les abréviations suivantes : s (singulet), sl (singulet large), d (doublet), dd (doublet de doublet), qd (quadruplet de doublet), t (triplet), q (quadruplet) et m (multiplet, pour une multiplicité > 4).

Les spectres de masse ont été effectués au SCIB/INAC-CEA-Grenoble sur un appareil Thermoquest Finnigan LCQ à trappe d'ions utilisant la technique d'ionisation par electrospray (ESI-MS) en mode positif et négatif.

Les chromatographies en phases gazeuses sont effectuées sur un appareil Perkin-Elmer autosystem, connecté à un XPE NELSON 1022 avec un détecteur FID, utilisant une colonne optima 17. Les températures d'injection et de détection étant de 250°C et 280°C, respectivement. La température du programme commence à 100°C pendant 4 minutes puis est incrémentée de 25°C par minutes sur une période de 13 minutes.

Les HPLC sont effectuées sur colonne Chiralcel OD dans les conditions suivantes : Hexane/*i*PrOH : 95/5 avec un débit de 0,25 mL.min⁻¹.

A) Techniques expérimentales

I) ICP-AES

La spectrométrie par torche à plasma à spectre d'émission atomique est une méthode de dosage physique qui permet de doser la quasi-totalité des éléments. Cette méthode présente l'avantage d'une détection extrêmement sensible de l'ordre du $\mu\text{g.L}^{-1}$ en seulement quelques minutes. Le principe de ce procédé repose sur la diffusion de l'échantillon, sous forme d'aérosols générés par un nébuliseur, dans un plasma d'argon (6 500 à 10 000 degrés) ce qui permet alors son ionisation avec une efficacité proche de 100%. Pour cela, il faut d'abord procéder à une minéralisation des échantillons dans l'acide nitrique à 10%. L'échantillon est ensuite dilué au dixième puis centrifugé avant d'être injecté dans la torche à plasma. La mesure faite est alors reportée sur une courbe d'étalonnage préalablement réalisée à l'aide d'une solution commerciale de ruthénium.

II) Cristallisation de l'hybride Rubpza-NikA

2 μL d'une solution de FeEDTA-NikA (10 mg.mL^{-1}) ainsi que 2 μL de solution d'agent précipitant (sulfate d'ammonium 1,5 à 1,9 M) dilué dans l'acétate sodium (100 mM pH 4,6) sont déposés sur une lamelle siliconée pour former une goutte. La lamelle est ensuite retournée puis vissée sur un puit contenant 500 μL de la solution d'agent précipitant.

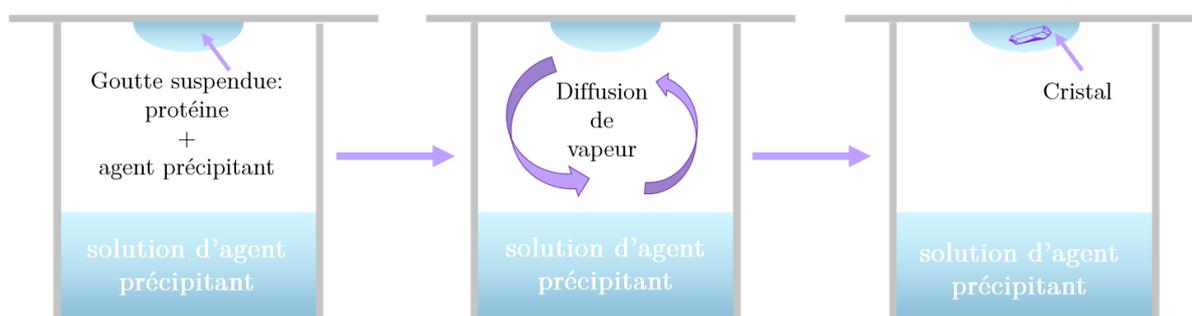


Figure 101. Principe de la cristallisation par diffusion de vapeur en goutte suspendue.

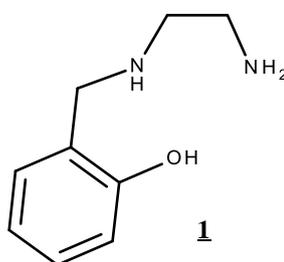
À ce moment, la concentration en agent précipitant est plus élevée dans le puits que dans la goutte suspendue. Un échange par diffusion de vapeur permet alors d'équilibrer les deux solutions. De ce fait, la concentration en agent précipitant et en protéine augmente à mesure que le volume de la goutte diminue. Ce phénomène conduit la goutte en condition saturante située dans la zone de précipitations, et amorce la cristallisation ($C \rightarrow C'$). Au fur et à mesure que les germes cristallins se forment, la concentration en NikA diminue jusqu'à approcher la courbe de solubilité ($C' \rightarrow C''$). À ce point précis, les cristaux de NikA nouvellement formés resteront stables. Après un transfert des cristaux dans une solution stabilisante d'agent précipitant (2,1-2,3 M), ils seront ensuite trempés dans une solution de complexes Rubpza pendant une nuit. Après cela, les cristaux orthorhombiques incolores sont lavés dans la solution stabilisante avant d'être congelés à l'azote liquide dans une solution cryo-protectrice (solution stabilisante contenant 15% v/v de glycérol).

B) Synthèse

I) Synthèses des ligands L1, L2 et L3

Les ligands L1, L2, et L3 sont synthétisés suivant une procédure générale illustrée par la synthèse de L2.

(1) *N*-(2-hydroxybenzyl)-*N,N'*-éthylènediamine

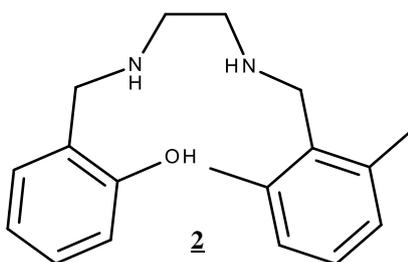


Une solution d'aldéhyde salicylique (11,96 g, 98 mmol, 1 éq.) diluée dans le méthanol est ajoutée lentement par l'ampoule à addition à une solution d'éthylènediamine (60 g, 1 mol, 10 éq.) dans le méthanol (450 mL) placé sous agitation et à 0°C. Le milieu

réactionnel est laissé sous ces conditions pendant 1 heure avant l'ajout de borohydrure de sodium (3.71g, 98 mmol, 1eq.) par ampoule à addition. Après 19 heures sous agitation, le mélange est concentré sous pression réduite pour donner une huile jaune. L'huile est reprise dans le dichlorométhane (300 mL) puis lavé à la saumure (2 mL) (3 ×100 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée sous pression réduite pour donner le produit 1 pur avec un rendement de 80%

¹H NMR (300 MHz, MeOD), δ (ppm) : 2,38 (s, 6H, CH₃); 2,8 (t, J = 5,4 Hz, 2H, CH₂.); 2,85 (t, J = 5,4 Hz, 2H, CH₃.); 3,77 (s, 2H, CH₂-AR); 3,86 (s, 2H, CH₂-AR); 7-6,5 (m, 7H, CH_{Ar}) .

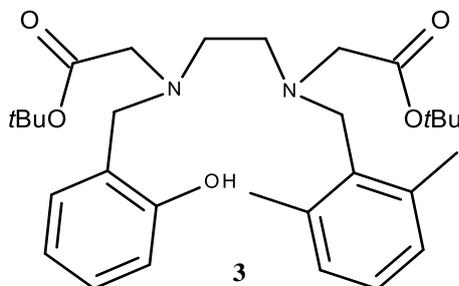
(2) *N*-(2-hydroxybenzyl)-*N,N'*-éthylènediamine



Une solution de diméthylbenzaldéhyde (98 mmol) dissous dans le méthanol (150 mL) est ajoutée au goutte à goutte par ampoule à addition à une solution de **1** (60g, 1 mol, 10 éq.) diluée dans le méthanol (150 mL) et placé sous agitation. Le milieu réactionnel est agité pendant une heure à 0° puis du borohydrure de sodium (3,71g ; 98 mmol ; 1 éq.) est ajouté lentement. Après 19 heures sous agitation à température ambiante, le milieu est dilué par l'ajout de dichlorométhane (100 mL), puis lavé par une solution aqueuse de chlorure de sodium (2 ×30 mL) avant d'être séché et concentré sous vide pour donner le produit *N*-(2-hydroxybenzyl)-*N,N'*-ethylenediamine (2) avec un rendement de 80 %.

^1H NMR (300 MHz, MeOD), δ (ppm) : 2,67 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, CH_2) ; 2,77 (t, $J=5.7$ Hz, 2H, CH_2) ; 3,88 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar.}$) ; 6,76 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, CH_{Ar}) ; 7,08 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, CH_{Ar}).

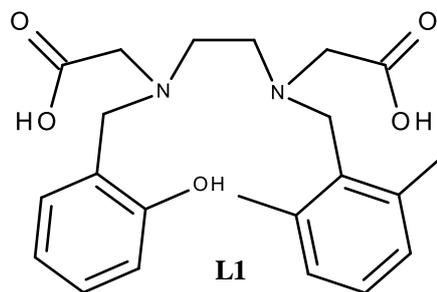
(3) *N*-(2-hydroxybenzyl)-*N*, *N'*-éthylènediamine



Le composé **2** (500 mg, 1,76 mmol) et la diisopropyléthylamine (DIPEA) (0,60 mL, 3,52 mmol, 2 éq.) sont dissous dans l'acétonitrile (15 mL). Le milieu est placé sous gaz inerte puis une solution de bromoacétate de *tert*-butyle (27 g, 0,14 mol) dilué dans l'acétonitrile est lentement ajoutée par ampoule à addition. Le milieu réactionnel est ensuite placé sous agitation à température ambiante pendant 18 heures puis diluée avec du dichlorométhane avant d'être lavée par une solution aqueuse de chlorure de sodium. La phase organique est alors séchée sur sulfate de sodium puis concentrée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice pour donner le composé *N*-(2-hydroxybenzyl)-*N*, *N'*-éthylènediamine (**3**) avec un rendement de 50 %.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm) : 1,45 (s, 18H, CH_3); 2,37 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-Ar.}$); 2,68 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, CH_3 .); 2,82 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, CH_2) ; 3,10 (s, 2H, CH_2) ; 3,24 (s, 2H, CH_2) ; 7-6,5 (m, 7H, CH_{Ar}) .

(4) L2 Acide *N*-(2,6-Diméthylbenzyl)-*N'*-(2-hydroxybenzyl)-*N,N'*-éthylène-diaminediacétique.



Une solution du composé **3** (342 g, 0,67 mmol, 1 éq.) dissout dans le dichlorométhane est placée sous agitation et refroidie à 0°C. De l'acide trifluoroacétique (3,06 g, 26,7 mmol, 40 éq.) est ensuite ajouté au goutte à goutte. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 17h avant d'être concentré sous vide. Le résidu obtenu sous forme d'huile est ajouté au goutte à goutte sur de l'éther diéthylique induisant un précipité blanc. Le précipité est alors filtré et séché sous pression réduite pour conduire à 115 mg (43%) du ligand **L2** sous forme d'une poudre blanche.

¹H NMR (300 MHz, MeOD), δ (ppm) : 1,45 (s, 18H, CH₃); 2,37 (s, 6H, CH₃-Ar.); 2,68 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, CH₃.); 2,82 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, CH₂) ; 3,10 (s, 2H, CH₂) ; 3,24 (s, 2H, CH₂) ; 7-6,5 (m, 7H, CH_{Ar}) .

MS (ESI) m/z : 401 ([M+H]⁺).

II) Mode opératoire type de synthèse des complexes *FeL1*, *FeL2*, *FeL3*

Les trois complexes *FeL1*, *FeL2*, et *FeL3* sont synthétisés de la même façon. Cette synthèse est illustrée par celle du complexe *FeL2*:

Le ligand **L2** (50 mg, 1 éq.) est mis en suspension dans l'eau en présence de trois équivalents d'hydroxyde de potassium jusqu'à complète solubilisation de ce dernier. Puis, un équivalent de chlorure de fer(III) en solution aqueuse est ajouté, le milieu réactionnel prend immédiatement une couleur violette et la formation d'un précipité

est observée. Après une nuit d'agitation à l'air libre et à température ambiante, le précipité est séché par filtration pour aboutir à une fine poudre pourpre (80% de rendement).

Le complexe FeL1 ne précipite pas directement dans l'eau. Le milieu réactionnel est alors concentré sous vide avant d'être repris dans le méthanol puis précipité à l'éther pour donner une fine poudre violette.

MS (ESI) FeL1 m/z: 384 [(L-3H)⁺Fe(III)+Cl]⁻, MS (ESI) FeL2 m/z: 488 [(L-3H)⁺Fe(III)+Cl]⁻, MS (ESI) FeL3 m/z : 506 [(L-3H)⁺Fe(III)+Cl]⁻.

IR FeL1 : $\nu(\text{COO}^-)$: 1638 cm^{-1} , $\nu(\text{OH})$: 3500 cm^{-1} , IR FeL2 : $\nu(\text{COO}^-)$: 1637 cm^{-1} , $\nu(\text{OH})$: 3500 cm^{-1} , IR FeL3 : $\nu(\text{COO}^-)$: 1635 cm^{-1} , $\nu(\text{OH})$: 3500 cm^{-1} .

III) Mode opératoire type de synthèse des hybrides FeL1-NikA, FeL2-NikA et FeL3-NikA

Les trois hybrides sont synthétisés de la même façon. Cette synthèse est illustrée par celle de l'hybride FeL2-NikA:

5 équivalents d'une solution de complexe dissous dans le DMSO sont dilués dans le tampon tris.HCl (40 mM pH 7,6) et incubés sur la nuit à 4 °C en présence de la protéine apo-NikA (1 éq.). La solution d'incubation est ensuite purifiée par dialyse en utilisant une membrane de dialyse d'un seuil de coupure 12,0-14,0 kDa et d'un bain de tris.HCl (20 mM, pH 7,6). L'excès de molécules de complexe non dissout ainsi que les précipités d'apo-NikA sont éliminés par centrifugation à 5000 tours/minute. L'hybride est ensuite concentré sur Centricon, pourvu d'une membrane ayant un seuil de coupure de 10 kDa.

IV) Caractérisation des hybrides.

(1) Dosage de la protéine Nika

Une gamme étalon est réalisée avec l'albumine sérique bovine à 2 mg/mL. Plusieurs échantillons de BSA sont préparés (0, 5, 10, 20, 40, et 60 μL) et leur volume est ajusté à 2 mL avec du tampon phosphate KH_2PO_4 (10 mM pH 6,8). 100 μL de solution de Rose Bengale à 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ sont alors ajoutés à chacun des échantillons. Ceux-ci sont ensuite incubés pendant 5 minutes à température ambiante. 100 μL d'acide acétique glacial à 50 % sont ajoutés à chaque échantillon. Ceci fait, une lecture immédiate de l'absorbance à 560 nm est réalisée après agitation au vortex. Une fois la gamme d'étalonnage obtenue, la concentration en protéine des solutions d'hybrides peut être déterminée selon le même protocole sur des échantillons de 2, 5, 10 et 20 μL .

(2) Dosage du fer :

Une gamme d'étalonnage est tout d'abord réalisée à partir d'une solution mère d'ions Fe(II) à 500 μM . Des échantillons d'un volume final de 65 μL contenant 2, 4, 6, 8 et 10 nmol de Fe(II) sont préparés à partir de cette solution mère. Ensuite, 45 μL d'acide perchlorique à 1 M sont ajoutés à chacun des échantillons puis, après agitation vigoureuse, l'ensemble est incubé à température ambiante pendant 1 heure. Après centrifugation, 72 μL de bathophénanthroline disulfate à 1,7 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ et 36 μL d'ascorbate de sodium à 38 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ sont ajoutés à 90 μL de chaque échantillon de fer. L'addition finale de 27 μL d'acétate d'ammonium saturé et dilué 3 fois, induit l'apparition d'une couleur rose pâle pour chacun des échantillons dont l'intensité est fonction de la quantité de fer présente. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, les échantillons sont centrifugés puis une mesure de la différence d'absorbance entre 535 et 680 nm est effectuée. Le même protocole est utilisé sur les échantillons contenant les différents hybrides pour déterminer leur concentration en fer.

V) Expérience type de test de catalyse d'oxydation par activation d'oxygène par FeLn-NikA en présence de DTT/TCEP ou ascorbate de sodium en tant qu'agent réducteur.

Dans un tube eppendorf sont introduit le tampon HEPES [Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique] (qsp 67 μL , 10 mM, pH 7) le substrat (3 μL , 1,23 μmol , 500 éq.) dilué dans l'acétonitrile, et l'hybride catalytique en solution dans le tampon tris.HCl (20 mM, 2,5 nmol, pH 7). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant une période de 30 minutes d'incubation avant l'ajout du réducteur (10 μL , 0,075 μmol , 600 éq.) préalablement dissouts dans le tampon HEPES. La réaction est laissée sous agitation à l'air libre et à température ambiante pendant une durée de 4 heures. 2,5 μL d'une solution de benzophénone (0,1 M) dans le dichloroéthane sont alors ajoutés, en tant que référence interne, dans le milieu réactionnel, puis celui-ci est extrait par 100 μL d'acétate d'éthyle. Un aliquote de 1 μL est alors injecté en chromatographie en phase gazeuse (GC). Les rendements et les taux de conversion sont calculés à partir de l'aire sous les pics qui correspondent aux produits ou au réactifs, par comparaison à celle du pic reliée à la référence interne. La formule utilisée pour calculer les rendements des produits d'oxydation est : $R = A_p / A_{\text{réf}} \times n_{\text{réf}} \times F_{\text{rp}}$. A_p désigne l'aire sous le pic du produit, $A_{\text{réf}}$ l'aire sous le pic de la référence, $n_{\text{réf}}$ le nombre de mole de la référence (en μmol) et F_{rp} le facteur de réponse du produit.

VI) Expérience type de test de photodégradation par activation d'oxygène par FeLn-NikA

Dans un tube en verre sont introduit le tampon HEPES [acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique] (qsp 67 μL , 10 mM, pH 7), le substrat (3 μL , 1,23 μmol , 500 éq.) dilué dans l'acétonitrile, l'hybride catalytique (2,5 nmol, 1 éq.) en solution dans le tampon tris (20 mM , 2,5 nmol pH 7) et une solution constitué du chromophore $[\text{RuII}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et du donneur d'électron TEOA. Le milieu réactionnel est exposé aux rayons lumineux bleus par la présence de LED bleues. La réaction est

ensuite laissée sous agitation à l'air libre et à température ambiante pendant une durée de 24 heures. 2,5 μL d'une solution de benzophénone (0,1 M) dans le dichloroéthane sont alors ajoutés, en tant que référence interne, dans le milieu réactionnel, puis celui-ci est extrait par 100 μL d'acétate d'éthyle. Un aliquot de 1 μL est alors injecté en chromatographie en phase gazeuse (GC).

VII) Expérience type de test de catalyse d'oxydation du styrène ou des *trans*- β -méthylstyrène et *cis*- β -méthylstyrène par Rubpza-NikA en présence de $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ en tant qu'oxydant.

Dans un tube eppendorf de 1,5 mL, sont introduits Rubpza-NikA (5 nmol ; 1 éq.), le tampon HEPES [Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique] (qsp 134 μL , 10 mM, pH 7,4), le styrène dilué au 21^{ème} dans l'acétonitrile (6 μL ; 2,46 μmol ; 500 éq.) et l'oxydant diacétate d'iodobenzène (1 mg ; 3 μmol ; 600 éq.). Le mélange réactionnel est agité à 500 tours/minute pendant 30 minutes. Ensuite, l'agitation est stoppée et 5 μL d'une solution de référence interne, la benzophénone 0,1 M dans le dichloroéthane, sont ajoutés puis le mélange réactionnel est extrait par 200 μL d'acétate d'éthyle. Un aliquot de 1 μL est alors injecté en GC ou GC-MS.

